

11261
lej
1

**MECANISMOS DE POLARIZACION DE LA Na-K-ATPasa DE LAS
CELULAS EPITELIALES.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
BIOMICAS (BIOLOGIA MOLECULAR) PRESENTA EL ALUMNO:

RUBEN GERARDO CONTRERAS PATIÑO.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION,
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO D.F., 1988.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

CONTENIDO.

	Pagina
CONTENIDO -----	3
RESUMEN -----	4
PROLOGO -----	6
INTRODUCCION -----	9
METODOS -----	19
RESULTADOS -----	25
DISCUSION Y CONCLUSIONES -----	44
BIBLIOGRAFIA -----	49
APENDICE -----	60

RESUMEN.

En esta tesis se demuestra que la polarización apico/basal de las proteínas de membrana, además de deberse al mecanismo (ya conocido) de inserción direccionada, incluye otro que quita a las proteínas mal ubicadas. Como en la enorme mayoría de las células epiteliales, las MDCK tienen su Na-K-ATPasa distribuida exclusivamente en su membrana basolateral. Sin embargo, cuando son sembradas a confluencia y mantenidas 20 horas sin Ca^{++} carecen de uniones estrechas (UE) que delimiten la región apical de la basolateral, y su Na-K-ATPasa se encuentra homogéneamente distribuida por toda la membrana plasmática. Al agregar Ca^{++} a la hora 20, las UE se forman rápidamente y, al mismo tiempo, se desarrolla una resistencia eléctrica transepitelial que alcanza valores de alrededor de 100 $\Omega \cdot cm^2$ en 2 horas, y 289 $\Omega \cdot cm^2$ en 4-6 horas. La fijación específica de 3H -ouabaina demuestra que una fracción importante de la Na-K-ATPasa queda así atrapada en la cara apical. Pero, a partir de este momento, y a pesar de la barrera a la difusión constituida por la UE, la enzima es paulatinamente quitada de esta región. Simultáneamente, la cantidad de Na-K-ATPasa en la cara basolateral se incrementa, pero este incremento es significativamente mayor que la cantidad quitada de la apical, sugiriendo que se debe a la incorporación de enzima del interior celular. Esta incorporación se evita con cicloheximida (10 $\mu g/ml$), indicando que las Na-K-ATPasas agregadas requieren

ser sintetizadas de novo. También se bloquea con cloruro de amonio 10 mM, con primaquina 20 μ M o con cloroquina 10 μ M, sustancias que inhiben la exocitosis. Por lo tanto, la polarización, además de comprender la inserción vectorial de proteínas (mecanismo que demostraron otros autores durante la realización de esta tesis), involucra un mecanismo que quita componentes ubicados en sitios incorrectos. Estimo que tal mecanismo puede jugar un papel fundamental después de la mitosis, en el desplazamiento y migración de las células, y en todo otro proceso en el que las células deban quitar momentáneamente la estrecha unión célula-célula que las ancla a sus vecinas y que, al mismo tiempo, demarca el límite apical/basolateral celular. Me resulta pertinente señalar además que otras células no epiteliales (por ejemplo las neuronas) muestran también una distribución zonal de sus proteínas de membrana, y que el mecanismo que aquí demuestro puede también cuidar de que no "escapen" de los lugares debidos.

PROLOGO.

Los iones suelen tener concentraciones distintas a ambos lados de las membranas celulares. Las razones de esta asimetría son diversas. Así por ejemplo, muchos polielectrolitos del tipo de las proteínas o de los ácidos ribonucleicos, se distribuyen asimétricamente debido a que no son capaces de atravesar la membrana celular y alcanzar un equilibrio. En el caso de cloro, en cambio, la asimetría se debe a que el interior celular es eléctricamente negativo con respecto al exterior, y eso hace que, obedeciendo la ecuación de Nernst, la concentración de este ión sea mucho más baja en el citoplasma que en líquido extracelular. Pero hay otros iones cuyas diferencias de concentración no pueden explicarse en base a sus permeabilidades ni al gradiente de potencial electroquímico a ambos lados de la membrana. Este sería el caso del potasio, cuya concentración intracelular está muy por encima de la extracelular, y del sodio cuya distribución es justamente la opuesta. Fue para explicar la distribución de estos dos iones que primero se postuló y más tarde se encontró lo que se ha dado en llamar "la bomba de sodio y potasio".

Tal como se detalla en la introducción, la bomba que capta potasio y quita sodio del citoplasma se identifica hoy con la enzima de membrana Na-K-ATPasa (ATP fosfohidrolasa Na⁺,K⁺-activada. EC 3.6.1.3)

Mientras que las Na-K-ATPasas de una célula común, por ejemplo las de un glóbulo rojo o de un linfocito, están distribuidas homogéneamente sobre toda la superficie de la membrana, las de las células epiteliales suelen acumularse en un polo, generalmente el basolateral. Gracias a esta asimetría, los epitelios pueden transportar sustancias vectorialmente. Si las células epiteliales no tuvieran esa asimetría, la absorción intestinal, la función hepática, la función renal, etc. serían imposibles.

A pesar de su importancia, hoy no se sabe por qué, ni cómo, ni en qué momento las células epiteliales adquieren esta distribución asimétrica de sus bombas de sodio y potasio. Una de las hipótesis más aceptadas es que esta asimetría arranca del momento mismo en que son sintetizadas las Na-K-ATPasas, puesto que postula que el proceso de síntesis de proteínas tiene un último paso en el que estas se transportan e insertan ya sea en la cara apical, o bien en la basolateral. Hoy se está muy lejos de comprender bien este proceso, pues no se sabe cuál es la señal que permite al aparato de distribución discriminar entre uno y otro tipo de proteína, ni de qué forma se las lleva hacia el dominio apical o hacia el basolateral.

La organización de esta tesis es la siguiente. Primero introducimos la información concerniente a la bomba y a la Na-K-ATPasa que nos permita plantear los aspectos a que nos referimos

en los párrafos anteriores. En seguida describimos los métodos generales, sin entrar por ello en los protocolos particulares de los diversos estudios realizados, que hemos preferido postergar hasta los momentos pertinentes. Luego presentamos los resultados y, finalmente, ennumeramos de manera sucinta nuestras conclusiones.

Si bien los resultados obtenidos son claros y demuestran sin ambigüedad los fenómenos que encaramos, nuestra línea de investigación sobre la Na-K-ATPasa continúa siendo fértil, quedando por investigar muchas consecuencias. A pesar de ello, dada la cortedad del período para realizar mi maestría, y que el propósito de ésta consiste fundamentalmente en demostrar que uno se ha capacitado para encarar un problema, dominar el andamiaje conceptual, manejar las técnicas correspondientes y obtener resultados, he seguido las directivas de mi tutor de presentar los datos obtenidos hasta ahora. Cabe señalar que estos datos ya han sido presentados a congresos (Soc. Mex. de Ciencias Fisiológicas y American Soc. for Cell Biol.) y están siendo enviados para su publicación al Journal of Cell Biology.

INTRODUCCION.

Los organismos superiores intercambian materia con el medio a través de los epitelios. Las células epiteliales se unen entre sí mediante los complejos de unión formando capas que impiden la difusión y que son capaces de transportar sustancias unidireccionalmente. La característica que confiere a estas células la función de transporte vectorial de sustancias es la polarización de sus membranas plasmáticas en un dominio apical y otro basolateral (Cerejido et al, 1978). Estos dominios, que tienen propiedades estructurales, bioquímicas y fisiológicas diferentes, están separados por la unión estrecha, circunstancia que ha llevado a sospechar que esas uniones y la polarización podrían estar asociadas. Algunas líneas celulares cultivadas retienen un grado considerable de distribución polarizada de microvello, partículas intramembranales, enzimas, antígenos, y receptores hormonales (Turner et al, 1985; Rodríguez-Boulian et al, 1984; Richardson y Simons, 1979; De Camilli et al, 1974; Cerejido et al, 1980; Lamb et al, 1981; Rabito, 1984; Hertzlinger y Ojakian, 1984; Fuller y Simons, 1986). También, los movimientos de iones a través de las células MDCK son operados por mecanismos que están distribuidos polarizadamente sobre sus membranas: (1) una Na-K-ATPasa basolateral (Rabito y Tchao, 1980; Cerejido et al, 1980; Lamb et al, 1981; Barker et al, 1978; Cerejido et al, 1981a; Fernández-Castelo et al, 1985; Cerejido et al, 1985; Bolívar et al, 1987); (2) un cotransportador Na^+ , H^+ apical (Cerejido et al, 1981a;

Rindler y Sater, 1984), (3) un cotransportador $2Cl^- + Na^+ + K^+$ basolateral (McRoberts et al, 1982; Rindler et al, 1982; Sater y Boyden, 1984); (4) un mecanismo basolateral de eflujo de K^+ que puede ser estimulado por epinefrina (Brown y Simons, 1982); (5) un canal de K^+ voltaje-dependiente sensible a Ca^{++} probablemente localizado en el lado apical (Bolívar y Careñido, 1987); y (6) un canal apical de Cl^- sensible al voltaje (Sater y Boyden, 1984).

