

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**DISTRIBUCIÓN DE CANALES DE POTASIO  
EXPRESADOS  
HETEROLOGAMENTE EN CÉLULAS POLARIZADAS  
EN CULTIVO**

**POR :**

**ANDRÉS            SALAS CASAS**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE**

**BIOLOGO**

**TUTOR: DR. ARTURO PONCE BALDERAS**

**SE DESARROLLÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN.**

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIAS.**

**A MI MAMÁ :** POR SU CARIÑO INCONDICIONABLE. “GRACIAS MAMÁ ”.

**A MI PAPÁ :** QUE AUNQUE YA NO ESTAS CON NOSOTROS TE EXTRAÑO MUCHO. ESTO ES PARTE DE TÍ. “GRACIAS PAPÁ”.

**A DIOS** POR DARME LA OPORTUNIDAD DE VIVIR Y POR SER LA SUMA DE TODAS LAS CONSTANTES QUE RIGEN EL MÁRAVILLOSO MECANISMO DE LA “VIDA”.

**A IRMA :** POR SER EL MAR QUE INUNDA MIS PENSAMIENTOS.

## **AGRADECIMIENTOS.**

**AL DR. ARTURO PONCE B.** POR SU PACIENCIA Y DEDICACIÓN TANTO EN LA PARTE EXPERIMENTAL COMO EN LA ESCRITURA DE ESTA TESIS.

AL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA BIOFISICA Y NEUROCIENCIAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DE ESTUDIOS AVANZADOS.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TEGNOLOGÍA (CONACyT), POR LA BECA OTORGADA PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	<b>Acido Desoxirribonucléico</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosin Trifosfato</b>
<b>CMV</b>	<b>Citomegalovirus</b>
<b>DMEM</b>	<b>Medio esencial mínimo de Dulbeco</b>
<b>FLU</b>	<b>Virus de la influenza</b>
<b>HBSS</b>	<b>Solución salina de Hanks'</b>
<b>IgG</b>	<b>Inmunoglobulina G</b>
<b>LB</b>	<b>Medio luria</b>
<b>MDCK</b>	<b>Células epiteliales Madin Darby Canine Kidney</b>
<b>MEM</b>	<b>Medio esencial mínimo</b>
<b>Not 1</b>	<b>Enzima que corta en el lado 3'</b>
<b>PBS</b>	<b>Amortiguador salino de fosfatos</b>
<b>PVF</b>	<b>Proteína verde fluorescente</b>
<b>RNA</b>	<b>Acido ribenucléico</b>
<b>TBE</b>	<b>Tris boratos EDTA</b>
<b>TGN</b>	<b>Red tubular del trans-Golgi</b>
<b>UTR</b>	<b>Región de RNA que no codifica para proteínas</b>
<b>VSV</b>	<b>Virus de la estomatitis vesicular</b>
<b>XhoI</b>	<b>Enzima que corta en el lado 5'</b>

## CONTENIDO

I	INTRODUCCIÓN.....	1
II	ANTECEDENTES.....	6
	CANALES IÓNICOS DE:	
	a) Potasio.....	7
	b) Sodio.....	9
	c) Cloro.....	10
III	POLARIDAD CELULAR.....	10
	a) Polarización Apical/Basolateral.....	10
IV	CARACTERÍSTICAS DE LA DISTRIBUCIÓN POLARIZADA DE LA MEMBRANA.....	11
	a) Anatómicas.....	11
	b) Proteínas.....	11
	c) Lípidos y glicolípidos.....	13
V	ORIGENES DE LA POLARIDAD APICAL/BASOLATERAL..	14

a)	Inserción vectorial.....	14
b)	Reciclaje de Membrana.....	14
c)	Polarización "default".....	15
d)	Anclaje al citoesqueleto.....	15
e)	Interacción con la matriz extracelular o con las células vecinas.....	15
f)	Anclaje a glicosil-fosfatidilinositol (PI).....	15
g)	Grado de diferenciación.....	16
h)	La unión oclusora.....	16
VI	La polaridad se puede alcanzar independientemente o aún en ausencia de las uniones oclusoras.....	19
VII	DISTRIBUCIÓN DIRECCIONADA "SORTING" DE PROTEÍNAS HACIA LA CARA APICAL O BASOLATERAL.....	22
VIII	SEÑALES DE IDENTIDAD ("TAGS") EN LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANAS APICALES Y BASOLATERALES.....	23
IX	OBJETIVOS.....	25
a)	Objetivos particulares.....	26
X	MÉTODOS.....	27

1) Cultivos celulares.....	27
a) Cultivo de Células (MDCK).....	27
b) Cultivos Primarios de Neuronas de Hipocampo a baja Densidad.....	27
1) Co-cultivo con células gliales.....	28
2) Cultivo con medio sintético (medio neurobasal).....	29
c) Diseño y manejo de los vectores de Transfección.....	29
d) Minipreps.....	31
2) PREPARACIÓN DEL DNA DE CALIDAD PARA TRANSECCIÓN.....	33
2.1 Tranfección de Células.....	34
a) Tranfección con Precipitación de Calcio.....	34
b) Transfección con Lipofectamina Plus.....	35
3) INMUNOCITOQUIMICA.....	35
4) MICROSCOPIA CONFOCAL.....	36
XI RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37

a)	Expresión de canales de potasio dependientes del voltaje.....	39
b)	Expresión de canales de potasio Rectificadores entrantes dependientes de Proteínas G GIRK.....	42
	Figura 1. Transfecciones de neuronas y MDCK.	43
	Figura 2. Transfecciones de neuronas y MDCK.	44
XII	CONCLUSION.....	45
XIV	BIBLIOGRAFIA.....	46

## I. INTRODUCCION

Un aspecto importante de la fisiología celular y del que hasta ahora se sabe muy poco, es el referente a los mecanismos y señales que las células tienen para distinguir y localizar con precisión los diversos componentes proteínicos que participan en su funcionamiento: Todas las proteínas se sintetizan siguiendo un esquema general que implica la lectura del DNA genómico y su traducción en RNA mensajero, que posteriormente es procesado en el retículo endoplásmico por los ribosomas, para generar secuencias peptídicas que a su vez se ensamblan, forman complejos y se unen a carbohidratos o glucolípidos, todo esto en el aparato de Golgi (Griffths y col.,1989; Hubbard, 1989). Sin embargo, después de este punto, poco se sabe de los mecanismos que determinan la distribución de éstas proteínas, particularmente de las que se van a localizar en la membrana plasmática, aún cuando se reconoce que muchas de las proteínas que integran la membrana no se distribuyen homogéneamente o al azar (Hunziker y col.,1991; Odorizzi y col.,1996), sino que observan una localización muy delicada y precisa en el sitio donde ejercen su función. Por ejemplo, los receptores de acetilcolina se distribuyen en el surco sináptico de la placa neuromuscular, mientras que los canales de calcio dependientes del voltaje se localizan en las terminales sinápticas de las motoneuronas que inervan a las fibras musculares (Cooper y Jan, 1999). La localización precisa de componentes de membrana es más evidente y crucial en células polarizadas, es decir en aquellas que presentan diversos dominios de membrana con una función distinta, cómo las células

epiteliales, que presentan un dominio apical y otro basolateral, (Figura 1; Rodríguez-Boulan y Nelson, 1989). O en las neuronas que tienen un dominio axonal y ún somatodendritico, (Figura 2; Gumbiner y Simons, 1986).

En cuanto a las señales que determinan la distribución localizada de los componentes de membrana, se cree que existen señales intrínsecas dentro de la secuencia de la misma proteína, o bien en la región de RNA que no codifica para proteínas (UTR) y hasta el momento se han caracterizado algunas de ellas, como por ejemplo la presencia de residuos hidrofóbicos u aromáticos cerca de la region carboxilo terminal, como serina, treonina y tirosina (Le Bivic y col.,1990).

La mayor parte de las señales de direccionamiento que se hán descubierto se han obtenido de estudios con células epiteliales cultivadas, particularmente con la línea celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney). Estas crecen en cultivo formando monocapas, en donde las células establecen uniones estrechas con sus vecinas y polarizan su membrana en un dominio apical y uno basolateral.

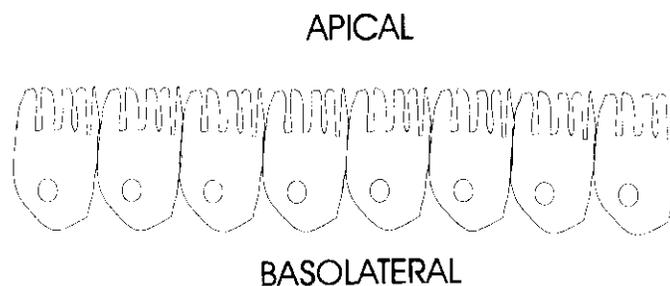


Figura 1. Dominios Apical y Basolateral de la células MDCK.

La estrategia que se sigue para descubrir señales de distribución localizada de proteínas de membrana (targeting) consiste en insertar dentro de las células polarizadas (MDCK) la secuencia de DNA que codifica para la proteína de membrana en estudio. El DNA se halla inserto dentro de una secuencia circular de DNA (plásmido) que generalmente contiene, además del gene de interés, genes que confieren resistencia a algún antibiótico para selección en bacterias, y también genes para selección de células eucarióticas transfectadas, como la geneticina.

Otro ejemplo de células polarizadas donde la localización específica de las proteínas de membrana es crucial son las neuronas, que tienen la función primordial de transmitir e integrar y codificar información en forma de impulsos nerviosos o potenciales de acción es función del axón. Estos son cambios transitorios de potencial transmembranal, ocasionados por aperturas y cierres de canales iónicos. Las neuronas poseen dominios de membrana con funciones diferentes: la región somatodendrítica generalmente se especializa en recibir e integrar los estímulos de neuronas aferentes, mientras que el axón se encarga de conducir el impulso nervioso hacia otras neuronas, que están a veces a grandes distancias del soma (Figura 2; Gumbiner y Simons, 1986). La presencia de diferentes tipos de canales iónicos a lo largo de las diversas regiones de la neurona es de fundamental importancia, por lo que los mecanismos y señales implicados adquieren particular interés en este tipo de células. Sin embargo, es

relativamente más difícil estudiar las señales de direccionamiento en este tipo de células debido a que son más difíciles de cultivar y manipular.

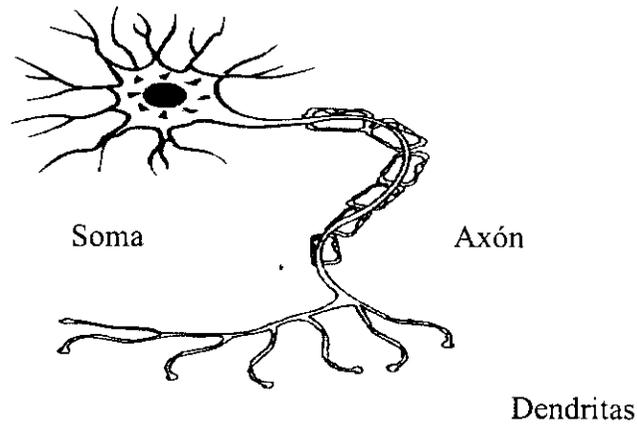


Figura 2. Esquema de una neurona donde se representa sus diferentes dominios.

A pesar de esto existe la teoría de que los mecanismos y las señales de direccionamiento de las neuronas podrían tener cierta similitud con las de las células epiteliales, en 1978 Rodríguez-Boulan y Sabatini, realizaron estudios con virus en células MDCK, y encontraron que estos geman polarizadamente, el virus de estomatitis lo hace hacia el dominio basolateral, mientras que el de influenza gema hacia el apical, de las MDCK en monocapa. Posteriormente, en 1991 Dotti y Simmons encontraron que al infectar neuronas piramidales de hipocampo de rata con el virus de influenza, éste se distribuye en el axón de las neuronas, mientras que el de estomatitis se limita al dominio somatodendrítico.

Posteriormente se han encontrado las mismas similitudes en distribución de una gran variedad de proteínas expresadas heterológicamente (Scheffele y col., 1995). Hasta ahora prácticamente todas las proteínas de membrana para las que se ha descrito una señal de direccionamiento son proteínas integrales simples, cuya secuencia peptídica solo atraviesa una vez la membrana. La gran mayoría de

estas proteínas que se distribuyen en el dominio apical de las células epiteliales. Hasta la fecha no se ha descrito ninguna señal para proteínas que atraviesan varias veces a la membrana, cómo en el caso de receptores, bombas, transportadores o canales iónicos, por lo que éste aspecto resulta de particular interés.

El propósito del presente trabajo de tesis ha sido contribuir al estudio de señales de distribución polarizada de canales iónicos en células polarizadas en cultivo, tanto epiteliales cómo neuronales. Dado que se conoce la secuencia de DNA que codifica para diversos de canales iónicos, estos se pueden introducir en las células para estudiar cómo y donde se expresan, mediante técnicas inmunocitoquímicas cómo describe más adelante. En este trabajo nos propusimos transfectar células en cultivo con diferentes plásmidos que contienen secuencias de cDNA que codifican para canales iónicos, afin de valorar si estos canales se expresan polarizadamente en la membrana de la células y en que dominios lo hacen.

Para los fines de presentación de este trabajo se describirán inicialmente algunos conceptos básicos relacionados al tema, primero con una breve descripción de canales iónicos, seguido de un resumen sobre los aspectos de señales de polarización "targeting", a continuación una descripción de los modelos biológicos utilizados y de los plasmidos que contienen los canales iónicos.

## II. ANTECEDENTES

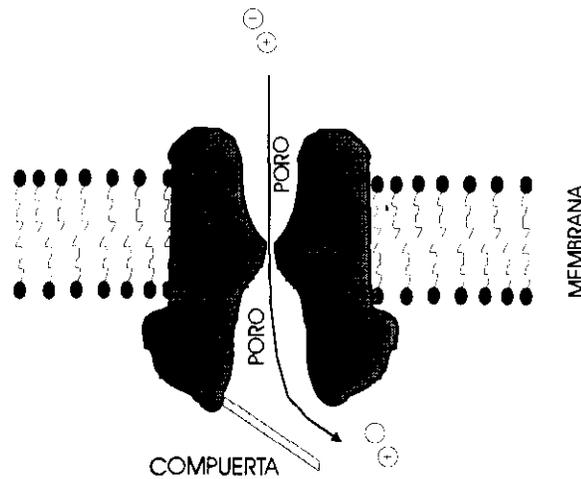


Figura 3. Modelo de un canal iónico dependiente del voltaje, que representa los principales componentes funcionales: poro acuoso, filtro de selectividad, compuerta y sensor (Hille, 1992).

Los canales iónicos son proteínas de membrana cuya propiedad es la de permitir selectivamente el paso de iones entre el interior y el exterior de la membrana plasmática. Se han caracterizado electrofisiológica y molecularmente una enorme diversidad y están presentes prácticamente en todos los tipos de células, desde las bacterias hasta las neuronas de mamíferos. Inicialmente fueron estudiados en procesos relacionados con la excitabilidad de la membrana, en células tales como las neuronas o las células musculares, pero actualmente se ha reconocido su importancia en un sinúmero de procesos celulares y fisiológicos tales como el control de la proliferación celular, la

regulación de la tonicidad celular, el reconocimiento de microambientes celulares, etc. Poseen características funcionales como son: **Un poro acuoso**, a través del cual los iones pueden fluir de uno a otro compartimento que separa la membrana plasmática. **Un filtro de selectividad**, por medio del cual los canales identifican y discriminan entre los diferentes tipos de iones. **Una puerta**, que limita el flujo de los iones a través del poro independientemente del gradiente electroquímico que los impulsa (figura 3).

Existen canales selectivos a los iones de mayor importancia fisiológica, como el sodio, el potasio, el calcio y el cloro. Utilizando metodologías bioquímicas, electrofisiológicas y de biología molecular se ha aprendido mucho de la secuencia, estructura y función de estas complejas proteínas y cada vez es más claro que su presencia en las células es crucial para muchos aspectos de la fisiología (Hille, 1992). A continuación se da un breve resumen de los aspectos más relevantes de cada tipo de canal iónico:

#### **a) CANALES DE POTASIO ( $K^+$ )**

Existe una enorme diversidad de canales específicos para el potasio en la naturaleza. Su presencia es prácticamente ubicua en cualquier tipo de células, desde bacterias hasta el ser humano. La presencia de corrientes membranales de potasio fueron descritas desde principios de siglo, asociadas con fenómenos de excitabilidad, como el potencial de acción. Con el desarrollo de métodos electrofisiológicos como el "patch clamp" se encontró una gran diversidad funcional de este tipo de canales. Se describieron (1) canales de K dependientes

del voltaje, (2) dependientes de calcio intracelular (3) dependientes de ATP (4) dependientes de proteínas G y (5) canales de  $K^+$  dependientes de  $Na^{++}$ . Funcionalmente, de acuerdo a la cinética de la corriente iónica que producen existen canales de K (1) con rectificación tardía (2) con rectificación entrante y (3) con inactivación (Erwin Neher y Bert Sakmann ., 1976).

El uso de métodos de biología molecular ha contribuido considerablemente al conocimiento de este tipo de canales, particularmente de los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. Se inició con la clonación del locus **shaker** en *Drosophila*, pudiéndose demostrar que este gene codificaba para un canal de potasio. Posteriormente se identificaron otros tres genes, también en *Drosophila*, a los que se denominó **Shab**, **Shaw** y **shal** respectivamente. Esto condujo a la búsqueda de genes de canales de potasio en otros organismos. Hasta la fecha se han identificado más de 60 genes en mamífero, que tienen similitud con los cuatro genes de *Drosophila*, y se han agrupado en familias por su homología. Existen así canales de potasio de la familia **shaker**, **shaw**, **shab** y **shal** en mamíferos e inclusive en plantas (Papazian y col., 1987).

El análisis de la secuencia peptídica predice que esta se conforma en la membrana atravesándola seis veces. Existe una región que se embebe solo parcialmente en la membrana, denominada H5. Y que parece ser el dominio que constituye el filtro de selectividad por el potasio. Y es la región denotada S4 quien confiere al canal su sensibilidad por el voltaje. Los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje son tetrámeros que pueden constituirse como

heteromultímeros, formados por subunidades de la misma, pero no de diferente familia (Covarrubias et al, 1991).

Además de la familia de canales de potasio dependientes del voltaje, se han clonado canales de otras familias, como los rectificadores entrantes, que participan importantemente en células cardiacas y neuronas, canales dependientes de calcio intracelular y canales dependientes de ATP. Todos ellos tienen cierta similitud estructural. Los canales rectificadores entrantes constan solo de dos subunidades. No obstante conservan el dominio H5, que da la selectividad al potasio.

#### **b) CANALES DE SODIO**

La existencia de canales de sodio se reconoció al mismo tiempo que la de canales de potasio, y su caracterización bioquímica, y después molecular, fué incluso anterior a la de los de potasio. Sin embargo su estudio molecular no ha sido tan fértil como los de K, porque existe una menor diversidad de tipos de canales de potasio. Si bien existen abundantemente distribuidos en la naturaleza, y son ubicuos en células excitables, no son tan diversos como los primeros, ya que existe prácticamente un solo tipo de canal de potasio con mínimas diferencias entre todos los organismos. Su estructura es muy similar a las de los de potasio, pero en éste caso el gene completo consta de cuatro repeticiones, cada una de las cuales tiene seis segmentos transmembranales. Además de los dependientes a voltaje, existe otro tipo de canales que se

encuentran en células epiteliales y que, a diferencia de los anteriores, no depende del voltaje y son bloqueables por amilorida (Hille, 1992).

### **C) CANALES DE CLORO**

Los canales de cloro desempeñan importantes funciones de regulación de la excitabilidad celular, en el transporte transepitelial y en la acidificación de organelos intracelulares. Esta variedad de funciones requiere una gran variedad de canales de cloro, que son codificados por genes que pertenecen a familias no relacionadas. La familia CLC de canales de cloro tiene nueve miembros en mamíferos, que se distribuyen diferencialmente tanto en la membrana plasmática como en organelos intracelulares. Las proteínas CLC tienen entre 10 y 12 segmentos transmembranales. Probablemente funcionan como dímeros y pueden tener dos poros. Su importancia fisiológica es manifiesta por tres tipos de enfermedades humanas (miotonía congénita, enfermedad de Dent y síndrome de Barter) que resultan de mutaciones en algunos de estos canales, y en modelos de ratones "knock out" (Jentsch et al, 1999).

## **III. POLARIDAD CELULAR**

### **a) POLARIZACION APICAL/BASOLATERAL.**

La posibilidad de que las células epiteliales tengan una permeabilidad diferente en la cara apical y basolateral para un mismo tipo de ión fue propuesta inicialmente para explicar el transporte vectorial de  $\text{Na}^+$  a través de la piel de

encuentran en células epiteliales y que, a diferencia de los anteriores, no depende del voltaje y son bloqueables por amilorida (Hille, 1992).

### **C) CANALES DE CLORO**

Los canales de cloro desempeñan importantes funciones de regulación de la excitabilidad celular, en el transporte transepitelial y en la acidificación de organelos intracelulares. Esta variedad de funciones requiere una gran variedad de canales de cloro, que son codificados por genes que pertenecen a familias no relacionadas. La familia CLC de canales de cloro tiene nueve miembros en mamíferos, que se distribuyen diferencialmente tanto en la membrana plasmática como en organelos intracelulares. Las proteínas CLC tienen entre 10 y 12 segmentos transmembranales. Probablemente funcionan como dímeros y pueden tener dos poros. Su importancia fisiológica es manifiesta por tres tipos de enfermedades humanas (miotonia congénita, enfermedad de Dent y síndrome de Barter) que resultan de mutaciones en algunos de estos canales, y en modelos de ratones "knock out" (Jentsch et al, 1999).