En vista de que la célula tiene regiones de composición distinta, debe realizar un intenso tráfico intracelular que permita a las proteínas sintetizadas llegar a realizar sus funciones a multitud de sitios distintos en la misma célula. Esto evidencia la existencia de un mecanismo que reconoce, separa y envía las proteínas a sus respectivos destinos. Para las proteínas secretorias e integrales de membrana tanto del RE, Golgi y lisosomas como de la membrana plasmática, se ha establecido que la primera separación ("sorting") ocurre cuando la cadena polipeptídica naciente se inserta en la membrana del RE (Blobel y Dobberstein, 1975a,b; Hortsch, Vanessa y Meyer, 1986). La región amino terminal del polipeptido recién sintetizado, posee una secuencia señal donde se une la partícula reconocedora de la señal (SRP, Walter y Blobel, 1980), provocando que la elongación del polipeptido se detenga y que el complejo ribosoma-polipeptido-SRP pueda a su vez unirse al receptor de la SRP, localizado en la membrana del RE (Meyer y Dobberstein, 1980). Se propone que la secuencia de aminoácidos y el arreglo

tridimensional de esta señal, determinan que la proteína en síntesis sea incorporada a la membrana o translocada al lumen del RE. Las proteínas incorporadas son separadas después y, las destinadas a la membrana plasmática, deben reconocer el dominio que les corresponde. Esto sucede con las proteínas endógenas y con las externas. Rodríguez-Boulán y Sabatini (1978) demostraron que en las células epiteliales, los virus gema polarizadamente. El virus de la influenza (FLU), por ejemplo, gema por la membrana apical y el de la estomatitis (VSV) por la basolateral. Las proteínas G del virus VSV y la hemaglutinina (HA) del FLU, localizadas en la envoltura externa, se acumulan durante la infección temprana solo en el dominio por donde gema el virus (Rodríguez-Boulán y Pendergast, 1980; Roman y Garoff, 1985), independientemente de la glicosilación (Green et al, 1981) y de la presencia de las otras proteínas virales (Roth et al, 1983). Esto indica que la señal para el "sorting" se encuentra en la misma proteína. Tratando de encontrar esta señal se han construido proteínas quiméricas donde los principales dominios que las constituyen (intracitoplásmico, transmembranal y extracitoplásmico) se han quitado o intercambiado. Algunos de estos resultados indican que la señal puede localizarse en el dominio extracitoplásmico (Roman y Garoff, 1986; McGeen et al, 1986; Roth et al, 1987), si bien otros resultados lo contradicen (Gonzalez et al, 1987). En su tránsito a la membrana plasmática las proteínas HA y G siguen la misma ruta hasta las últimas cisternas del *trans* Golgi (Rindler et al, 1984; Fuller et al, 1985), y probablemente sean sorteadas en el compartimento

siguiente, llamado red tubular del *trans* Golgi (Hughson et al, 1987; Griffiths y Simons, 1986).

El desarrollo de la polarización en células epiteliales recién sembradas ocurre simultáneamente con el desarrollo de las uniones estrechas (González-Mariscal et al, 1985b; Hoi Sang et al, 1980). Cuando se quita el Ca^{++} del medio cultivo de células epiteliales, o se le adicionan drogas para quelarlo, la unión estrecha se abre, se rompe en fragmentos, es endocitada (Mendolesi et al, 1978; Piteika et al, 1983; Galli et al, 1976), y los marcadores de membrana se mezclan y distribuyen sobre la superficie celular (Pisam y Ripoche, 1976; Rodríguez-Boulan et al, 1984; Galli et al, 1976). Este hecho llevó a proponer que las uniones estrechas actúan como barreras que restringen la difusión de moléculas apicales y basolaterales. Para probar esta hipótesis, la membrana apical se marcó selectivamente con varias sondas (Dragsten et al, 1981; Dragsten et al, 1982; Spiegel et al, 1985). Las lectinas unidas a la membrana, (aglutininas de germen de trigo y cacahuate) algunas sondas lipídicas (5-[N-hexadecanoil] amino fluoresceína, y 1-acil-2-[N-4-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol] aminocaproil fosfatidilcolina) y de gangliosidos, fueron incapaces de pasar a través de la unión estrecha. Estas moléculas tienen una velocidad de "flip-flop" despreciable. No obstante, otras sondas lipídicas (ioduro de 3,3'-dihexadecilina docarbocianina y 5-[N-dodecanoil] amino fluoresceína) que pueden hacer "flip-flop" de la hoja externa a la interna de la membrana plasmática, fueron capaces de

evitar la unión estrecha y pasar -presumiblemente por la hoja interna- de la región apical a la basolateral. Estas conclusiones han sido confirmadas por Van Meer y Simons en 1986.

Rodríguez-Boulán y colaboradores (1976, 1980, 1983a,b) han demostrado que si las células MDCK infectadas con virus de la influenza o VSV son levantadas con tripsina-EDTA y mantenidas en suspensión, la gemación no procede polarizadamente. La adhesión de estas células al sustrato o a otras células, restaura la gemación polarizada (Rodríguez-Boulán et al, 1983b). La fijación de las células MDCK a un sustrato puede constituir el paso inicial de la polarización epitelial (Vega-Salas et al, 1987, 1978; Salas et al, 1984). La adhesión diferencial de las proteínas de membrana a un sustrato puede resultar en una distribución diferencial de proteínas de membrana adheridas o no adheridas (Michei et al, 1979). Nelson y Vesbnock (1976) han detectado cambios significativos en las propiedades biofísicas, en la distribución subcelular, y en los niveles de estado estacionario de la fodrina (una isoforma de la espectrina) durante el desarrollo de una monocapa continua de células MDCK, y han notado que la formación de una capa estable, densa y altamente insoluble de fodrina en la periferia celular coincide temporal y espacialmente con un extenso contacto célula-célula y con la distribución polarizada de la Na-K-ATPasa. Rodríguez-Boulán (1983) ha hipotetizado que una combinación de adhesión al soporte subyacente, con un movimiento convectivo de membrana de los bordes adheridos hacia la región apical, puede actuar no solo

como mecanismo de sorteo, sino que también puede dar cuenta de la localización típica de la unión estrecha en el extremo luminal del espacio intercelular.

La relación entre la adhesión, los contactos celulares, y la unión estrecha está apoyada por estudios realizados con moléculas semejantes a la uvomorulina en células epiteliales (EKblom et al, 1986). Así, Boller y colaboradores (1985) han encontrado que el suero antiuvomorulina se une a las uniones intermedias de las células epiteliales intestinales, y Yoshida-Noro et al (1984) demostraron que anticuerpos contra la uvomorulina de células de teratocarcinoma interfieren con la adhesión célula-célula en presencia de Ca^{++} . Imhoff y colaboradores (Imhoff et al, 1983; Behrens et al, 1985) obtuvieron un anticuerpo contra la uvomorulina localizado en el complejo de unión de las células MDCK, que desacopla a las células y destruye su polaridad. Anticuerpos que reconocen un fragmento de uvomorulina de 26 Kdalton que carece de metionina desbaratan las monocapas confluentes de MDCK (Vestweber y Kemler, 1985). Uno de esos anticuerpos (r11) bloquea la reformación de los complejos de unión en el ensayo de recuperación de la resistencia eléctrica transepitelial diseñado en nuestro laboratorio, que se realiza quitando y restaurando Ca^{++} (Gumbiner y Simons, 1986). Anticuerpos que no se unen específicamente a la región de unión no bloquean esta recuperación (EKblom et al, 1981).

polarizados aun (Eklöm, et al, 1981; Eklöm, 1981a,b). Durante la histogénesis del páncreas de los mamíferos, la difusión lateral de glicocójugados apicales puede ser restringida aun en ausencia de uniones estrechas (Madden y Sarras, 1985).

Como sucede con la Na-K-ATPasa de los epitelios transportadores naturales (Kyte, 1976), las células MDCK tienen esta enzima asimétricamente distribuida en la membrana basolateral (Cereijido et al, 1980, 1981a; Lamb et al, 1981). Caplan et al (1986) mostraron claramente que esta distribución se debe a una inserción polarizada que sigue a la síntesis de esta enzima. Ya que una fracción importante de esta proteína difunde libremente en el plano de la membrana (Jesaitis y Yguerabide, 1986), el mantenimiento de esta asimetría se atribuye sobre todo a la barrera constituida por las uniones estrechas. Este papel de la unión estrecha se acentúa además por el hecho de que el desarrollo de la polarización apical/basolateral coincide en el tiempo con el desarrollo de la unión estrecha (Rabito et al, 1984; Nelson y Veshnock, 1986). No obstante, hay algunos fenómenos de polarización que no pueden explicarse combinando la inserción polarizada con la restricción a la difusión a nivel de la unión estrecha, lo que sugiere la participación de otro mecanismo adicional. Así, cuando las células MDCK son tratadas con tripsina más EDTA, las uniones estrechas se desintegran y la distribución polarizada de la Na-K-ATPasa se pierde, pero es recuperada en unas pocas horas después de sembrar las células de nuevo. En dicho momento una barrera a este tiempo no solamente no

podría redistribuir los componentes, sino que prevendría la redistribución si es que esta ocurriera por desplazamiento lateral en el plano de la membrana.

En este trabajo presentamos un protocolo experimental en el cual, al tiempo en que los filamentos de la unión estrecha son ensamblados y sellados con los de las células vecinas, una fracción importante de Na-K-ATPasa queda atrapada en el lado apical ("erróneo"), que es posteriormente quitada de esta región a pesar de la barrera impuesta por la unión oclusora. Esto indica que la célula tiene al menos dos mecanismos distintos para la distribución asimétrica de esta enzima: 1) una inserción polarizada cuando es sintetizada de novo (Caplan et al, 1986), y 2) otro que quita las Na-K-ATPasas de lugares donde no se encuentra normalmente. Hay evidencias indirectas que tal mecanismo de remoción puede existir. Así, la densidad de partículas intermembranales (IMP) en el lado basolateral de las células MDCK es mucho más alta que en el apical (Cereijido et al, 1980), y esta asimetría, que involucra una remoción de IMP del lado apical y una adición en el basolateral, puede alcanzarse en la presencia de uniones estrechas ensambladas y selladas (Gonzalez-Mariscal et al, 1985). Además, Matlin et al (1983) ha demostrado que cuando la proteína G del virus de la estomatitis es implantada en la superficie apical de una célula MDCK polarizada, la proteína es rápidamente endocitada y reaparece en la superficie basolateral, desde donde el virus gema normalmente (Rodríguez-Boulan y Pendergast, 1980). No obstante, como

recomiendan Caplan et al (1986), es importante recordar que el comportamiento de las proteínas exógenas de los virus citopáticos no puede generalizarse fácilmente a las rutas de "sorting" celular normales, y es necesario verificar si un mecanismo similar opera sobre componentes de células normales, sin infectar. Esta reserva se justifica por el hecho de que, mientras la gemación asimétrica de los virus de la influenza o de la estomatitis no es afectada por drogas como la citocalacina que rompen las uniones estrechas (Salas et al, 1986; Meza et al. 1980), la polarización de los componentes nativos (por ejemplo la Na-K-ATPasa) se pierde.

En el presente trabajo demostramos primero que un número grande de Na-K-ATPasas puede ser atrapado en el lado apical. Seguimos entonces el curso en el tiempo de la remoción de Na-K-ATPasas del lado apical en la presencia de uniones estrechas selladas, así también como su inserción en el lado basolateral. Nuestros resultados indican que la enzima quitada de la región apical no es necesariamente la misma insertada en la basolateral. Finalmente, nuestros resultados nos permiten analizar algunos aspectos de la interrelación entre la formación de la unión estrecha y la polarización apical/basolateral.