## **III. POLARIDAD CELULAR**

### **a) POLARIZACION APICAL/BASOLATERAL.**

La posibilidad de que las células epiteliales tengan una permeabilidad diferente en la cara apical y basolateral para un mismo tipo de ión fue propuesta inicialmente para explicar el transporte vectorial de  $\text{Na}^+$  a través de la piel de

rana por Koefoed-Johnson y Ussing ( 1958). Esta asimetría se encontró después en todos los epitelios capaces de transportar sustancias, por estudios de microscopía electrónica y de fraccionamiento de membranas apicales y basolaterales, por la adhesión diferencial de sondas radioactivas y fluorescentes y por otros procedimientos experimentales (Balada y col., 1993). El estado actual del conocimiento es el siguiente:

#### **IV. CARACTERÍSTICAS DE LA DISTRIBUCIÓN POLARIZADA DE LA MEMBRANA.**

**A) ANATÓMICAS.** Las regiones apicales y basolaterales difieren generalmente en sus áreas de superficie ( Weibel, 1976; Matsuura y col., 1982 ), y en el número de partículas intermembranales por unidad de área (Cerejido y col., 1980). La cara apical se distingue por la presencia de microvellosidades y la basolateral por la presencia de desmosomas y uniones comunicantes. Las proteínas y los lípidos que constituyen ambas caras pueden presentar también un mayor o menor grado de polaridad. **B) PROTEÍNAS.** a) Diferentes especies proteicas pueden exhibir polaridad opuesta en la membrana de la misma célula. Algunas proteínas, como la NA-K-ATPasa (Lamb y col., 1981), la aminopeptidasa ( Louvard, 1980), la adenilato ciclasa (Reik y col., 1970), los receptores hormonales (Parr y Kirby, 1979; Taylor y col., 1982), los sistemas de transporte de iones y aminoácidos (Gmaj y col., 1979; Rabito y col., 1983) y los de azúcar (Kinne et al., 1975), así como proteínas de uniones comunicantes y desmosomas, se encuentran generalmente en la cara basolateral de una célula

rana por Koefoed-Johnson y Ussing ( 1958). Esta asimetría se encontró después en todos los epitelios capaces de transportar sustancias, por estudios de microscopía electrónica y de fraccionamiento de membranas apicales y basolaterales, por la adhesión diferencial de sondas radioactivas y fluorescentes y por otros procedimientos experimentales (Balada y col., 1993). El estado actual del conocimiento es el siguiente:

#### **IV. CARACTERISTICAS DE LA DISTRIBUCIÓN POLARIZADA DE LA MEMBRANA.**

**A) ANATÓMICAS.** Las regiones apicales y basolaterales difieren generalmente en sus áreas de superficie ( Weibel,1976; Matsuura y col.,1982 ), y en el número de partículas intermembranales por unidad de área (Cerejido y col., 1980). La cara apical se distingue por la presencia de microvellosidades y la basolateral por la presencia de desmosomas y uniones comunicantes. Las proteínas y los lípidos que constituyen ambas caras pueden presentar también un mayor o menor grado de polaridad. **B) PROTEÍNAS.** a) Diferentes especies proteicas pueden exhibir polaridad opuesta en la membrana de la misma célula. Algunas proteínas, como la NA-K-ATPasa (Lamb y col.,1981), la aminopeptidasa ( Louvard,1980), la adenilato ciclasa (Reik y col., 1970), los receptores hormonales (Parr y Kirby, 1979; Taylor y col.,1982), los sistemas de transporte de iones y aminoácidos (Gmaj y col.,1979; Rabito y col.,1983) y los de azúcar (Kinne et al.,1975), así como proteínas de uniones comunicantes y desmosomas, se encuentran generalmente en la cara basolateral de una célula

epitelial. Otras, como leucinoaminopeptidasa (Desnuelle,1979; Kerjaschki y col.,1984), el canal de  $\text{Na}^+$  sensible a amilorida ( Lewis y col.,1976), la dipeptidil peptidasa, la T-glutamil transferasa (Rabito y Karish,1984) y los transportadores  $\text{Na}^+$ - glucosa y  $\text{Na}^+$ -aminoácidos (Wolfram y col., 1984), se encuentran en la región apical. b) Una especie prostética de membrana puede estar polarizada en ún tipo de célula y no en otro. Tal es el caso de la Na-K-ATPasa, que exhibe una distribución homogénea en la membrana celular del eritrocito, mientras en células de vejiga urinaria, páncreas, piel de rana y células tubulares de riñón ocupa solo el lado basolateral ( Mills et al.,1975; Cereijido y col., 1980). c) Una especie protéica puede mostrar polaridad opuesta en dos tipos de células epiteliales diferentes. Un ejemplo es la Na-K-ATPasa que, cómo se dijo, se encuentra en la región basolateral de la mayoría de los epitelios. Sin embargo, en el epitelio de las glándulas sudoríparas se la ha encontrado del lado apical (Quinton y Tormey, 1973). Esta asimetría bioquímica confiere a las células epiteliales la capacida de bombear iones vectorialmente. Los lípidos de la cara apical estan más estrechamente empaçados que los basolaterales y pueden restringir y frenar la atividad de enzimas y translocadores (Le Grimellec,1988). d) Una especie protéica puede polarizarse en caras opuestas del mismo tipo celular. Brown y colaboradores (1988), han demostrado que algunas células epiteliales intercaladas del túbulo colector cortical del riñón de la rata tiene sus  $\text{H}^+$ -ATPasa insertadas en la cara apical, mientras las células vecinas, del mismo tipo, tiene la polaridad opuesta.

e) Diferentes especies protéicas en la misma célula pueden diferir en su grado de polaridad. El grado de polarización apical/basolateral de una especie protéica se estudia a través de la adhesión a la membrana plasmática o fracciones de regiones apicales o basolaterales de sondas fluorescentes, radiactivas y químicas ( Fujita y col.,1972; Lisanti y col.,1980). Estas técnicas no están exentas de errores debido a contaminaciones con otras fracciones, ruido de fondo y enlaces no específicos. A pesar de estas fuentes de incertidumbre, diferentes proteínas de membrana de la misma célula pueden exhibir un amplio rango de polarización apical/basolateral, de tal manera que el exceso de una especie de proteínas en una cara puede ser de solo 10% mientras en otros casos puede estar exclusivamente en ella ( Rodríguez-Boulán,1983).

**C) Lípidos y Glicolípidos.** Aunque los lípidos pueden difundir libremente en el plano de la membrana celular, la distribución de los distintos tipos en la membrana apical y basolateral no es idéntica (Taylor y col.,1982; Maurice et al.,1988), ni tienen el mismo grado de fluidez (Le grimelle y col.,1988). Estas diferencias se deben principalmente a la composición de la hemi-cara externa. La unión estrecha bloquea la difusión hacia la región basolateral de sondas lipídicas introducidas en esta cara (Dragsten y col.,1981).

## V. LOS ORIGENES DE LA POLARIDAD APICAL/BASOLATERAL.

Se ha encontrado un número de mecanismos celulares responsables del origen de la polaridad entre la membrana apical y basolateral. **a) Inserción vectorial:** Se ha demostrado que la gemación polarizada del virus de la influenza (a través de la cara apical) y del virus de la estomatitis (a través de la basolateral) depende de la inserción vectorial de sus proteínas de cubierta, segundos después de haber sido sintetizadas en los ribosomas y madurado en el aparato de Golgi (Rodríguez-Boulán y col.,1983). Del mismo modo, Caplan y colaboradores (1986), han encontrado que, una vez sintetizada, la subunidad alfa de la Na-K-ATPasa se dirige únicamente a la membrana basolateral de las células MDCK.

**b) Reciclaje de membrana:** La célula lleva a cabo un proceso continuo de remoción e inserción de su membrana que, no obstante, no despolariza sus componentes (Patzak y Wimkler,1986). En el caso de las células epiteliales, esto requiere que la célula clasifique y dirija las vesículas de membrana que se han ido quitando de las regiones apical y basolateral y que las regrese ordenadamente a sus respectivos dominios. Por ejemplo, la leucinoaminopeptidasa se retira de la cara apical de las células MDCK y reinsertada pocos minutos después en la misma cara (Louvard,1980).

**c) Polarización " default ":** Al menos al principio, una proteína de membrana se puede acumular en una de las células por carecer de la señal necesaria para dirigirse a la cara Opuesta ( McQueen y col.,1986;Roth y col.,1987).

**d) Anclaje al citoesqueleto:** La adhesión de proteínas al citoesqueleto subyacente ayuda a mantenerlas en una posición asimétrica. Ojakian y Schwimmer,(1988) y Nelson Veshnock (1987) encontraron que la fodrina (un análogo de la espectrina) forma una red insoluble en contacto con la región basolateral con las células MDCK, y que la Na-K-ATPasa es retenida en esta región debido a su unión a la fodrina. Por el contrario, cuando las proteínas son libres de derivar en el plano de la membrana y alcanzar el polo opuesto de la célula, pueden extraerse fácilmente de esta posición con tritón X-100 (Salas et al.,1986). Sin embargo, la asimetría de otras proteínas no parece depender de que estén unidas directamente al citoesqueleto. Así, la disgregación de microtúbulos y microfilamentos con drogas como la colchicina, el nocodazol y la citocalasina provoca una reducción del grado de polarización de las proteínas HA del virus de influenza, aunque no interfiere con la distribución polarizada de la proteína G del virus de la estomatitis en la cara basolateral (Rindler y col., 1985; Salas y col., 1986).

**e) Interacción con la matriz extracelular o con las células vecinas:**

Los marcadores apicales, pero no los basolaterales, pueden mostrar cierto grado de polarización en células privadas de adhesión al substrato (Balcarova-Stander y col., 1984; Contreras y col., 1989). Otras proteínas de membrana pueden no mostrar polaridad a pesar de que las células están firmemente

adheridas al sustrato y a sus vecinas. El bloqueo de moléculas de adhesión celular (CAMs) con anticuerpos previene la polarización de proteínas de membrana en células MDCK, así como el ensamble de elementos del complejo de unión, los cuales están expuestos normalmente del lado lateral (Imhoff et al., 1983; Gumbiner y col., 1988).

#### **F) Anclaje a glicosil-fosfatidilinositol (PI):**

Hay cierta clase de proteínas, como la fosfatasa alcalina, la dipeptidasa renal, la trealasa y la 5'nucleotidasa, cuyo dominio extracelular es un polipeptido ligado a una molécula fosfatídica de la membrana por una etanolamina, un glicano y un inositol (Low y Saltiel, 1988). Dado que estas proteínas son marcadores apicales típicos, se ha supuesto que su asimetría podría deberse a su peculiar forma de anclaje, y diseñaron un ensayo para degradar el péptido con una fosfolipasa C específica, haciendo esta degradación de fosfatidilinositol del lado apical y del lado basolateral por separado (Lisanti y col., 1980). De este modo, identificaron seis nuevas proteínas ligadas a moléculas fosfatídicas y encontraron que, en efecto, todas ellas estaban restringidas al lado apical.

#### **g) Grado de diferenciación:**

En algunas células la distribución polarizada de enzimas y cotransportadores depende en gran medida de la densidad celular y de factores inductores de la diferenciación (Mullin y col., 1980; Amsler y Cook, 1982).

#### **h) La unión oclusora:**

La barrera constituida por la unión oclusora contribuye a la polaridad de dos maneras: (1) algunas moléculas, en particular los lípidos que no tienen un

grado apreciable de translocación y las proteínas que tienen altos coeficientes de difusión en el plano de la misma, pueden estar restringidas a una u otra cara por la barrera que presenta la unión oclusora. Sin embargo, mientras éste mecanismo puede ayudar a mantener una distribución polarizada, no puede ser responsable de que se alcance esta asimetría. (2) Manteniendo la asimetría de la composición lípidica y en particular su grado de empaquetamiento, la unión estrecha ayuda a restringir la actividad de enzimas y de acarreadores de una región dada (Le Grinellec et al., 1988).

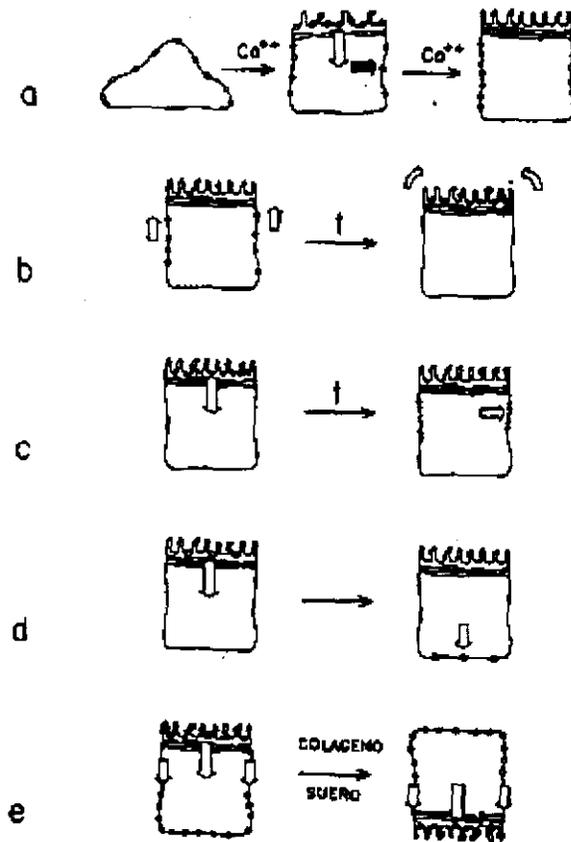


Figura 4. Polarización de las proteínas de membrana. Para mayor detalle ver texto del punto VI.

## **VI. LA POLARIDAD SE PUEDE ALCANZAR INDEPENDIENTEMENTE O AÚN EN AUSENCIA DE LAS UNIONES OCLUSORAS.**

Hasta hace pocos años se afirmaba que la polarización apical/basolateral se debe a que la unión oclusora impide la mezcla por difusión de las moléculas de ambas regiones. Sin embargo la figura 4, ilustra varias situaciones en las cuales el proceso de polarización se lleva a cabo independientemente de la presencia de la barrera constituida por la unión oclusora:

(a) Las células MDCK sembradas a confluencia y mantenidas 20 horas en un medio con bajo Calcio ( $1-4 \mu\text{M}$ ) no forman uniones oclusoras (Gonzalez-Mariscal et al., 1985) y no tienen sus Na-K-ATPasas localizadas asimétricamente en su membrana basolateral, sino distribuidas en toda la superficie de membrana (Contreras et al., 1989) (Figura 4a). Tras la adición de  $\text{Ca}^{++}$ , la unión oclusora se forma rápidamente, atrapando así a una fracción de Na-K-ATPasas del lado apical (equivocado). Sin embargo, la célula retira las Na-K-ATPasas de ésta posición y alcanza su polarización normal en unas pocas horas.

(b) Esquematiza la situación que prevalece tanto en los marcadores apicales en la mucosa intestinal cómo en los hepatocitos. Estos marcadores son insertados primeramente en la membrana basolateral y migran desde ahí hacia su posición permanente en el lado apical (Hauri et al., 1979; Bartles et al., 1987; Massey et al., 1987).

(c) Cuando la proteína G, que una vez sintetizada en la célula es dirigida hacia la membrana basolateral, es extraída de la envoltura del virus de la

estomatitis, incorporada en liposomas y fusionada a la membrana apical de células MDCK, es quitada rápidamente por la célula de esta posición y reinsertada en su región basolateral (Matlin et al., 1983) (figura 4c). La diferencia entre este proceso y el descrito en la figura 4a es que, mientras la proteína G es quitada de la región apical e insertada en la basolateral, la Na-K-ATPasa solamente es quitada de la apical y en cambio la Na-K-ATPasa insertada del lado basolateral es una nueva molécula de Na-K-ATPasa que se origina en los compartimientos intracelulares (Contreras et al., 1989).

(d) Algunas proteínas de membrana son dirigidas hacia los receptores a través de un proceso de "endocitosis mediada", en el que el complejo ligando-receptor es atrapado, endocitado y transportado a endosomas. El bajo pH de los endosomas disocia los ligandos que pueden luego ser dirigidos a la superficie opuesta de la célula epitelial (transcitosis). En algunos casos, también el mismo receptor es transportado de una cara a otra. Un claro ejemplo de éste proceso es el transporte de inmunoglobulinas producido por células plasmáticas a través del epitelio en una amplia variedad de secreciones tales como la bilis, la leche, la saliva, etc. (Brandtzaeg, 1974; Mostov et al., 1980). Otro ejemplo de transcitosis, pero en la dirección opuesta, se observa en las ratas en periodo de lactancia, que adquieren inmunidad por el paso de inmunoglobulina (IgG) de la leche a través del intestino delgado.

Este flujo transcelular de membrana implica necesariamente que se lleva a cabo alguna forma de clasificación durante la transcitosis para evitar un entremezclado de los componentes apicales y basolaterales. El hecho de que

unas 100 vesículas atraviesen por minuto una célula MDCK en cada dirección da una idea del grado de discriminación de éste proceso (Simons y Fuller, 1985).

(e) Las células aisladas de glándula tiroidea y mantenidas en suspensión, se agregan y forman folículos en los cuales las microvellosidades apuntan hacia el baño y las uniones oclusoras ocupan el extremo exterior del espacio intercelular. En estas circunstancias, la exposición de la superficie libre de los folículos al colágeno, provoca la formación de un lumen en el centro del folículo, inversión de la polaridad y migración de la unión estrecha en el plano de la membrana lateral hasta ocupar el extremo interno del espacio intercelular (Chambard et al., 1984; Barriere et al., 1986). Las células secretoras de  $\text{HCO}_3^-$  del túbulo colector cortical del riñón poseen intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  en el dominio apical, y bombas de protones en el basolateral. La polaridad de esos mecanismos de translocación iónica puede ser invertida acidificando al animal (Schwartz et al., 1985). Una explicación alternativa es que, como consecuencia de esta acidificación, una célula con una polaridad dada se apague, mientras que una célula vecina, con polaridad inversa, se encienda (Brown et al., 1988).

## **VII. DISTRIBUCIÓN DIRECCIONADA "SORTING" DE PROTEÍNAS HACIA LA CARA APICAL O BASOLATERAL.**

Durante los primeros estadios de síntesis, tanto las proteínas apicales como las basolaterales se co-distribuyen en el retículo endoplásmico y son cotransportadas a través del complejo de Golgi, es decir, comparten la misma ruta. Pero a partir del trans-Golgi se lleva a cabo su discriminación, separación y subsecuente migración vectorial, pues como señalamos, las células epiteliales tienen una composición química y morfológica en cada polo.

Se han encontrado dos mecanismos distintos por los cuales se discrimina a las proteínas que han de ser distribuidas diferencialmente en una u otra cara. En el primero, observado en estudios de fraccionamiento celular, ambos tipos de proteínas son primero transportadas del aparato de Golgi a la membrana basolateral y, posteriormente, las proteínas destinadas a la cara apical son endocitadas y re-ubicadas correctamente (García-Villegas y col.,1996). En el segundo mecanismo, los diversos tipos de virus se insertan directamente en uno u otro polo. Rodríguez-Boulan y Sabatini (1978) encontraron que en las MDCK el virus de la estomatitis vesicular (VSV) gema basolateralmente, mientras que el virus de la influenza (FLU) lo hace apicalmente. Luego Rodríguez-Boulan y colaboradores (1983) demostraron que ello se debe a que las proteínas que constituyen la envoltura del virus (dos proteínas HA del FLU y una G del VSV) son insertadas directamente en dichas regiones. Ambos tipos de proteínas son cotransportadas a través del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi, pero al final de éste son segregadas en un compartimento conocido como red tubular

del trans-Golgi (TGN). En esta región se lleva a cabo una clasificación, tras la cual las proteínas son incorporadas a vesículas de transporte que migran posteriormente hacia la cara correspondiente. Estas observaciones, hechas con proteínas exógenas, se han extendido a proteínas endógenas de las células MDCK, tales como las subunidad  $\alpha$  de la Na-K-ATPasa, que es insertada directamente en la cara basolateral (Contreras et al., 1989).

### **VIII. SEÑALES DE IDENTIDAD ("TAGS") EN LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA APICALES Y BASOLATERALES.**

El estudio de la clasificación de proteínas que han de ser enviadas a uno u otro polo de la membrana se complementa con el análisis de sus moléculas, para encontrar alguna peculiaridad en su composición o estructura que determina dicha discriminación. Así se ha encontrado que poseen una "tarjeta de identidad", que puede ser una señal intrínseca en su secuencia de aminoácidos o en los grupos de carbohidratos que se añaden al péptido durante su síntesis. Por ejemplo, las hidrolasas son conducidas hacia los lisosomas por poseer cadenas laterales de manosa, que son reconocidas en el complejo de Golgi por receptores específicos (Sly, 1982). Sin embargo, los carbohidratos ligados al péptido por su terminal N no parecen mediar el direccionamiento de proteínas epiteliales de la membrana plasmática, ya que la inhibición de la glucosilación por tunicamicina no altera la clasificación correcta de las proteínas HA del virus FLU ni de la proteins G del VSV en las células MDCK (Green y col., 1981).

del trans-Golgi (TGN). En esta región se lleva a cabo una clasificación, tras la cual las proteínas son incorporadas a vesículas de transporte que migran posteriormente hacia la cara correspondiente. Estas observaciones, hechas con proteínas exógenas, se han extendido a proteínas endógenas de las células MDCK, tales como las subunidad  $\alpha$  de la Na-K-ATPasa, que es insertada directamente en la cara basolateral (Contreras et al., 1989).

### **VIII. SEÑALES DE IDENTIDAD ("TAGS") EN LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA APICALES Y BASOLATERALES.**

El estudio de la clasificación de proteínas que han de ser enviadas a uno u otro polo de la membrana se complementa con el análisis de sus moléculas, para encontrar alguna peculiaridad en su composición o estructura que determina dicha discriminación. Así se ha encontrado que poseen una "tarjeta de identidad", que puede ser una señal intrínseca en su secuencia de aminoácidos o en los grupos de carbohidratos que se añaden al péptido durante su síntesis. Por ejemplo, las hidrolasas son conducidas hacia los lisosomas por poseer cadenas laterales de manosa, que son reconocidas en el complejo de Golgi por receptores específicos (Sly, 1982). Sin embargo, los carbohidratos ligados al péptido por su terminal N no parecen mediar el direccionamiento de proteínas epiteliales de la membrana plasmática, ya que la inhibición de la glucosilación por tunicamicina no altera la clasificación correcta de las proteínas HA del virus FLU ni de la proteína G del VSV en las células MDCK (Green y col., 1981).