MÉTODOS.

Cultivo celular.

Las células MDCK fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (MDCK, CCL-34). En la mayoría de los experimentos las células estuvieron entre los pasajes 60 a 80. Las células fueron crecidas a 36.5 °C en botellas de plástico desechables (Costar 3150, Cambridge, Mass.), con una atmósfera de aire y 5% de CO₂ (Incubadora VIP CO₂ 417, Lab Line Instruments, Inc., New Brunswick, N.Y.) y 20 ml de medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Grand Island Biological Co. (GIBCO) 430-1600, Grand Island, N.Y.) con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (In Vitro, México D.F.), 0.8 U/ml de insulina (Elli Lilly, México D.F.) y 10% de suero fetal de bobino (Flow Laboratories, McLean, Virginia); este medio completo será referido en el texto siguiente como CDMEM. Las células fueron despegadas de su sustrato con una solución de tripsina-EDTA (In Vitro S.A., México D.F.) y sembradas a confluencia sobre un filtro de nitrocelulosa (Millipore HAWP 293-25; diámetro de poro: 0.45 µm. Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts) pegado a la base de un anillo de plástico (D.I.: 1.7 cm; altura: 0.7 cm) como propusieron Steele et al (1986), esterilizados en autoclave y depositados en grupos en cajas petri de 100 x 15 mm (Lux 5211, Lux Scientific Corporation, California). El fondo de la caja petri se cubrió con una maya

gruesa de nylon (Nitec, Tetko, Inc., Elmsford, N.Y.) de manera que el medio de cultivo tuviera fácil acceso al lado basolateral de las células, aun en monocapas maduras con uniones estrechas selladas. Después de una hora, con las células ya adheridas, se desechó el medio de ambos lados, los anillos se lavaron tres veces con PBS sin Ca^{++} (GIBCO 450-1300), y ambos lados del anillo se llenaron con Medio esencial Mínimo sin Ca^{++} (GIBCO 410-1300). No obstante, determinaciones con un electrodo sensible al Ca^{++} se detectan concentraciones de 1-4 μM de este ion (Gonzalez-Mariscal et al, 1987). A pesar de ello nos referiremos a este medio como "sin Ca^{++} ". 20 horas después se comenzó el protocolo experimental cambiando el medio en ambos lados del anillo por otro que contenía Ca^{++} . Mas detalles experimentales se dan en relación con cada estudio.

Fijación de 3H -ouabaina.

Los anillos con las monocapas preparados como se describe arriba, se lavaron tres veces con una solución ringer que contenía (mM): 140 NaCl; 1.8 $CaCl_2$; 1.0 $MgCl_2$; 5 dextrosa y 10 de Tris, pH 7.4, a temperatura ambiente. Esta solución será referida como "ringer sin K". Los anillos fueron entonces sostenidos desde arriba con un disco de plástico de 8.5 cm de diametro mantenido sobre una caja petri de 100 x 15 mm como se muestra en la figura 1. Alambres metálicos largos y delgados cubiertos de vidrio, que se extendían por toda la caja, fueron

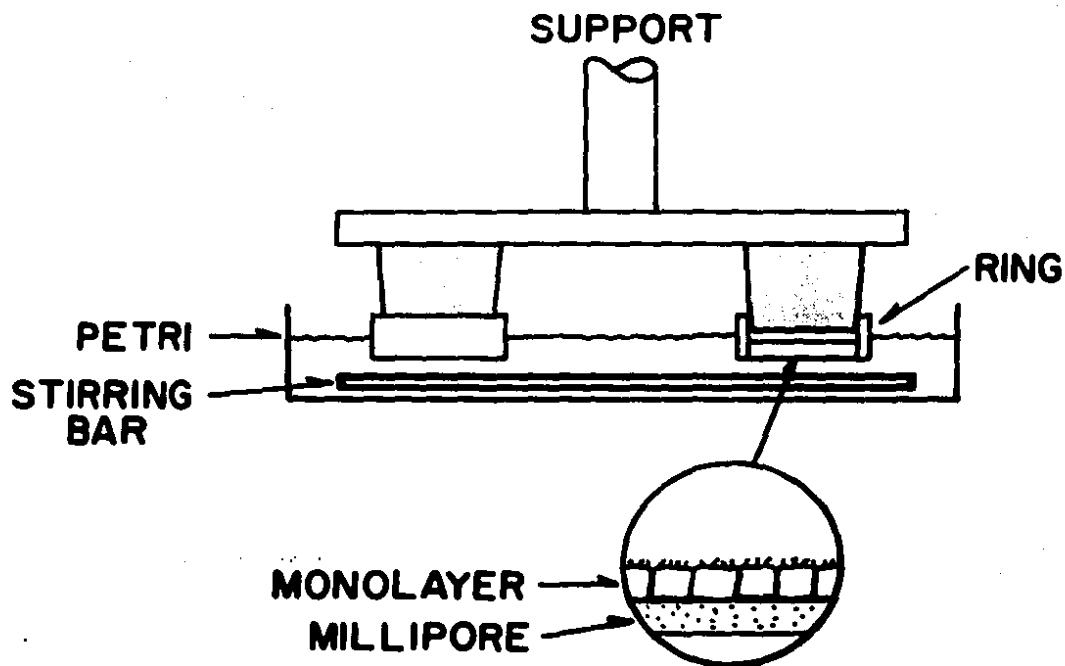


Fig. 1: Dispositivo experimental para medir la fijación específica de ^3H -ouabaina del lado basolateral de monocapas crecidas sobre filtro Millipore. Filtros con poros de $0.45 \mu\text{m}$ se pegan a la base de anillos de plástico, y esos anillos se adhieren a soportes cónicos fijados a un disco de plástico de 8.5 cm de diámetro que está sostenido por arriba. El lado basolateral es bañado con una solución contenida en una caja petri de $100 \times 15 \text{ mm}$. Esta solución se agita vigorosamente con una barra magnética larga y delgada. Solo dos de los seis anillos de plástico se representan. El anillo de lado derecho muestra en una sección transversal las interrelaciones entre el anillo, el filtro y la monocapa.

usados como agitadores magnéticos. Se adicionaron 1.7 μ l de ^3H -ouabaina (Amersham TRK-429 alrededor de 16 Ci/mMol, England) a cada mililitro de la solución que bana el lado a ser marcado. La concentración de ouabaina en las soluciones usadas para medir la marca total y la inespecífica fueron 10^{-6} y 5×10^{-4} M respectivamente. Grupos apareados de monocapas fueron expuestos a las soluciones total e inespecífica. El nivel de la solución con ^3H -ouabaina en la cámara exterior es 3 mm más bajo que el de la interior sin marcar. Las monocapas fueron marcadas por arriba (apical), por abajo (basolateral) o por ambos lados. La longitud del periodo de marcado fue elegida sobre la base de que fuera suficiente para alcanzar una marca constante (ver más adelante). Al final de la incubación, la caja de petri que estaba en contacto con el lado basolateral se cambió por otra que contenía MgCl_2 0.1 M enfriado en hielo. Esta maniobra se repitió dos veces a intervalos de dos minutos y cuatro veces a intervalos de cinco minutos. Se encontró que el primer periodo quita el 95 % de la radiactividad, el segundo 5% y la actividad del ^3H en el resto de las soluciones de lavado no difirieron de la radiactividad de fondo.

Cuando el marcado se realizó en el lado apical, los anillos no se sostuvieron como en la figura 1, sino que fueron depositados directamente sobre una malla de nylon. En este caso la agitación se hizo con un agitador orbital (Bellco 7740-20020, Bellco Biotechnology, Vineland, N.J.) y el tiempo de incubación con las soluciones de marcado fue de 4 minutos. Los lavados se

realizaron desechando la solución de marcado y lavando rápidamente dos veces, y otras dos más en periodos de cinco minutos.

Los filtros que contenían la monocapa se cortaron con un bisturí, se depositaron sobre un papel filtro con las células hacia arriba, y se transfirieron a viales con 5ml de Aquasol (Aquasol NEF-934, NEN Research Products, Boston, Massachusetts). Estos, junto con 4 viales que contenían 50 μ l de una dilución 1/50 de cada solución de marcado, se contaron en un contador de centelleo Packard 2000B. Información adicional sobre la exactitud de este método, aplicado a este tipo de células, han sido ya publicados por Cereijido et al (1980, 1981) y Bolívar et al, (1987).

Flujos de ^3H -ouabaina.

Para medir la fuga de ouabaina de un lado a otro, las monocapas fueron preparadas en anillos similares, pero de un diámetro interno mayor (33 mm) y con tres soportes. La cantidad de células sembradas fue proporcionalmente incrementada, y la agitación se efectuó con barras magnéticas de 7 mm. Se agregó ^3H -ouabaina, a la cámara superior a la misma concentración y actividad indicada anteriormente. La cámara inferior fue una caja petri de 60 x 15 mm (Lux 5220, Lux Scientific Corporation, California), y el volumen de fluido agregado fue 1.5 ml. El medio

de la cámara inferior se muestreo (2 x 50 μ l) periódicamente. También se tomaron muestras (2 x 50 μ l) de la solución de carga diluida convenientemente y se contaron.

Resistencia eléctrica transepitelial TER.

El grado de sellado de la unión estrecha fue evaluado en base a la determinación de la resistencia eléctrica a través de la monocapa. Después de la incubación bajo las condiciones indicadas, el filtro con la monocapa se cortó con un bisturí y se montó como una hoja extendida entre dos cámaras de Lucita con un área expuesta de 0.69 cm^2 . La corriente fue liberada via electrodos de Ag/AgCl situados a 2.0 cm de la monocapa, la deflexión de voltaje producida se midió con otro par de electrodos colocados a 1.0 mm de la monocapa. Se restaron las contribuciones del filtro y de la solución del baño, y los valores consignados en esta tesis corresponden exclusivamente a la monocapa. Cada monocapa se usó en una sola determinación y se desechó para evitar fugas debidas al daño de los bordes.

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar seguido del número de observaciones entre parentesis.

RESULTADOS.

Para investigar las interrelaciones entre la unión estrecha y la distribución de la Na-K-ATPasa y, en particular, la suerte de esta enzima cuando es atrapada en el lado apical de las células MDCK durante la formación de la unión estrecha, usamos un protocolo originalmente ideado para estudiar la síntesis y ensamblaje de la unión estrecha. Cuando las células MDCK se siembran a confluencia, completan la formación de la unión estrecha en 12 a 16 horas (Cereijido et al, 1978; 1983). Por el contrario, si después de 1 hr de sembradas, las monocapas son transferidas a un medio con 1-4 μM Ca^{++} (libre de Ca^{++}), 20 hrs después, mientras las monocapas control tienen una resistencia eléctrica transepitelial (TER) de 200-500 $\Omega\cdot\text{cm}^2$, el valor de la TER en esas monocapas es despreciable. Sin embargo, si a este tiempo las monocapas son cambiadas a un medio que contiene Ca^{++} , las uniones estrechas son ensambladas y selladas y la TER alcanza los valores control en unas 4 hrs (Gonzalez-Mariscal et al, 1985a,b). Esto ha sido demostrado en monocapas crecidas sobre malla de nylon cubiertos de colagena. La tabla 1 muestra que el mismo fenómeno se puede producir en monocapas crecidas en los filtros Millipore usados en el presente estudio. Monocapas incubadas continuamente en Ca^{++} tienen una TER de 478 $\Omega\cdot\text{cm}^2$, pero las mantenidas en medio libre de Ca^{++} tiene una resistencia despreciable ($10\Omega\cdot\text{cm}^2$). Sin embargo, si estas son transferidas a medio

Tabla 1. Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET) de monocapas de células MDCK sembradas en filtro Millipore.

Condición	RET
	($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
Filtro sin células	31 ± 1 (6)
CDMEM (24 hrs)	478 ± 67 (5)
Medio sin calcio (20 hrs)	1 ± 1 (6)
Medio sin calcio (20 hrs) --> CDMEM (4 hrs)	368 ± 55 (6)

La RET se midió por medio de la deflexión de voltaje producida por un pulso de corriente de $100 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^2$. El valor obtenido en el filtro sin células se restó a los valores obtenidos en las otras tres condiciones.

con Ca^{++} . desarrollan una TER de $368 \text{ } \mu\text{cm}^2$ en 4 hrs.

Para marcar específicamente la Na-K-ATPasa en los lados apical o basolateral usamos pulsos cortos (5 min) de ^3H -ouabaina y, por lo tanto, fue necesario investigar si durante esta corta exposición el marcador gana acceso al otro lado en cantidades significativas y llega a distorsionar las medidas. La figura 2 muestra el flujo de ^3H -ouabaina del lado apical al basolateral. La curva superior fue obtenida con el filtro solo entre dos soluciones al mismo nivel. La curva intermedia se obtuvo bajo las mismas condiciones pero con el nivel de la solución del lado basolateral 3 mm arriba del nivel de la solución del lado interior del anillo. La gran diferencia en las pendientes muestra que esta simple maniobra es suficiente para reducir significativamente el flujo del trazador. Los círculos llenos corresponden a un grupo de monocapas en esta última condición. Ello indica que durante los 5 min de exposición usados para marcar las bombas, el escape de ^3H -ouabaina es muy pequeño. Para medir posteriormente en que grado el pequeño flujo de trazador que puede existir entre las dos cámaras llega a marcar las Na-K-ATPasas del otro lado, dividimos un grupo de monocapas en tres subgrupos, y las marcamos por arriba, por abajo y por ambos lados respectivamente. Esta prueba fue aplicada a monocapas que habían estado 20 hrs en medio sin Ca^{++} , y solo una hora en medio con Ca^{++} . La tabla 2 muestra que la marca en cada grupo fue 1.47 ± 0.12 , 3.07 ± 0.28 y 4.67 ± 0.18 ($\times 10^{11}$) sitios por centímetro cuadrado respectivamente. El

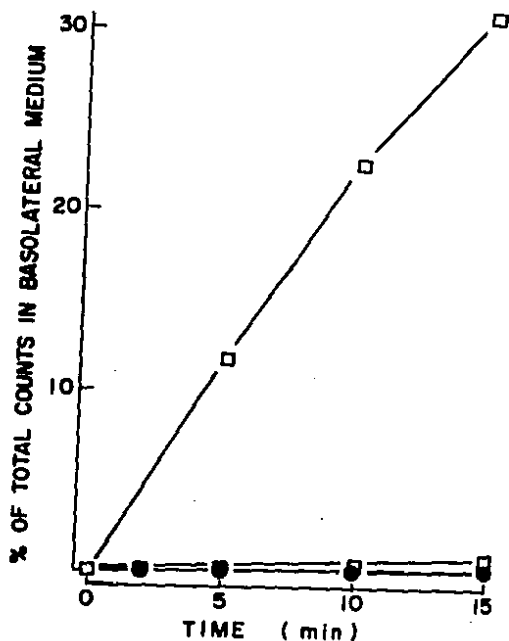


Fig. 2: Flujo de ^3H -ouabaina del lado superior (apical) al basolateral. Los cuadrados corresponden al filtro solo sin monocapa. La curva superior fue obtenida con las soluciones apical y basolateral al mismo nivel. La curva de cuadrados inferior ilustra el efecto de una presión hidrostática pequeña originada por el hecho de que el nivel de la solución en contacto con el lado basolateral está 3 mm arriba del nivel de la solución de carga en contacto con el lado apical. Los circulos llenos representan el flujo a través de una monocapa transferida a un medio con Ca^{++} 4 hrs antes, y sujeta al gradiente de 3 mm.

Tabla 2. Marcación de Na-K-ATPasas en células MDCK sembradas en filtro Millipore.

Marcación desde el lado:	Sitios de fijación específicos		
	$(10^{-11} \text{ cm}^{-2})$		
Apical	1.47	± 0.12	(13)
Basolateral	3.07	± 0.28	(13)
Suma	4.54		
Ambos	4.67	± 0.18	(6)

Las monocapas se incubaron hasta la hora 20 en medio sin calcio y entonces se transfirieron a medio con calcio por 1hr. Los sitios específicos se obtuvieron como la diferencia entre las marcaciones con una solución de ^3H -ouabaina 10^{-6} M y otra que tenía además un exceso de 5×10^{-4} M de ouabaina fría.

hecho de que la suma de cada lado excede en un 3 % la marca de ambos lados indica que con este protocolo el número de Na-K-ATPasas atribuidas a un lado determinado no estuvo seriamente tergiversado por el marcado de Na-K-ATPasas del lado opuesto.

El siguiente punto fue medir la cantidad de Na-K-ATPasas atrapadas en el lado apical. La fig. 3a muestra los marcajes total y competido con ouabaina fría, y la 3b la diferencia entre ambos grupos de valores, la cual se toma como los sitios específicos de fijación de ouabaina. Se ha mostrado previamente que con este protocolo las uniones estrechas aparecen en replicas de criofractura en solo 15 min, confieren una TER de 200 μcm^2 en unas 2 hrs, y que la TER alcanza su valor máximo en 4 hrs (ver también tabla 1). Esto indica que parte de la enzima está realmente atrapada en el lado "equivocado" de la célula y que es quitada en la presencia de uniones estrechas selladas.

Nuestro siguiente punto fue seguir la aparición de Na-K-ATPasa en el lado basolateral. El primer paso consistió en determinar la extensión de exposición requerida para alcanzar el marcado de saturación. La Fig. 4 muestra las marcaciones total y competida con ouabaina fría en función del tiempo en monocapas maduras (Esto es: que han sido incubadas 20-24 hrs con Ca^{++}). Estas monocapas fueron escogidas para esta prueba porque tienen uniones estrechas bien establecidas, las células vecinas están muy juntas, el interespacio es tortuoso, y la membrana

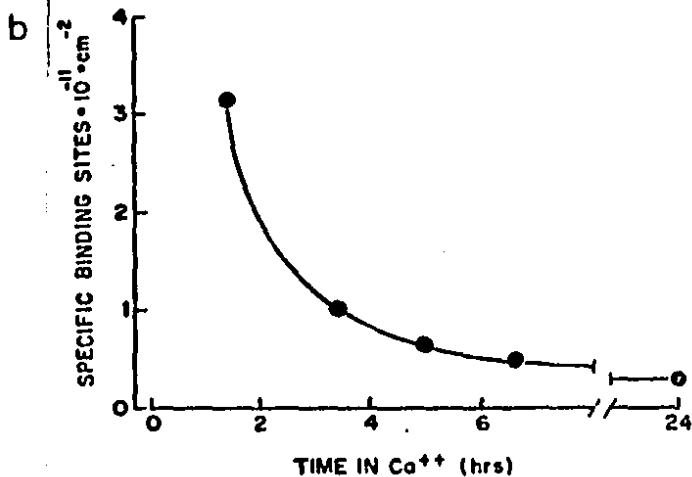
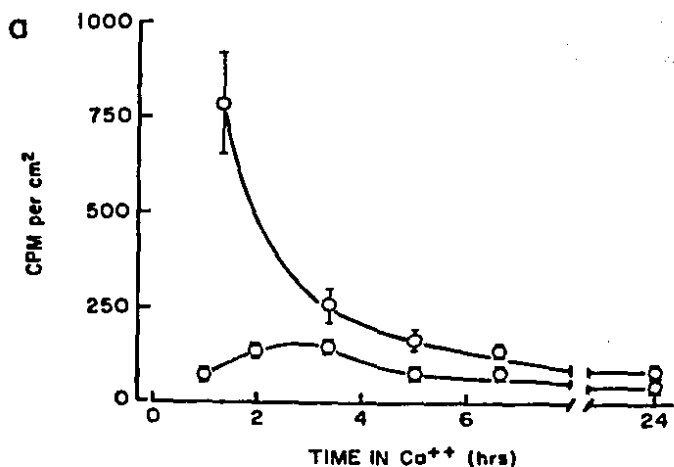


Fig. 3: a) Curso temporal del marcado total (curva superior) y el competido (curva inferior) del lado apical con ^3H -ouabaina. Las monocapas han sido cultivadas por 20 hrs en un medio con 1-5 μM de Ca^{++} , y fueron cambiadas a otro medio con 1.8 mM de Ca^{++} al tiempo cero en la abscisa. b) Curso temporal del marcado específico de Na-K-ATPasas en el lado apical, después de la adición de Ca^{++} , obtenida como la diferencia entre las dos curvas anteriores.