Otros tipo de estudio, utilizan "quimeras", que son proteínas artificiales formadas mediante la unión de dos péptidos distintos que alcanzan polaridad opuesta, y con proteínas a las que se les ha quitado segmentos de su secuencia de aminoácidos y que después se han expresado en células epiteliales para observar su incorporación polarizada. Estos estudios han sugerido que la señal de identidad reside en el ectodominio de la proteína (Roth et al., 1987).

## **IX. OBJETIVOS.**

Objetivo general. El propósito de este trabajo es contribuir al conocimiento de señales de direccionamiento de canales iónicos en células polarizadas, tanto epiteliales como neuronales. El trabajo que aquí se desarrolló es parte de un proyecto que busca conocer señales de direccionamiento (targeting) de canales iónicos y consistió en transfectar células polarizadas en cultivo (epiteliales y neuronales) con una variedad de plásmidos que contienen canales iónicos y, utilizando métodos inmunohistoquímicos para saber si los productos se insertan en la membrana y si lo hacen polarizadamente.

Específicamente, se utilizó como modelo epitelial a las células MDCK, una línea celular con propiedades epiteliales, mientras que como modelo neuronal se utilizaron neuronas de hipocampo de rata en cultivo primario. Los canales iónicos que se transfectaron son : GIRK, un canal de potasio con rectificación entrante, RCK1 un canal de potasio de rata que produce rectificación tardía, Kv3.1b, un canal de potasio de rata de la familia Shaw y Kv3.2 un canal de potasio de rata de la familia Shaw, que produce por splicing alternativo tres productos, que difieren en su región C-terminal.

**a) Objetivos particulares.**

- 1.- Optimizar las condiciones para cultivar neuronas piramidales de hipocampo de rata a baja densidad que produzcan neuronas polarizadas, con características farmacológicas similares a las reportadas en la bibliografía.
- 2.- Determinar el método de transfección más eficiente en neuronas de cultivos primarios.
- 3.- Amplificar los plásmidos que se utilizarían en los procedimientos de transfección, en cantidad y pureza suficiente para los diversos ensayos de inmunohistoquímica.
- 4.- Determinar la expresión de los distintos productos y compararlos con los de células epiteliales MDCK.

## **X. MÉTODOS**

### **1) Cultivo celular**

#### **a) Cultivo de células MDCK**

Se mantienen en cajas Petri de 100 mm<sup>2</sup> y se incuban en un medio que contiene DMEM (GIBCO), complementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 10 000 U/lit de penicilina streptomycin. Estas células se incuban a 37°C, en una atmósfera saturada de vapor con 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora de cámara húmeda, estéril (Forma Scientific). Para resembrarlas se les cambia el medio cada tres días, pero cuando se requiere hacerlas crecer, se tienen que someter a un procedimiento en el que inicialmente se lavan las monocapas dos o tres veces con solución salina (PBS sin calcio) y después se incuban con tripsina-EDTA en un medio libre de calcio. La falta de calcio hace que las uniones estrechas se desensamblen y la acción de la tripsina las despegan eventualmente del sustrato, las células así tratadas adoptan una forma esférica y se despegan, con lo cual se pueden resembrar diluidas en nuevas cajas de Petri o bien congelarse, la acción de la tripsina es bloqueada por el suero que contiene el medio de cultivo (Contreras et al., 1989).

**b) Cultivos primarios de Neuronas de Hipocampo a baja densidad.** Se utilizaron dos procedimientos de cultivo, que difieren en la composición de los medios utilizados, pero el procedimiento general para la obtención de las

de suero de caballo. Cuando alcanzan la madurez se utilizan como sustrato de las neuronas. Las neuronas se siembran sobre cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-Lisina, y a los cuales se les pone unas gotas de parafina en las esquinas para mantener una separación de aproximadamente 1 mm entre las neuronas y las células gliales. Las neuronas se siembran inicialmente con un medio que contiene 10% de suero fetal de bovino, pero al co-cultivarlas con las gliales se retira el suero de caballo.

- 2) **Cultivo con medio sintético (Medio neurobasal).** En el segundo procedimiento se utilizó el medio sintético especial para cultivo de este tipo de células Neurobasal (GIBCO BRL), adicionado con medio B27 10X (GIBCO BRL). Las células se siembran sobre cubreobjetos de vidrio de borosilicato tratados previamente con poli-L-lisina. Durante las primeras tres horas se mantienen en medio MEM con 10% de suero fetal de bovino, para favorecer su adhesión al sustrato. Después el medio es reemplazado por el Neurobasal complementado con B27 y con 10 mM de glutamina. No se adicionan antibióticos (Tao y col.,1999).

### **c) Diseño y manejo de los vectores de transfección.**

Los cDNA que codifican para los diversos canales iónicos utilizados en este trabajo (RCK1, GIRK1) se obtuvieron a partir del plásmido de expresión en bacteria (pBluescript) cortando con la enzima XhoI en el lado 5' y Not I en el 3'. Después de purificar la banda correspondiente a partir de un gel de agarosa al

1%, el segmento se insertó en el sitio de multiclonación de PCDNA3 (MCS), un plásmido para expresión en células eucarióticas y que contienen un promotor de citomegalovirus (CMV) (figura 5).

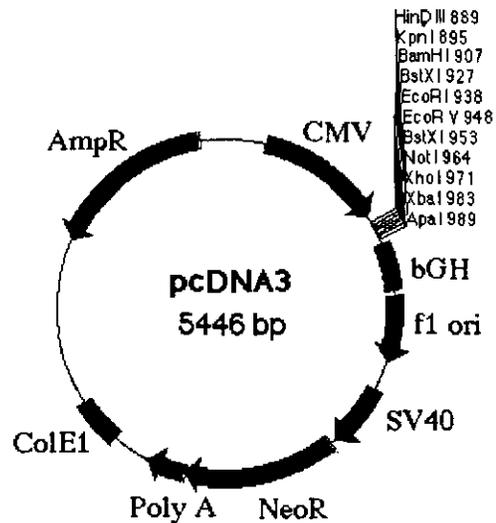


Figura 5. Plásmido de expresión para células eucariotas.

Posteriormente, para amplificar este plásmido se utilizó la bacteria *Escherichia coli*, de la cepa DH5 $\alpha$ . Para producir bacterias competentes (capacitadas para aceptar plásmidos) se utilizó el procedimiento de cloruro de calcio, como lo describe en Maniatis (1978): Se colocaron 500 $\mu$ l de bacteria (de un stock en glicerol) en 100 ml de LB (Broth Base) sin ampicilina en tubos de ensayo de 13X100mm (Fishser), se dejaron crecer durante 1.5 a 2 hrs (tiempo

para alcanzar la fase logarítmica, a 37°C en agitación. Después se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante, se resuspendieron en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.05 M (ph 7.0 con tris a 25 mM, filtrado) frío, posteriormente se mantuvieron en hielo los tubos durante 10 minutos, enseguida se centrifugaron, resuspendiendo en 5 ml de la solución preparada y centrifugar, se resuspende nuevamente en 5 ml de la solución, centrifugar y por último resuspender en 2 ml de la solución (1 ml /tubo), se mantienen en hielo por lo menos 30 minutos. Las bacterias así preparadas se pueden usar inmediatamente o bien se congelan a -70 C.

Ya siendo competentes las bacterias se transformaron de la siguiente manera: se dejó la bacteria competente en hielo hasta que esta se descongeló completamente, después se colocan 200µl de bacteria en tubos eppendorf de 2 ml, y 1µl de DNA, del cual se desea amplificar. Se dejan en hielo durante 30 minutos, después se incuban a 42 °C, durante 90 segundos; inmediatamente el tubo se coloca en hielo durante 1:30 segundos, cerca del mechero se colocan 800 µl de LB ( Broth Base , sin ampicilina ), posteriormente se incuban a 37°C durante 30 minutos. Después de lo cual se siembran en cajas de Petri que contienen medio de Luria (LB) con ampicilina como antibiotico 100µl/1ml de selección y se incuban a 37°C, se dejan toda la noche.

**d) Para seleccionar las colonias que incorporaron correctamente el plásmido se hizo el procedimiento denominado minipreps**, para esto se procedió de la siguiente manera: Las bacterias que incorporan el plasmido, adquieren resistencia a la ampicilina y forman colonias después de la incubación

a 37 °C. Estas colonias se seleccionan posteriormente con palillos de madera, y sembrandolas en tubos de ensayo que contienen 3 ml de medio de Luria con Ampicilina. Después de dejarlas crecer 8 horas en agitación y a 37 °C, de cada tubo de ensayo (i.e), de cada colonia se toman 2 ml y se colocan en tubos eppendorf de 2 ml que se centrifugan a 7600 rpm durante un minuto; el sobrenadante se desecha, y la pastilla se resuspende en 200µl de solución I, se agrega 400µl de solución II, se mezcla manualmente e inmediatamente se incuban en hielo durante 5 minutos, posteriormente se adicionan 300µl de solución III ( ver cuadro 1), mezclando manualmente, se centrifuga 15 minutos a 1400 rpm a temperatura ambiente ( el tiempo varia dependiendo del precipitado), enseguida se recupera el sobrenadante en otros tubos poniéndoles 540 µl de isopropanol, se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente, centrifugar durante 20 minutos a 14000 rpm ( hasta que los restos de la bacteria se precipiten), con mucho cuidado se pipetea el isopropanol del lado contrario de donde se encuentra el DNA, se lavan con etanol al 70 % dos veces desechandolo en cada una de ellas, se dejan secar los tubos eppendorf durante 2 h mínimo y posteriormente, el pellet se resuspende en 500 µl de TBE. ( ver apendice ).

Para verificar la calidad del DNA obtenido por este procedimiento, se realiza una restriccion enzimatica, en la que 1 µl de cada muestra de miniprep se incuba con una enzima de restriccion general como ECORI o HindIII y se compara con el DNA del plásmido original, para ello se corre una muestra del

DNA cortado en un gel de agarosa, en buffer de TBE con bromuro de etidio, como lo describe Maniatis (1978).

## 2). Preparacion de DNA de calidad para Transfeccion.

Una vez seleccionada la colonia de bacterias que incorporó correctamente el plásmido, se deja crecer en grandes cantidades para poder obtener suficiente DNA para los procedimientos de transfección que se usarán seguidamente. A partir de la fracción sobrante de bacteria se usó una alícuota de 100  $\mu$ l que se agregó a un matraz Erlenmeyer que contiene 1 litro de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C en agitación toda la noche. Para aislar y purificar el plásmido se utilizaron columnas de adsorción (Qiagen).

## **2.1) TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS.**

Se utilizaron dos métodos de transfección: 1) Por precipitación de calcio y 2) Con Lipofectamina Plus (GIBCO BRL). Los procedimientos se describen a continuación (Kohrmaan y col., 1999)

### **a) Transfección con Precipitación de Calcio.**

1. Para las MDCK, el día anterior a la transfección las células se tripsinizan y se cuentan para sembrarlas de manera que estén al 50-80% de confluencia al día siguiente. A las neuronas no se hace ninguna modificación. Se utilizan 3 microgramos de DNA por caja de 35 mm. El DNA se diluye en 250 ml de solución 300 mM de  $\text{CaCl}_2$  esteril. Y se agrega gota a gota a otro tubo eppendorf que contiene 250 ml de medio HBS 2x (100 mM de HEPES, 5 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4$  ). La mezcla forma un precipitado muy fino al cabo de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, y después de agitar, se agrega a las células. Se mantienen en incubación con este medio por 30 minutos a 6 horas. Posteriormente se retira el medio de transfección y se agrega un medio que contiene glicerol al 5% durante 40 segundos, se lava y se incuban las células en su medio normal por 24 a 48 horas, para permitir la expresión de los DNA transfectados.