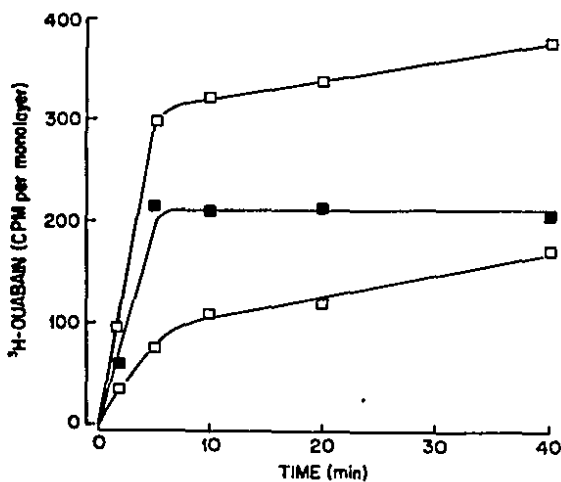


Fig. 4: Curso temporal del marcado de ^3H -ouabaina de monocapas maduras de células MDCK preparadas como en la figura 1. La solución de ^3H -ouabaina está en contacto con el lado inferior (basolateral) de la monocapa. Al final de cada periodo de marcado, el filtro con la monocapa se lavó con MgCl_2 0.1 M, se cortó con un bisturí y se contó. Las curvas superior e inferior (cuadrados vacíos) representan la marca con ^3H -ouabaina 10^{-6} M en ausencia y en presencia de 5×10^{-4} M de ouabaina no marcada respectivamente. Curva de enmedio: diferencia entre las marcas de los dos grupos de monocapas, la cual se toma como marca específica de Na-K-ATPasa.

basolateral presenta un grado considerable de interdigitaciones y, por consiguiente, constituyen el límite superior a las dificultades de alcanzar los sitios de bombeo con el trazador agregado a la solución basolateral. Se observó (fig. 4 cuadrados llenos) que el número de sitios específicos alcanzan un plateau en 5 min. De acuerdo con esto la marcación de Na-K-ATPasas de este lado se midió con exposiciones de 10 min.

La Fig. 5 ilustra el número de sitios de fijación específicos en función del tiempo de transferencia de la monocapa de un medio sin Ca^{++} (20 hrs) a otro que contiene 1.8 mM Ca^{++} . Los círculos llenos muestran la disminución de sitios en la región apical, y los cuadrados llenos la inserción en la basolateral. La curva superior (triángulos) corresponde al número de sitios totales en la superficie de las células, y refleja el hecho de que, además de la -hipotética- transferencia de sitios de una región a la otra, la célula está incorporando nuevas Na-K-ATPasas. El estudio del origen de nuevos sitios requiere experimentos control previos, los cuales se muestran en las figuras 6 y 7. Ya que involucran el marcado de monocapas por el lado basolateral en función del tiempo, fue necesario determinar que tan rápido podemos lavar la 3H -ouabaina que no se unió a sitios específicos. Para ello se marcó específicamente un grupo de monocapas maduras y el número de sitios obtenido se tomó como 100 % (fig. 6). Un segundo grupo de membranas se trataron 15 min con ouabaina fría para saturar todos los sitios específicos, y luego se marcaron con 3H -ouabaina. Este grupo se lavó

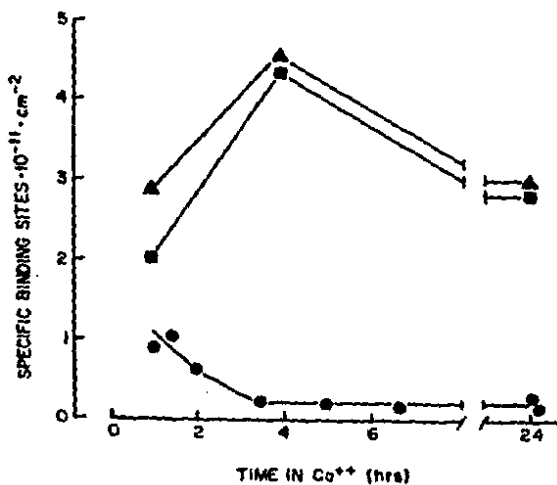


Fig. 5: Curso temporal del número de Na-K-ATPasas de los lados apical (círculos) y basolateral (cuadrados) en función del tiempo después de la adición de Ca^{++} 1.8 μM al tiempo cero. Los triángulos corresponden a la suma de los sitios apicales más los basolaterales. Cada punto experimental representa el promedio de 4-5 monocapas individuales. Las marcaciones apical y basolateral fueron realizadas simultáneamente en diferentes grupos de monocapas.

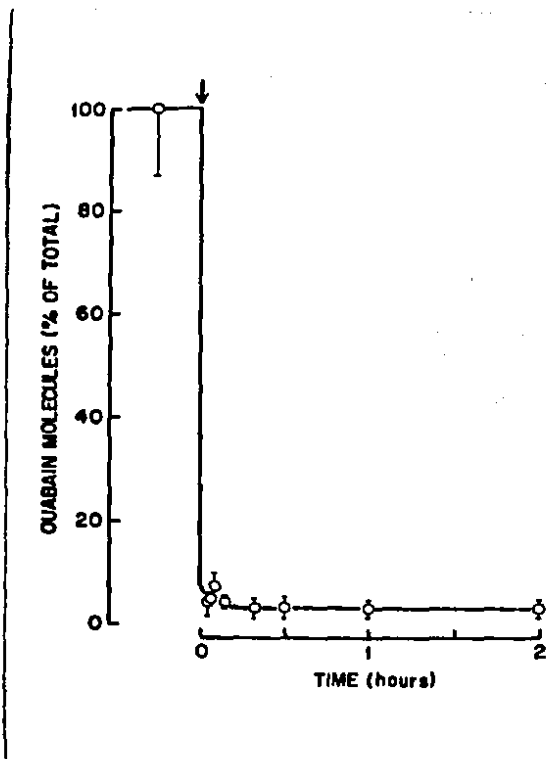


Fig. 6: "Wash-out" de ^3H -ouabaina del lado basolateral. Un grupo de monocapas se marcó como en la figura 3, y su número de sitios específicos, $1.36 \pm 0.19 \times 10^{11}$ sitios por centímetro cuadrado ($n = 13$), se tomó como el 100%. El resto de las monocapas fueron incubadas con ouabaina fría 0.5 mM durante 15 min para saturar todos los sitios de fijación específica, lavadas intensamente con ringer sin K, y marcadas por 5 min con ^3H -ouabaina. Se supuso que, debido al bloqueo previo con ouabaina fría, la ^3H -ouabaina no se fijó específicamente. Estas monocapas fueron lavadas con MgCl_2 0.1 M enfriado en hielo, quitadas periódicamente y contadas. El MgCl_2 se cambió después de cada muestreo. Cada monocapa se usó como una muestra única y luego se desechó. Los resultados se expresan como porcentajes del grupo control. Cada valor representa promedio de 3 monocapas.

entonces de la manera mostrada en la figura 1, y las monocapas se quitaron y contaron periódicamente. La figura 6 muestra que el trazador se lava rápidamente, y alcanza un mínimo en 10 min. La figura 7 muestra un segundo tipo de experimento, comprende varios grupos de monocapas maduras idénticas. En el primero contamos el número total de sitios específicos, y en el resto los bloqueamos con un pulso de ouabaina fría (bloque gris). En base a los resultados de la figura 6 puede esperarse que la ouabaina fría fuera lavada en unos 10 min, y que la cantidad remanente en la monocapa es despreciable. En este grupo de monocapas medimos la cantidad de sitios específicos en función del tiempo usando pulsos de 10 min. Los resultados obtenidos indican que, a pesar del bloqueo de sus sitios de bombeo, las monocapas maduras no agregan sitios nuevos al menos por 2 hrs. Esto constituye una clara diferencia con las monocapas transferidas de medio sin Ca^{++} a medio con Ca^{++} (fig. 5). Por consiguiente, los sitios nuevos no son insertados como una respuesta al bloqueo con ouabaina, sino que son disparados por la adición de Ca^{++} .

Tras de esta serie de controles imprescindibles, estamos ahora en condiciones de estudiar el origen ~~de los sitios~~ insertados en la membrana basolateral después de transferir las monocapas a un medio con Ca^{++} . La figura 8 muestra en las dos primeras columnas el número total de sitios antes y después de la transferencia a Ca^{++} . La tercera columna (gris) corresponde a monocapas expuestas al Ca^{++} en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida. El hecho de que este inhibidor de la

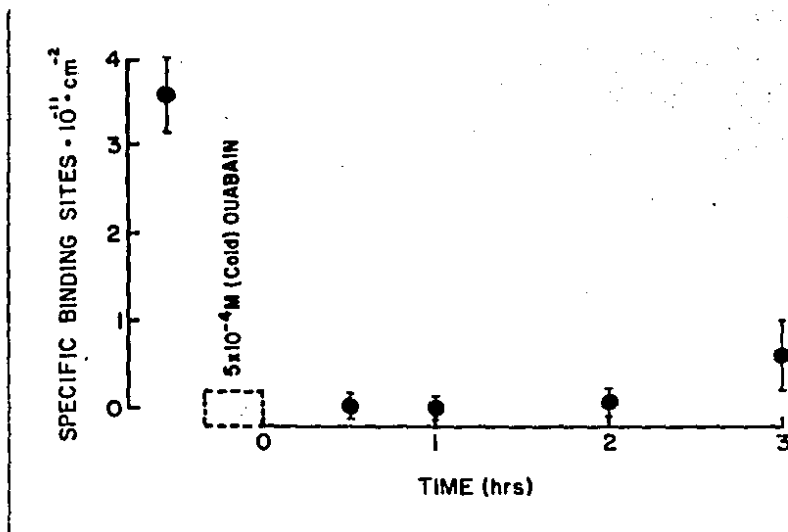


Fig. 7: Marcado específico de Na-K-ATPasas del lado basolateral de monocapas maduras, antes y después del bloqueo de los sitios de bombeo con una alta concentración de ouabaina no radiactiva (bloqueo gris). Las monocapas fueron periódicamente marcadas del lado basolateral, usando pulsos de 10 min.