**b) Transfección con Lipofectamina Plus.** Se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante, con modificaciones para optimizar la eficiencia de transfección específicamente para células MDCK, como se describe a continuación:

2. El día anterior a la transfección las células se tripsinizan y se cuentan para sembrarlas de manera que estén al 50-80% de confluencia al día siguiente.
3. El DNA se diluye en DMEM (GIBCO BRL) y posteriormente se agrega el reactivo PLUS
4. El reactivo de lipofectamina se diluye en DMEM en un segundo tubo y se incuba por 15 min
5. Se combinan el DNA y la lipofectamina y se incuban por 15 min a temperatura ambiente
6. Se aspira el medio de las células y se reemplaza con DMEM
7. Se adiciona el complejo de DNA y lipofectamina a las células y se incuban a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas
8. Se lava el medio de transfección y se reemplaza por medio normal (DMEM que contiene 10% de Suero Fetal Bovino y 10 000 unidades por litro de Penicilina-Streptomicina ), y se incuba por 24-48 horas

### **3). INMUNOCITOQUÍMICA.**

Después de la incubación, las células se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Se permeabilizan con una solución 0.01% de triton x-100 en PBS por 30 minutos . Se incuban en solución

de bloqueo (10% suero fetal bovino, albúmina bovina de suero 2%, durante una hora a 37°C. En seguida se incuban con un anticuerpo primario  $\alpha$ -GIRK1 (ALOMONE Laboratories, Israel) diluído 1:100 en medio de bloqueo sin biotina por 2 horas a 37°C. Se enjuagan 3x 15 minutos en PBS después se incuban con un anticuerpo secundario conjugado con biotina (IgG  $\alpha$  conejo , ZYMED) en medio de bloqueo por 1 hora a 37°C, se enjuagan 3x por 15 minutos en PBS, se incuban con Streptavidina-fluoresceína (AMERSHAM) 1:200 en PBS por 1 hora a 37°C. Las muestras se enjuagan en agua desionizada, los cubreobjetos se montan en portaobjetos con Gelvatol (Sigma) que contiene DABCO (Sigma) como agente anti-decaimiento.

#### **4). MICROSCOPIA CONFOCAL.**

Para la obtención de imágenes por microscopia Confocal se usó un microscópio NIKON diaphot. Para adquirir imágenes de fluorescencia, se ocupó un filtro de 480 nm y otro de 560 nm; para imágenes de ioduro de propidio y rodamina. Las imágenes se capturan en una computadora utilizando el programa COMOS de BIORAD. Posteriormente se filtran y se procesan con el programa Voxelview, en una computadora Indigo de silicón Graphics. Las imágenes se almacenaron en discos ópticos reescribibles de 1GB.

## **XI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tanto las células MDCK como las neuronas fueron cultivadas con las condiciones descritas en metodología. Para determinar las condiciones óptimas de transfección utilizamos inicialmente al vector reportero pGREEN, que induce la expresión de una proteína verde fluorescente, que se difunde a lo largo del citoplasma y por lo tanto revela la forma de la célula transfectada. Variamos condiciones como la concentración del plásmido, el tiempo de incubación con el medio de transfección, la edad del cultivo, la densidad celular y el tiempo de fijación después de la transfección, observando el porcentaje de neuronas transfectadas en cada caso.

En las MDCK las mejores eficiencias de transfección se lograron sembrando las células al 60% de confluencia 24 horas sobre cubreobjetos de vidrio y en cámaras de 24 pozos. Siguiendo el procedimiento de transfección por lipofectamina que se describe en metodología, se obtuvieron eficiencias de 20 a 30%, utilizando 1.5 microgramos por pozo de plásmido, e incubando las células por dos horas con el plásmido antes de cambiar a medio completo. El tiempo de incubación después de la transfección fue de 24 y 48 horas, sin embargo no se observaron diferencias en la intensidad de la expresión, por lo que se tomó como estándar para las cotransfecciones con los plásmidos que contienen canales iónicos 24 horas.

En las neuronas la eficiencia de transfección, así como el porcentaje de supervivencia depende críticamente del tiempo en incubación en el medio de transfección porque, si bien a medida que se incrementa este tiempo, también

se incrementa el número de neuronas transfectadas, la ausencia de suplementos y la presencia misma de los liposomas deteriora rápidamente las neuronas. El menor tiempo en el que se ve transfección es desde 30 minutos, sin embargo, a este tiempo la eficiencia es tan baja como el 0.005%, a las dos horas la eficiencia es de 0.05% y a las tres de 1 a 2%. Posteriormente la densidad y viabilidad de las neuronas decrece sensiblemente y las neuronas que expresan pGREEN aparecen degradadas, solo observándose rastros de procesos discontinuos. Así, el tiempo óptimo que encontramos fué de 2.5 horas. En vista de que nuestro objetivo es determinar la distribución de proteínas transfectadas, la densidad de cultivo ideal fué aquella en la que las neuronas estuvieron tan aisladas que se podían distinguir todos sus procesos. Sin embargo, la supervivencia de las neuronas y su morfología se afectan gravemente por debajo de 250 células/mm<sup>2</sup>. Esto, aunado a que la eficiencia de transfección mas alta es de apenas de 1% hace muy difícil, si no imposible, lograr transfectar neuronas aisladas. Por esta razón, para estudiar la distribución de canales transfectados hicimos cotransfecciones, mezclando el plásmido pGREEN con el plásmido que contiene al canal iónico. De este modo, alguna de las neuronas incorporaron simultaneamente ambos plásmidos y la expresión de la proteína verde fluorescente (PVF) revela la morfología de la neurona, mientras que el empleo de rodamina en la inmunocitoquímica revela la expresión del canal. Encontramos una eficiencia máxima de transfección al usar 1.2 µg de plásmido para un pozo de una cámara multiwell de 24 (12 cm<sup>2</sup> aproximadamente) y una densidad celular de 4000 células/mm<sup>2</sup>. Para las

cotransfecciones utilizamos 1.2  $\mu$ g de cada plásmido por cubreobjetos. En cuanto al tiempo de expresión después de la transfección, a tiempos tan cortos como dos horas ya se observa expresión de PVF en algunas neuronas, en el lapso entre 24 y 48 horas hay una máxima proporción de neuronas teñidas, y a tiempos posteriores empieza a ser notable la degradación que sufren algunas neuronas que están expresando PVF. Por esta razón seleccionamos el tiempo de 24 horas para determinar la expresión de los canales iónicos en experimentos de cotransfección. Finalmente, si bien los protocolos de cultivo indican 18 días como el tiempo óptimo de gestación para obtener condiciones adecuadas de cultivo de neuronas, en nuestra experiencia encontramos que desde los 16 días y hasta recién nacidos, producen cultivos con características similares, y la eficiencia de transfección no pareció depender críticamente del tiempo de gestación, en el rango de 18 días a recién nacidas.

**a) Expresión de canales de potasio dependientes de voltaje.** Utilizando las condiciones experimentales que optimizaron la eficiencia de transfección hicimos cotransfecciones con los diversos canales iónicos:

**RCK1** es un canal de potasio dependiente de voltaje que produce corrientes de activación tardía y se expresa en cerebro de rata (Beckv y Pongs, 1990), el plásmido que contiene RCK1 fué donado por el Dr. Olaf Pongs y la secuencia confirmada por análisis de restricción. Para reconocer la expresión de la proteína se utilizó un anticuerpo policlonal desarrollado por el Dr. William Thornhill de Mount Sinai Medical Center, NY. La especificidad del anticuerpo fué probada en inmunocitoquímica y western blotting de células HEK293 transfectadas con el

plásmido pcDNA3-RCK1 (datos no mostrados). Las neuronas transfectadas con **RCK1** expresan esta proteína predominantemente en el dominio de membrana del soma. La Figura 1. Muestra una imagen representativa. La tinción roja alrededor del soma indica una expresión membranal. De las neuronas transfectadas, aproximadamente un 20% expresaron ambas proteínas y de estas un 60% mostraron el patrón somático, el resto presentaban tinción intracelular. Las células MDCK transfectadas con éste canal expresan su proteína preferentemente en la membrana, en la porción basolateral, como se muestra en la Figura 1. Estos resultados de RCK1 sugieren que en la porción del marco abierto de lectura de RCK1 existe una señal que envía la proteína hacia la membrana del soma en neuronas y a la cara basolateral en MDCK.

**Kv3.1b** es una variante de splicing de ún gene que codifica para canales de potasio tipo Shaw (Luneau y col., 1991) y produce corrientes sostenidas. Se encuentra exclusivamente distribuido en el cerebro, predominantemente en el cerebelo y en el colículo inferior (Vega-Saenz de Miera y col., 1994). Si bién se ha descrito que las neuronas de hipocampo expresan endogenamente Kv3.1b, nosotros no detectamos expresión endógena de Kv3.1b en las neuronas cultivadas. Al transfectar Kv3.1b obtuvimos eficiencia similar a la descrita anteriormente para RCK1, sin embargo, la proteína no se expresó en la membrana, sino que permaneció confinada al citoplasma en el soma, cómo se puede apreciar en la Figura 1. La tinción amarilla que se ovserva es por la sobreposición del color verde que corresponde a la proteína verde (PVF) con el rojo de la rodamina. El mismo resultado se obtuvo de un total de 34 neuronas

transfectadas, incluso a las 48 horas después de la transfección. Sin embargo, descartamos la posibilidad de que se deba a defecto en la construcción del plásmido, pues al transfectar células HEK293 con la misma construcción sí obtenemos expresión membranal (datos no mostrados). En las **MDCK** aproximadamente 40% de las células cotransfectadas mostraron expresión intracelular similar a la descrita para las neuronas, sin embargo un número menor de células, un 5% de ellas mostraron expresión membranal como se muestra en la Figura 1.

**Kv3.2b** es otro tipo canal tipo Shaw que se expresa en el cerebro de rata, predominantemente en el talamo, produciendo corrientes sostenidas cuando mRNA es inyectado en ovocitos de rana (Vega Senz de Miera et al, 1994). Kv3.2 produce cuatro variantes por splicing alternativo (Kv3.2a, b,c y d). Cuando estas variantes fueron transfectadas en células epiteliales en cultivo (MDCK) se expresaron diferencialmente en la membrana Figura 1 **Kv3.2b** se expresó basolateralmente, mientras que el resto lo hicieron apicalmente (Ponce y col., 1995). Hasta ahora solo hemos transfectado las neuronas de hipocampo en cultivo con **Kv3.2b**, sin embargo la expresión observada parece ser intracelular como se puede observar en la Figura 1.

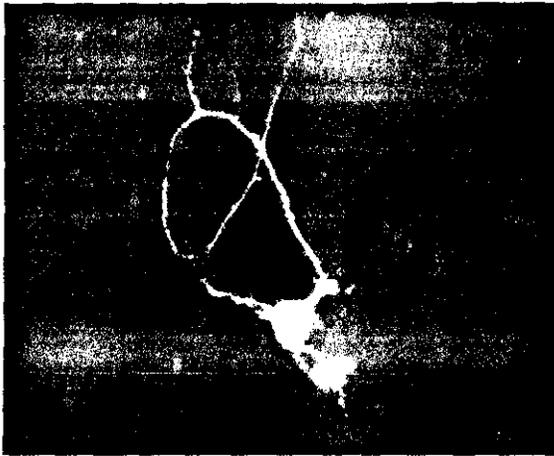
El último tipo de canal de potasio dependiente del voltaje que transfectamos es **Kv3.4**, otro miembro de la familia tipo Shaw de rata, que se expresa menos abundantemente que los otros Kv3 en cerebro de rata, y produce corrientes inactivantes, cuando se expresa en ovocitos de rana. **Kv3.4** se expresa solo

intracelularmente cómo se muestra en la Figura 2. Similarmente, en las células MDCK. Kv3.4 se expresa solo en dominios intracelulares Figura 2.

**b) Expresión de canales de potasio rectificadores entrantes dependientes de proteína G GIRK.**

GIRK1 se expresa endogenamente en el cerebro, predominantemente en el bulbo olfatorio y en el hipocampo, neocorteza, tálamo y corteza cerebelar y en las distintas regiones del cerebro **GIRK1** se expresa en distintas subregiones de las neuronas (Ponce y col, 1996). En las neuronas cultivadas no detectamos sin embargo expresión endógena de manera similar a los otros canales, un 20% de las neuronas transfectadas incorporaron simultáneamente el plásmido de PGREEN y el plasmido de **GIRK1**. Sin embargo, en estas condiciones la expresión de **GIRK1** fué intracelular. En algunas neuronas la proteína sin embargo, no solo se confina al soma sino que se distribuye hacia el axón como se muestra en la Figura 2, aunque no hay evidencia clara de que se exprese en la superficie membranal. En algunas células MDCK se pudo observar que **GIRK1** se expresa en el dominio basolateral de la membrana como se aprecia en la Figura 2.

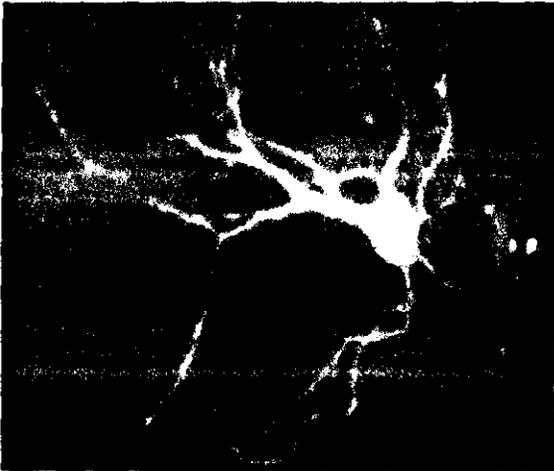
**GIRK2** también se expresa predominantemente en el cerebro, sobre todo en septum, capa granular del cerebelo, amígdala y sustancia nigra pars compacta (Murer y col., 1997). Las neuronas transfectadas con **GIRK2** también mostraron una expresión intracelular confinada en el soma, como se muestra en la Figura 2. En las células MDCK **GIRK2** no se observó en la membrana plasmática, y se quedó confinado a compartimientos intracelulares (Figura 2).



RCK1



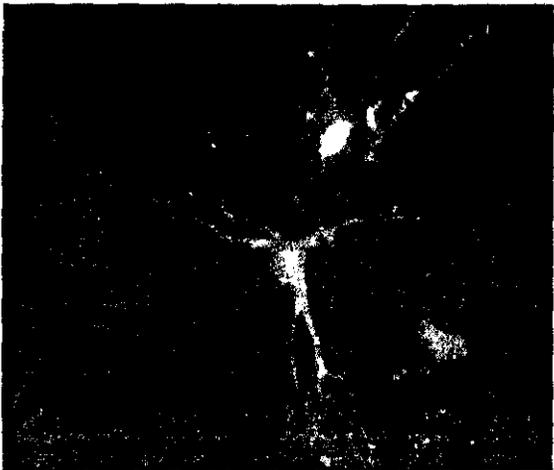
RCK1



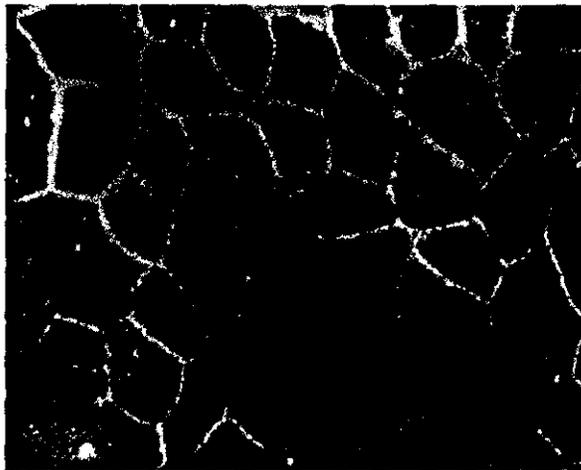
Kv3.1b



Kv3.1b

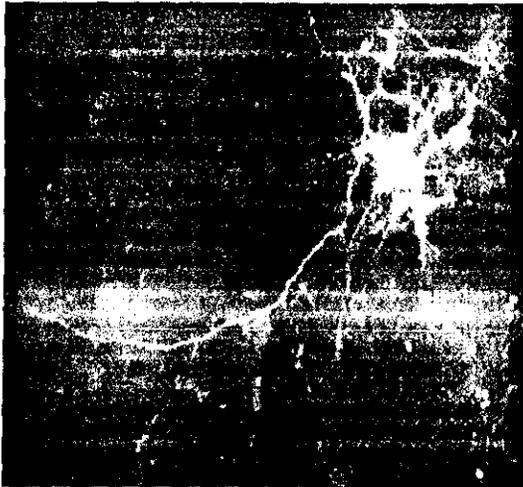


Kv3.2b



Kv3.2b

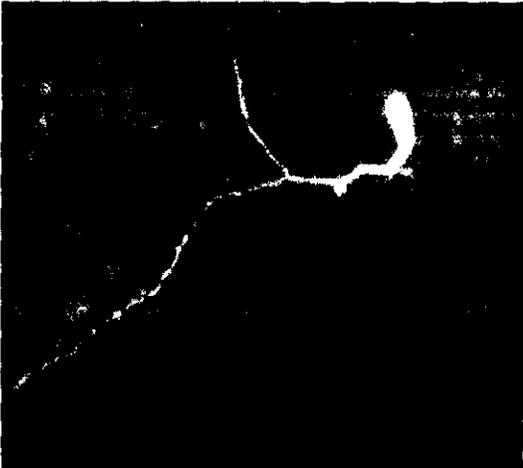
Figura 1. En la columna izquierda se muestra una serie de neuronas transfectadas con los canales que aparecen en la parte inferior de cada imagen. En la columna derecha transfecciones con los mismos canales en células MDCK.



Kv3.4



Kv3.4



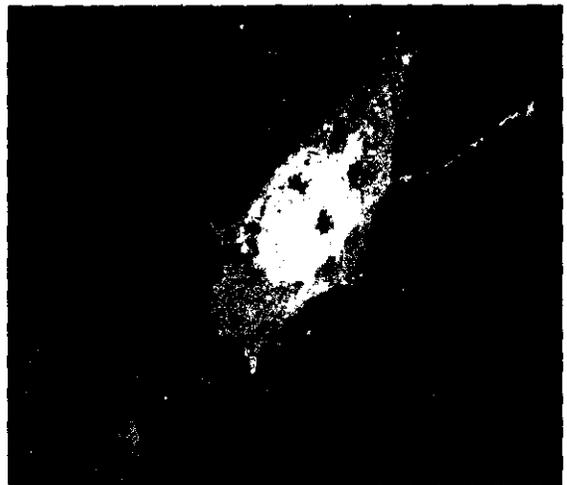
Kv3.4



Kv3.4



GIRK2



GIRK2

Figura 2. En la columna izquierda se muestra una serie de neuronas transfectadas con los canales que aparecen en la parte inferior de cada imagen. En la columna derecha transfecciones con los mismos canales en células MDCK.

## XII. CONCLUSION.

Un aspecto importante de la fisiología celular y molecular es entender las señales y mecanismos involucrados en el envío localizado de componentes de membrana, como canales iónicos, a dominios específicos en donde estos realizan su función. Esto es particularmente interesante en las neuronas, donde los canales iónicos son cruciales para las propiedades de excitabilidad. Para saber si los canales iónicos tienen señales de direccionamiento dentro de la secuencia de cDNA, transfectamos neuronas de hipocampo en cultivo primario y células epiteliales MDCK con diferentes canales iónicos. Sin embargo, a excepción de RCK1, un canal de potasio de rectificación tardía, los demás tipos de canales se expresaron intracelularmente, probablemente porque carecen de una señal de direccionamiento o porque el mecanismo neuronal o epitelial no es capaz de interpretar la señal de identidad, que podría ser válida para otro tipo de células. También es posible que el tiempo necesario para que los canales alcancen su ubicación final sea más de 24 horas, que fue el lapso en que fijamos las células para estudio inmunocitoquímico. En el futuro planeamos hacer construcciones químeras, incorporando la secuencia de la proteína verde (PVF) en la región amino-terminal de los canales, a fin de observar en tiempo real e *in vivo* la expresión de las subunidades de canales iónicos y su distribución.

### XIII. BIBLIOGRAFIA

Amsler K y Cook JS. Development of Na-dependent hexose transport in a cultured line of porcine kidney cells. *Am J. Physiol.* **242**:C94-C101.1982.

Balada, M.S, Gonzáles-Mariscal, L, Matter, K. Cereijido, M, and Anderson,J.M. 1993. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J. Cell Biol.* **123**:293-302.

Balcarova-Stander J, Pfeiffer SE, Fuller SD, Simmon K. Development of cell surface polarity in the epithelial Madin Darby canine kidney (MDCK) cell line. *EMBO J.* **3**:2687-2694. 1984.

Barriere H, Chambard M, Mauchap J, Gabrion J, Nguyen TD, Mercier B y Depetris D. Polarity reversal of inside-out thyroid follicles cultured within collagen gel: an ultrastructural study. *Biol Cell.* **57**:39-52. 1986.

Bartles JR, Feracci HM, Stieger B, Hubbard AL. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane *in vivo*: comparison of the pathwaystaken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J Cell Biol.* **105**:1241-1252.1987.

Brandtzaeg P. Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components: differential localization of free and bound SC in secretory epithelial cells. *J Immunology*. 112:1553-1559.

Brown D, Hirsch S y Gluck S. An H<sup>+</sup>-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. *Nature*. 331:622-624. 1988.

Caplan MJ, Anderson HC, Palade GE, Jamieson JD. Intracellular sorting and polarized cell surface delivery of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) ATP-ase, and endogenous component of MDCK cells basolateral plasma membranes. *Cell*. 46:623-631. 1986.

Cereijido M, Ehrenfeld J, Meza I, Martínez-Palomo A. Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J Membr Biol*. 52:147-159. 1980.