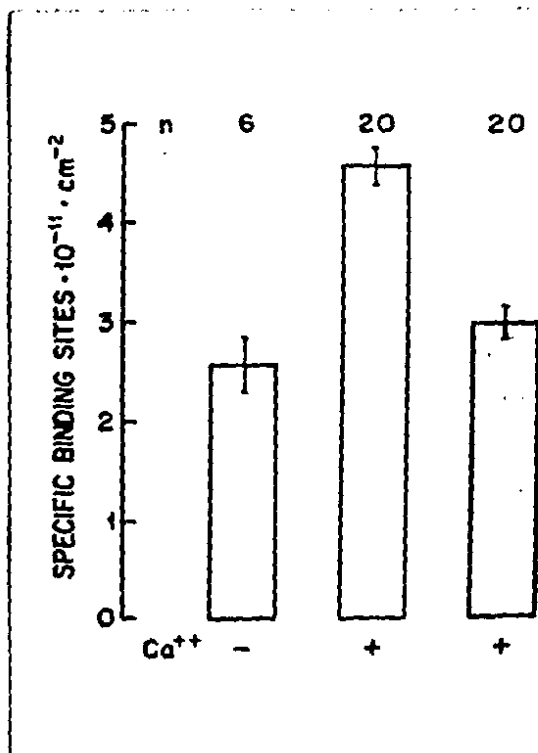


Fig. 8: Efecto de la cicloheximida en el incremento de los sitios de bombeo basolaterales producido por el Ca⁺⁺. La droga (10 µg/ml) se agregó a monocapas mantenidas en medio sin Ca⁺⁺ por 20 hrs 5 min antes de cambiarlas a medio con Ca⁺⁺, y estuvo presente en la solución del baño durante las 4 hrs de exposición al Ca⁺⁺. Las barras (izquierda a derecha) representan el número total de sitios específicos antes del Ca⁺⁺, 4 hrs después de este ion, y 4 hrs después de este ion pero en presencia de cicloheximida respectivamente.

síntesis de proteínas previene el incremento en el número de sitios en el lado basolateral, indica que estos sitios son sintetizados de novo, y no parecen derivar del lado apical. La figura 9 muestra que el inhibidor no evita la remoción de sitios en la región apical.

Como prueba definitiva de que los sitios de bombeo quitados del lado apical no son transferidos al basolateral, ideamos un protocolo donde la mayoría de los otros orígenes de los sitios basolaterales fueron minimizados. Así los sitios ya existentes en este lado, antes de la adición de Ca^{++} , fueron bloqueados durante 10 min con ouabaina fría como en la figura 7. La inserción de sitios recién sintetizados se evitó con cicloheximida como en la figura 8. Las monocapas se dividieron entonces en dos grupos: el primero tiene también bloqueados sus sitios apicales con ouabaina fría; y el segundo se mantuvo como control, o sea, sus sitios apicales no se bloquearon. Cuatro horas después, los sitios específicos basolaterales se marcaron de la manera usual. Se supuso que, si los sitios apicales eran transferidos a la basolateral, el segundo grupo podría exhibir una mayor población de sitios en esta cara. La tabla 3 muestra que no fue el caso, y que ambos grupos de monocapas tienen una población similar de sitios basolaterales. El número de sitios encontrados en ambos casos es mucho más pequeño que las figuras 4, 5 y 8 porque, como mencionamos arriba, los sitios pre-existentes se bloquearon antes y los recién sintetizados se evitaron con cicloheximida. Aunque la conclusión principal es

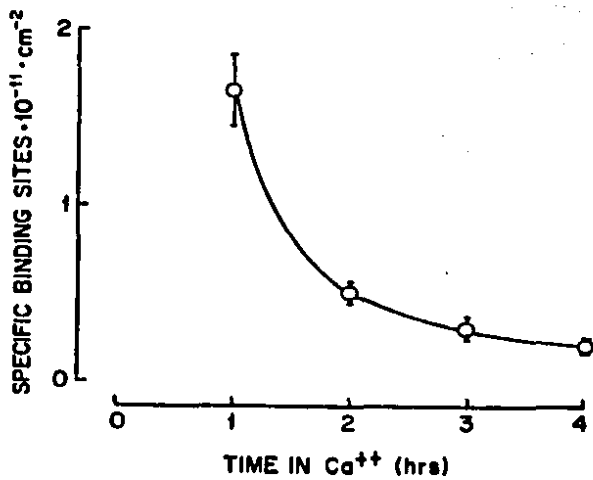


Fig. 9: Efecto de la cicloheximida en la remoción de sitios de fijación apicales. El protocolo experimental es el mismo que en la figura 5, y la concentración de la droga fue 10 $\mu\text{g/ml}$ como en la figura 8. (n = 6).

Tabla 3. Instalación de Na-K-ATPasas en la membrana basolateral.

Lado Apical	Sitios de fijación basolaterales
	(10^{-11} .cm ⁻²)
Bloqueado con ouabaina fría	0.42 ± 0.03 (5)
Sin bloqueo	0.39 ± 0.02 (6)

Ambos grupos de monocapas tuvieron sus sitios basolaterales pre-bloqueados con ouabaina fría como en la figura 7, y la síntesis de proteínas inhibida con cicloheximida como en la figura 8.

que los sitios apicales no pueden llegar a la basolateral, los resultados de la tabla 3 confirman además que la inhibición de la síntesis de proteínas impide el reaprovisionamiento de Na-K-ATPasas basolaterales.

Para completar el estudio, quisimos analizar el mecanismo de incorporación de Na-K-ATPasas a la cara basolateral. Este análisis se detalla a continuación.

La figura 10 muestra que el cloruro de amonio, la primaquina y la cloroquina, que son inhibidores de la exocitosis (Moore et al, 1983; Brown et al, 1984; Strous et al, 1985; Gottlieb et al, 1986) impiden la incorporación de Na-K-ATPasas que ocurre en las monocapas control después de la adición de Ca^{++} . Esto concuerda con los resultados obtenidos en este laboratorio con técnicas de fijación de voltaje en célula entera (González-Mariscal et al, 1987) que indican que la transferencia de medio sin Ca^{++} a medio con Ca^{++} provoca un incremento significativo de la cantidad de superficie de membrana, y que este incremento es evitado por las mismas drogas usadas en el experimento de la figura 10.

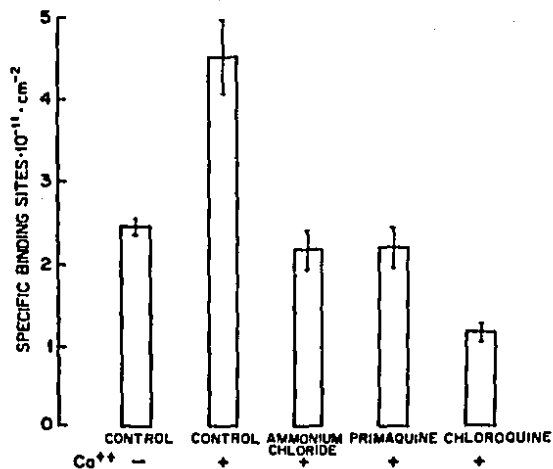


Fig. 10: Efecto de los inhibidores de la exocitosis en el incremento de las Na-K-ATPasas basolaterales que sigue después de exponer 4 hrs a 1.8 mM Ca⁺⁺. Las monocapas se mantuvieron durante 20 hrs en medio sin Ca⁺⁺. 5 min antes de cambiarlas a medio con Ca⁺⁺ fueron tratadas con cloruro de amonio 10 mM, primaquina 25 μ M, o cloroquina 10 μ M. Estas drogas estuvieron presentes durante las 4 hrs de exposición al Ca⁺⁺. Las primeras dos columnas de la izquierda, corresponden a monocapas mantenidas sin Ca⁺⁺ y con 4 hrs de exposición a este ión respectivamente, y sirven como control del efecto del Ca⁺⁺ sobre el número de sitios de bombeo. Las tres columnas de la derecha, corresponden a monocapas que, a pesar de que estuvieron en medio con Ca⁺⁺ por 4 hrs, no incrementaron su población de sitios de fijación debido al tratamiento con las drogas especificadas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Esta bien establecido que el glicosido cardiaco ouabaina es un inhibidor poderoso y altamente especifico de la Na-K-ATPasa (Ruoho y Kyte, 1974; Forbush et al, 1978), y que las Na-K-ATPasas de las células MDCK no son excepcion (Cereijido et al, 1980, 1981b; Rabito y Tchao, 1980; Lamb et al, 1981). En monocapas maduras de células MDCK esta enzima esta especificamente localizada en el lado basolateral (Cereijido et al, 1980; Louvard, 1980; Caplan et al, 1986), y esta asimetria ha sido atribuida a la existencia de las uniones estrechas. No obstante, mientras la distribucion de enzimas tales como la γ -glutamyl transpeptidasa y la fosfatasa alcalina esta retardada con respecto al desarrollo de las uniones estrechas (Rabito et al, 1984), las interrelaciones con esta estructura y la Na-K-ATPasa no son claras. Por un lado, la ruptura de la union estrecha con quelantes de Ca^{++} destruye tambien la distribucion asimetrica de la enzima (Louvard, 1980) y provoca una reduccion de 67 % de su poblacion en la membrana plasmatica (Rabito et al, 1980). Aun mas, esto podria ser un efecto directo de la remocion del Ca^{++} , y no necesariamente deberse al desensamble de la union estrecha. Por otro lado observamos en el presente estudio que tales Na-K-ATPasas pueden ser distribuidas en presencia de uniones estrechas ensambladas y selladas.

Receptores y ligandos pueden transferirse directamente de

un lado de la célula al opuesto (Mostov y Simister, 1985), y la proteína G del virus de la estomatitis artificialmente implantada en la superficie apical de las células MDCK es endocitada y reaparece en el lado basolateral (Matlin et al, 1983). No obstante, la comparación de las cantidades de Na-K-ATPasa en los lados apical y basolateral (tabla 2) con la cantidad de sitios de bombeo insertados en el dominio basolateral cuando la síntesis de proteínas está inhibida (fig. 8), sugiere que los sitios apicales podrían no ser transferidos al dominio basolateral.