Covarrubias M, Wej AA, Salkoff L. Shaker, shal,shab and shaw express independent k<sup>+</sup> current systems. *Neuron*. 1991.Nov.7(5):763-73.

Cooper EC, Jan LY, 1999. Ion channel genes and human neurological disease Recent progress, prospects and challenges. *PNAS* (96) 4759-4766.

Chambard M, Barriere B, Gabrion J, Mauchamp J. Polarity reversal of inside-out thyroid follicles cultured within collagen gel: reexpression of specific functions. *Biol Cell*. 51:315-325.

Contreras RG, Avila G; Gutierrez C, Bolivar JJ, Gonzalez-Mariscal L, Darzon A, BeatyG, Rodriguez-Boulan E, Cereijido M. Repolarization of Na-K Pumps during establishment of epithelial monolayers. *Am J. Physiol.* 257:C896-905. 1989.

Desnuelle P. Intestinal and renal aminopeptidase: A model of a transmembrane protein. *Eur J Biochem.* 101:1-11.1979.

Dotti CG, Parton RG, Simons K. Polarized sorting of glypiated proteins in hippocampal neurons. *Nature.* 349:158-161. 1991.

Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS. Membrane asymmetry in epithelia: Is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane. *Nature.* 294:718-722. 1981.

Fujita M, Matsui M, Nagano K, Nakao M. Asymmetric distribution of ouabain-sensitive ATPase activity in rat intestinal mucosa. *Biochem. Biophys. Acta.* 274:336. 1972.

Gmaj P, Murer H, Kinner K. Calcium ion transport across plasma membranes isolated from rat kidney cortex. *Biochem J.* 178:253-256. 1979.

Gonzalez-Mariscal L, Chavez de Ramirez B, Cereijido M. Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol.* 86:113-125. 1985.

Green R, Meiss HK, Rodríguez-Boulán EJ. Glycosilation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J Cell Biol.* 89:230-239. 1981.

Griffiths, G.; Fuller, S.D. Bak, R, Hollinshead, M. Pfeiffer, S. And Simons, K. 1989. The dynamic nature of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 108:277-297.

Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J cell Biol.* 107:1575-1588.1988.

Gumbiner, B. And Simons, K. 1986. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: Identification of an uvomoruline-like peptide. *J. Cell Biol.* 96:693-702.

Hauri HP, Quaroni A, Isselbacher KJ. *Proc Natl Acad Sci USA.*76:5183-5186.1979.

Hille B. Ion channel of excitable membranes. Second edition. Sinauer Associates inc., 1992.

Hubbard, A. J. 1989. Endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:675-683.

Hunziker, W, Harter, C, Matter, K, and Mellman, I. 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66:907-920.

Immhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, Birchmeier W. Cell-cell Interaction and polarity of epithelial cells: Specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell*.35:667-675.1983.

Kerjaschki D, Noronha-Blob L, Sacktor B, Farquha MG. Microdomains of distinctive glycoprotein composition in the kidney proximal tubule brush border. *J Cell Biol*. 98:1505-1513. 1984.

Kinne R, Murer H, Kinne-Saffran E, Thees J, Sach G. Sugar transport by renal plasma membrane vesicles: characterization of the system in the brush-border microvilli and basolateral plasma membranes. *J Membr Biol*. 21:375-395. 1975.

Koefoed-Johnson V, Ussing HH: The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand*. 42:298-308.1958.

Kohrmann M, Haubensak W, Hemraj I, Kaeter C, Lessmann VJ, Kiebler MA. Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons. *J. Neurosci Res*. 1999. Dec 15;58(6):831-5.

Lamb Jf, Ogden P, Simmons NL. Autoradiographic localization of H-Ouabain bound to cultured epithelial cell monolayers of MDCK cells. *Biophys Acta*. 644:333-3400. 1981.

Le Grimelle C, Friedlander G, Giocondi MC. Asymmetry of plasma membrane lipid order in Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol.* 255:F22-F32. 1988.

Le Bivic, A, Sambuy, Y, Mostov, K. And Rodriguez-Boulau, E. 1990. Vectorial targeting of an endogenous apical membrane sialoglycoprotein and uvomorulin in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 110:1533-1539.

Lewis SA, Eaton DC, Diamond JM. The mechanism of de Na<sup>+</sup> transport by rabbit urinary bladder. *J Membr Biol.* 28: 41-50. 1976.

Lisanti MP, Sargiacomo M Graeve L, Saltiel AR, Rodriguez-Boulau E. Polarized apical distribution of glycosil-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:9557-9561. 1980.

Louvard D. Apical membrane aminopeptidase appears at sites of cell-cell contact in cultured epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:4132-4136. 1980.

Low MG, Saltiel AR. Structural and functional roles of glycosil-phosphatidylinositol in membranes. *Science.* 239:268-275. 1988.

Massey D, Feracci H, Gorvel JP, Rigal A, Souline JM, Maroux S. Evidence for the transit of aminopetidase N through the basolateral membrane before it reaches the brush border of enterocytes. *J Membr Biol.* 96:19-25. 1987.

Matlin KS, Baiton D, Pesonen M, Genty N, Louvard D, Simons K. Transfer of a viral envelope glycoprotein from the apical to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. I. Morphological evidence. *J Cell Biol.*97:627-637. 1983.

Matsuura S, Nakada H, Sawamura T, Tashino Y. Distribution of an asialoglycoprotein receptor on rat hepatocytes cell surface. *J Cell Biol.* 95:864-875. 1982.

Maurice M, Rogier E, Cassio D, Feldmann G. Formation of plasma membrane domains in rat hepatocytes and hepatoma cell lines in culture. *J Cell Sci.* 90:79-92. 1988.

McQueen N, Nayak DP, Stephens EB, Compans RW. Polarized expression of achineric protein in which the transmembrane and cytoplasmic domains of the influenza virus hemagglutinin have been replaced by those of the vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:9318-9322. 1986.

Mills JW, Ernst SA. Localization of sodium pump sites in frog urinary bladder. *Biochem Biophys Acta.* 375:268-273. 1975.

Mostov KE, Kraehenbuhl JP, Blobel G. Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and larger transmembrane forms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:7257-7261. 1980.

Mullin JM, Weibek J, Diamond L, Kleinzeller A. Sugar transport in the LLC-PK1 renal epithelial cell line: similarity to mammalian kidney and the influence of cell density. *J Cell Physiol.* 104:375-389. 1980.

Murer G, Aldelbrecht C, Lauritzen I, Lesage F, Lazdunski M, Agid Y, Raiman-vozari R. An Immunocytochemical study on the distribution of two G-protein-gated Inward rectifier potassium channels (GIR2 and GIRK4) in the adult rat brain. *Neuroscience.* 1997. Sep;80(2):345-57.

Nelson WJ, Veshnock PJ. Ankyrin binding to (Na/K) ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. *Nature.* 328:533-536. 1987.

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

Ojakian Gk, Schwimmer R. The polarized distribution of an apical cell surface glycoprotein is maintained by interactions with the cytoskeleton of Madin- Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 107:2377-2387. 1988.

Parr EL, Kirby WN. An immunoferritin labeling study of H-2 antigens on dissociated epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 27:1327-1336. 1979

Papazian, D. M, Schwarz, T. L, Tempel, B. L, Jan, Y. N, and Jan, L. Y. 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237:749-753.

Patzak A, Winkler H. Exocytic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabeling. *J Cell Biol.* 102:510-515. 1986.

Ponce A, Bueno E, Kentros C, Vega-Saenz de Miera E, Chow A, Hillman D, Chen S, Liangxue Z, Wu M, Wu X, Rudy B, and Thornhill. G-protein-gated inward rectifier K channel proteins (GIRK1) are present in the soma and in the dendrites, as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain. *Journal of neuroscience.* 16:1990-2001. 1996.

Ponce A, Vega-Saenz de Miera E, Kentros C, Moreno H, Thornhill B, Rudy B. K channel subunit isoforms with divergent Carboxy-terminal sequences carry distinct membrane targeting signals. *J Membr Biology.* 159. 1997.

Quinton PM, Tormey JM. Localization of Na/K ATPase sites in the secretory and reabsorptive epithelia of perfused exocrine sweat glands: A question as to the role of the enzyme in secretion. *J Membr Biol.* 29:383-399. 1973.

Rabito CA, Karish MV: Alkaline phosphatase and T-glutamyltranspeptidase as polarization markers during the organization of LLC-Pk1 cells into an epithelial membrane. *J Biol Chem.* 59: 574-582. 1984.

Rabito CA, Karish MV, Polarized amino acid transport by an epithelial cell line of renal origin (LLC-PK1) the apical system. *Biol Chem.* 258:2543-2547. 1983.

Reik L, Petzold GL, Higgins JA, Greengard P, Bannet RJ. Hormone sensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver. *Science* 168:382-386. 1970.

Rindler MJ, Ivanov IE, Plesken H, Sabatini DD, Polarized delivery of viral glycoproteins to the apical and basolateral plasma membranes of Madin-Darby canine Kidney cells infected with temperature sensitive viruses. *J Cell Biol.* 100:136-151.1985.

Rodriguez-Boulán EJ, Sabatini D.D. Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for the study of epithelial cell polarity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:5071-5075.1978.

Rodriguez- Boulán E. Membrane biogenesis, envelope RNA viruses and epithelial polarity. In: *Modern Cell Biology.* B. Stair, editor. Pp 119-170. Alan liss, New York. 1983.

Rodríguez-Buolán, E, Paskiet, K.T, and Sabatini, D:D: Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby Canine Kidney Cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J Cell Biol.* 96:866-874.1983.

Rodríguez-Boulán, E, and Nelson, J. 1989. Morphogenesis of epithelial phenotype. *Science.* 245:718-724.

Roth MG; Gundersen D, Patil N, Rodríguez-Boulán E. The large external domain is sufficient for the correct sorting of secreted or chimeric influenza virus hemagglutinins in polarized monkey kidney cells. *J Cell Biol.* 104: 769-782.1987.

Scheiffele, P, Peranen, J. And Simons K. 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature.* 378:96-98.

Salas PJI, Misek DE, Vega-Salas DE, Gundersen D, Cereijido M, Rodríguez Boulán E. Microtubules and actin filaments are not critically involved in the biogenesis of epithelial cell surface polarity. *J Cell Biol.* 102:1853-1867.1986.

Simmons K, Fuller SD. Cell surface polarity in epithelial. *Ann Rev Cell Biol.* 1:243:288.1985.

Taylor Z, Emmanouel DS. Insulin binding and degradation by luminal and basolateral tubular from kidney. *J Clin Invest* 69: 1136-1146.1982.

Tao H, Zhang LI, Big, Poo M. Selective presynaptic propagation of long-term potentiation in defined neural networks. *J. Neurosci.* 1999. May. 1:20(9):3233-44.

Weibel ER. Stereological approach to the study of cell surface morphology. *Eur Congr Electron Microsc.* Jerusalem: 6-9. 1976.

Wolfram S, Giering H, Scharrer E. Na<sup>+</sup> gradient dependence of basic aminoacid transport into rat intestinal brush border membrane vesicles. *Comp Biochem Physiol.* 78<sup>a</sup> :475-480.1984.

Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+and B27-Supplemented neurobasal medium. *Free Radic Biol. Med.* 1998 Mar 1;28(5):665-72.