Vega-Salas et al (1986a,b) han mostrado que células MDCK mantenidas por 20 hrs en medio libre de Ca^{++} usando el mismo protocolo que seguimos en el presente estudio (González-Mariscal et al, 1985a,b) retienen marcadores apicales en un compartimento intracelular grande (VAC), y que estos aparecen en la región apical después de la adición de Ca^{++} (fig. 11). Esto sugiere que el dominio apical puede insertarse masivamente bajo el efecto del Ca^{++} . El hecho de que podamos detectar la Na-K-ATPasa en el lado apical en la presencia de uniones estrechas, indica que la inserción de VACs no constituye la creación de una región apical completa (unión estrecha-.unión estrecha), sino que son insertadas en un dominio apical que es definido en el momento en que la unión es ensamblada.

La membrana plasmática está continuamente endocitándose y su pérdida es balanceada por la inserción de membrana del

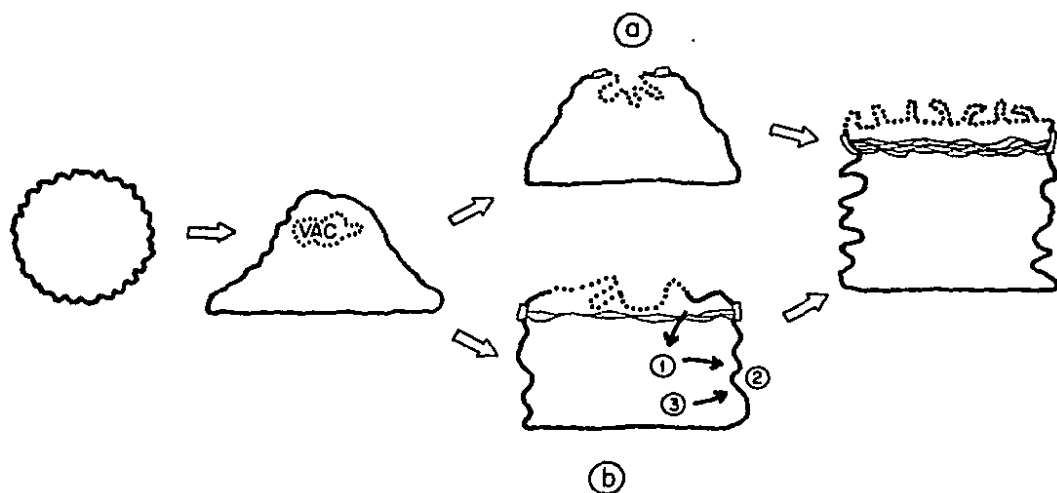


Fig. 11: Remoción de Na-K-ATPasa y formación de la región apical. Las células MDCK levantadas con tripsina-EDTA endocitan una fracción grande de superficie membranal. Las células sembradas y mantenidas hasta la hr 20 en medio sin Ca^{++} restauran parcialmente su superficie membranal a un 78 % del valor en una célula MDCK madura (González-Mariscal et al 1980). Bajo esta condición contienen un compartimento intracelular (VAC) donde se acumulan marcadores apicales (Vega-Salas et al 1986). Cuando las monocapas se transfieren a medio con Ca^{++} , las uniones estrechas comienzan a formarse (González-Mariscal et al 1985b) y las VACs se funden a la parte superior de la célula (Vega-Salas et al 1986). Este proceso involucra la adición de un 22 % de superficie membranal extra (González-Mariscal et al 1987) y puede originar en principio dos situaciones principales: a) que los componentes de la unión (bloques vacíos) estuvieran contenidos en la VAC y se adhirieran durante la fusión; o b) que pudieran ser insertados con un grupo independiente de vesículas exocitóticas. En este segundo caso un número Na-K-ATPasas es atrapado más allá de las uniones estrechas, y deberá ser quitado de esta posición. La información en el presente trabajo favorece esta última posibilidad. También indica que la enzima quitada (1) puede no ser insertada en la membrana basolateral (2), sino que las bombas que llegan a esta región parecen ser sintetizadas de novo (3). El dibujo de la derecha representa una célula epitelial madura con sus uniones estrechas completamente formadas, y sus componentes apicales y basolaterales ya sorteados.

interior celular (Silverstein et al, 1977). Los organelos participan en este tráfico extensiva y temporalmente, comunicandose a través de una complicada cadena vesicular (Goldstein et al, 1985). El grado de cambio estructural mostrado por este intercambio puede ser muy impresionante. Así Chambard et al (1981) demostraron que monocapas de células epiteliales tiroideas cubiertas en la cara apical con una capa de colágena, se desorganizan en 24 hrs y se reorganizan en 4-8 días, en folículos donde las células tienen la región apical transferida al lado opuesto. Todavía no hay información sobre el estado de la unión estrecha durante estos cambios, y la desorganización descrita por estos autores sugiere que las uniones han sido desensambladas. Las células epiteliales se dividen, migran y cambian de vecinas y fronteras en condiciones en que un rompimiento en la barrera constituida por la unión estrecha podría ser extremadamente peligrosa al organismo (por ejemplo durante la renovación celular normal de la mucosa intestinal). Las células epiteliales en cultivo pueden dividirse sin disminuir el sello de unión, como lo revela el hecho de que se han observado figuras mitóticas en el ápice de domos que contienen fluido (Mullins, 1985). Además, a lo largo del ciclo celular, bajo el efecto del AMP cíclico, y de inductores químicos de la diferenciación, las células MDCK incrementan el transporte de fluidos, presumiblemente por adición de mecanismos de permeación sin perder el fuerte sello de las uniones entre las células (Kennedy y Lever, 1984). En el presente trabajo mostramos que, al menos en el caso de la Na-K-ATPasa, estos cambios en la población

y distribución de mecanismos de permeación son realizados a pesar de la presencia de las uniones estrechas y sin que se abran en ellas brechas peligrosas para el pasaje de sustancias.

BIBLIOGRAFIA.

- Balcaronva-Stander, J., Pfeiffer, S.E., Fuller, S.D. y Simons, K. (1984). Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. *EMBO J.* 3:2687-2694.
- Barker, G., Lamb, J.F., Ogden, P. y Simons, N.L. (1978). The cellular distribution of ouabain-binding sites in monolayer cultures of dog kidney cells. *J. Physiol* 285:45 p - 47 p.
- Behrens, J., Birchmeier, W., Goodman, S.L. y Imhof, B.A. (1985). Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J. Cell Biol.* 101:1307-1315.
- Blobel, G. y Dobberstein, B. (1975a). Transfer of proteins across membranes. *J. Cell Biol.* 67:835-851.
- Blobel, G. y Dobberstein, B. (1975b). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* 67:852-862.
- Boller, K., Vetswever, D. y Kemler, R. (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 100:327-332.
- Bolívar, J.J. y Cerejido, M. (1987). Voltage and Ca^{++} -activated K^{+} channel in cultured epithelial cells (MDCK). *J. Membr. Biol.* 97:43-51.
- Bolívar, J.J., Lázaro, A., Fernández-Castelo, S., Stefani, E., Pena-Cruz, E., Lechene, C. y Cerejido, M. (1987). *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.* 22) 253:C151-C161.
- Brown, W.J., Constantinescu, E. y Farquhar, M.G. (1984). Redistribution of manose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. *J. Cell Biol.* 99:320-326.
- Brown, C.D.A. y Simmons, N.L. (1982). K^{+} transport in tight epithelial monolayers of MDCK cells. Evidence for a calcium-activated K^{+} channel. *Biochim. Biophys. Acta* 690:95-105.

- Caplan, M.J., Anderson, H.C., Palade, G.E. y Jamieson, J.D. (1986). Intracellular sorting and polarized cell surface delivery of $(Na^+,K^+)ATPase$, an endogenous component of MDCK cell basolateral plasma membranes. *Cell* 46:623-631.
- Cereijido, M., Bolivar, J.J. y Lazaro, A. (1983). An ouabain resistant epithelial cell that protects the wild type in co-cultures. *Fluegers Arch.* 405:S147-S151.
- Cereijido, M., Ehrenfeld, J., Fernandez-Castelo, S. y Meza, I. (1981a). Fluxes, junctions, and blisters in cultured monolayers of epithelioid cells (MDCK). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 372:422-441.
- Cereijido, M., Ehrenfeld, J., Meza, I. y Martinez-Palomo, A. (1980). Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.* 52:147-159.
- Cereijido, M., Gonzalez-Mariscal, L., y Borboa, L. (1983). Occluding junctions and paracellular pathways studied in monolayers of MDCK cells. *J. Exp. Biol.* 106:205-216.
- Cereijido, M., Meza, I. y Martinez-Palomo, A. (1981b). Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 240:C96-C102.
- Cereijido, M., Robins, E.S., Dolan, W.J., Rotuno, C.A., y Sabatini, D.D. (1976). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* 77:853-880.
- Cereijido, M., Rotuno, C.A., Robins, E.S., y Sabatini, D.D. (1976). Polarized epithelial membranes produced invitro. En: *Membrane Transport Processes*. Hoffman, J.F. Ed. 1:433-461.
- Chambard, M., Gabrion, J. y Mauchamp, J. (1981). Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J. Cell Biol.* 91:157-166
- De Camilli, P., Peluchetti, D. y Mendolesi, J. (1974). Structural difference between luminal and lateral plasmalemma in pancreatic acinar cells. *Nature (London)* 248:245-246.
- Doyle, G., Roth, M.G., Sambrook, J. y Gething, M.-J. (1985). Mutations in the cytoplasmic domain of the influenza virus haemagglutinin affect different stages of

intracellular transport. *J. Cell Biol.* 100:704-714.

Dragsten, P.R., Blumenthal, R. y Handler, J.S. (1981). Membrane asymetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in plasma membrane?. *Nature (London)* 294:718-722.

Dragsten, P.R., Handler, J.S. y Blumenthal, R. (1982). Fluorescent membrane probes and the mechanisms of maintenance of cellular asymmetry in epithelia. *Fed. Proc.* 41:48-53.

EKblom, P., Vetswever, D. y Kemler, R. (1986). Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2:27-47.

EKblom, P., Miettineu, A., Virtanen, L., Wahlstrom, T., Sawney, A. y Saxen, L. (1981). In vitro segregation of the metanephric nephron. *Dev. Biol.* 84:88-95.

EKblom, P. (1981a). Formation of membrane basaments in the embrionic kidney: an immunohistological study. *J. Cell Biol.* 91:1-10.

EKblom, P. (1981b). Determination and differentiation of the nephrone. *Med. Biol.* 59:139-160.

Fernández-Castelo, S., Bolivar, J.J., López-Vancell, R., Beaty, G. y Cerejido, M. (1985). Ion transport in MDCK cells. En *Tissue culture in the study of epithelial transport*.p. 37-50. Taub, M. (ed), Plenum Press, London.

Forbush, B. III., Kaplan, J.H. y Hoffman, J.F. (1978). Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptides and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 17:3667-3675.

Fuller, S.D. y Simons, K. (1986). Transferrin receptors: polarity and recycling accuracy in "tight" and "leaky" strains of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 103:1767-1779.

Fuller, S.D., von Donsdorff, C.-H. y Simons, K. (1985). Cell surface influenza haemagglutinin can mediate infection by other animal viruses. *EMBO J.* 4:2475-2485.

Galli, P., Brenna, A., De Camilli, P. y Meldolesi, J. (1976). Extracellular calcium and the organization of tight junctions in pancreatic acinar cells. *Exp. Cell Res.* 99:178-183.

- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G.W., Russell, D.W. y Schneider, W.J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1:1-39.
- González, A., Rizzolo, L., Rindler, M., Adesnik, M., Sabatini, D.D. y Gottlieb, T. (1987). Nonpolarized secretion of truncated forms of the influenza Hemagglutinin and the vesicular stomatitis virus G protein from MDCK cells. *Proc. Natl. Sci. USA.* 84:3738-3742.
- González-Mariscal, L., Bolívar, J.J., Contreras, G., Ponce, A. y Cereijido, M. (1988). Effect of calcium on the formation of tight junctions in monolayers of epithelial cells (MDCK). *Am. J. Physiol.* Submitted.
- González-Mariscal, L., Borboa, L., López-Vancell, R., Beaty, G. y Cereijido, M. (1985b). Electrical properties of MDCK cells. En *Tissue culture in the study of epithelial transport*. - . Taub, M. (ed), Plenum Press, London.
- González-Mariscal, L., Chávez de Ramírez, B., y Cereijido, M. (1985a). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J. Membr. Biol.* 86:113-125.
- Gottlieb, T.A., Beaudry, G., Rizzolo, L., Colman, A., Rindler, M., Adesnik, M. y Sabatini, D.D. (1986). Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:2100-2104.
- Green, R., Meiss, H.K. y Rodríguez-Boulan, E. (1981). Glycosylation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 89:230-239.
- Griffiths, G. y Simons, K. (1986). The trans golgi network: sorting at the exit site of the golgi complex. *Science* 234:438-443.
- Gumbiner, B. y Simons, K. (1986). A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J. Cell Biol.* 102:457-468.
- Hertzigler, D.A. y Ojakian, G.K. (1984). Studies on the development and maintenance of epithelial cell surface polarity with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 98:1777-1787.
- Hoi Sang, U., Saier, M.H., y Ellisman, M.H. (1980). Tight junction formation in the establishment of intramembranous

- particle polarity in aggregating MDCK cells. *Exp. Cell Res.* 128:223-235.
- Hortsch, M. Avossa, D. y Meyer, D.I. (1986). Characterization of secretory protein translocation: ribosome-membrane interaction in endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 103:241-253.
- Hughson, E., Wandinger-Ness, A., Gausepohl, H., Griffiths, G. y Simons, K. (1987). Plasma membrane proteins destined for the apical and the basolateral surfaces of an epithelial cell pass through the *Trans* golgi network. Enviado al *Eur. J. Cell Biol.*
- Imhof, B.A., Vollmers, H.P., Goodman, S.L. y Birchmeier, W. (1983). Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* 35:667-675.
- Jesaitis, A.J. y Yguerabide, J. (1986). The lateral mobility of the (Na^+,K^+) -dependent ATPase in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Cell Biol.* 102:1256-1263.
- Kennedy, B.G. y Lever, J.E. (1984). Regulation of Na^+,K^+ -ATPase activity in MDCK kidney epithelial cell cultures: role of growth state, cyclic AMP, and chemical inducers of dome formation and differentiation. *J. Cell Physiol.* 121:51-63.
- Kyte, J. (1976). Immunoferritin determination of the distribution of (Na^++K^+) ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. II. Proximal segment. *J. Cell Biol.* 68:304-318.
- Lamb, J.F., Ogden, P. y Simmons, N.L. (1981). Autoradiographic localization of $[^3]Houabain$ bound to cultured epithelial cell monolayers of MDCK cells. *Biochim. Biophys. Acta* 644:333-340.
- Louvard, D. (1980). Apical membrane aminopeptidase appears at sites of cell-cell contact in cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4133-4136.
- Madden, M.E. y Sarras, M.P. (1985). Development of an apical plasma membrane domain and tight junction during the histogenesis of the mammalian pancreas. *Dev. Biol.* 112:427-442.
- Matlin, K., Bainton, D.F., Pesonen, M., Louvard, D., Genty, N. y Simons, K. (1983). Transepithelial transport of a viral membrane glycoprotein implanted into the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. I. Morphological evidence. *J. Cell Biol.* 97:627-637.

- Matlin, K.S. y Simons, K. (1983). Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* 34:233-243.
- Mauchamp, J., Margolat, A., Chambard, M., Charrier, B., Remy, L. y Michel-Bechet, M. (1979a). Polarity of three-dimensional structures derived from isolated dog thyroid cells in primary culture. *Cell Tissue Res.* 204:417-430.
- Mauchamp, J., Charrier, B., Takasu, N., Margolat, A., Chambard, M. y Dumas, M. (1979b). Modulation by thyrotropin, prostaglandin E₂ and catecholamins of sensitivity of acute stimulation in cultured thyroid cells. En *Hormones and Cell Regulation* 3:51-68. Dumont, J. y Nunez, J. Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Mauchamp, J., Chambard, M., Gabrion, J. y Pelassy, C. (1980). Polarisation morphologique et fonctionnelle d'un epithelium simple en culture: le modele thyoidien. *C. R. Soc. Biol.* 174:241-256.
- McQueen, N., Nayak, D.P., Stephens, E.B. y Compan, R.W. (1986). Polarized expression of a chimeric protein in wich 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.
- McRoberts, J.A., Erlinger, S., Rindler, M.J. y Saier, M.H. (1982). Furosemide sensitive salt transport in the Madin-Darby canine kidney cell-line: evidence for co-transport of Na⁺, K⁺ and Cl⁻. *J. Biol. Chem.* 257:2260-2266.
- Meldolesi, J., Castiglione, G., Parma, R., Nassivera, N. y De Camilli, P. (1978). Ca⁺⁺-dependent disassembly and reassembly of occluding junctions in guinea pig pancreatic acinar cells. *J. Cell Biol.* 79:156-172.
- Meyer, D.I. y Dobberstein, B. (1980). Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 87:503-508.
- Meza, I., Ibarra, G., Sabanero, M., Martinez-Palomo, A. y Cereijido, M. (1980). Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.* 87:746-754.

- Michl, J., Pieczonka, M.M., Unkeles, J.C. y Silverstein, S.C. (1979). Effects of immobilized immune complex on Fc- and complement-receptor function in resident and thiolglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 150:607-621.
- Moore, H., Gumbiner, B. y Kelly, R. (1983). Chloroquine diverts ACTH from a regulated to a constitutive secretory pathway in AtT-20 cells. *Nature* 302:434-436.
- Mostov, K.E. y Simister, N.E. (1985). Transcytosis. *Cell* 43:389-390.
- Mullins, J., FluK, L. y Tchao, R. (1985). Mitosis in domes of renal epithelial (LLC-PK₁) cell cultures. *Molecular Physiol.* 8:317-328.
- Nelson, W.J. y Veshnock, P.J. (1986). Dynamics of membrane-skeleton (Fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Cell Biol.* 103:1751-1765.
- Nitsh, L. y Wollman, S.H. (1980). Ultrastructure of intermediate stages in polarity reversal of thyroid epithelium in follicles in suspension culture. *J. Cell Biol.* 86:875-880.
- Pesonen, M., Ansorge, W. y Simons, K. (1984). Transcytosis of the G protein of the vesicular stomatitis virus after implantation into the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. I. Involvement of endosomes and lysosomes. *J. Cell Biol.* 99:796-802.
- Pesonen, M., Bravo, R. y Simons, K. (1984). Transcytosis of the G protein of the vesicular stomatitis virus after implantation into the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. II. Involvement of the golgi complex. *J. Cell Biol.* 99:803-809.
- Pitelka, D.R., Toggart, B.N. y Hamamoto, S.T. (1983). Effects of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding junctions of mammary epithelial cells in culture. *J. Cell Biol.* 96:613-624.
- Pisani, M. y Ripoche, P. (1976). Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. *J. Cell Biol.* 71:907-920.
- Rabito, C.A. (1984). Permeability properties of the occluding junctions in an epithelial cell line (LLC-PK₁) with characteristics of renal proximal tubular cells. *Fed. Proc.* 43:448. (abstr).

- Rabito, C.A., Kreisberg, J.I. y Wight, D. (1984). Alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase as polarization markers during the organization of LLC-PK₁ into an epithelial membrane. *J. Biol. Chem.* 10:574-582.
- Rabito, C.A. y Tchao, R. (1980). [³H]Ouabain binding during the monolayer organization and cell cycle in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 238:C43-C48.
- Richardson, J.C.W. y Simons, N.L. (1979). Demonstration of protein asymmetries in the plasma membrane of cultured renal (MDCK) epithelial cells by lactoperoxidase-mediated iodination. *FEBS Lett.* 105:201-204.
- Rindler, M.J. y Sailer, M.H. (1981). Evidence for Na⁺/H⁺ antiport in cultured dog kidney cells (MDCK). *J. Biol. Chem.* 256:10820-10825.
- Rindler, M.J., Ivanov, I.E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E y Sabatini, D.D. (1984). Viral glycoproteins destined for the apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same golgi apparatus during their intracellular transport in double infected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 98:1304-1319.
- Rindler, M.J., McRoberts, J.A. y Sailer, M.H. (1982). (Na⁺, K⁺)-cotransport in the Madin-Darby canine kidney cell-line: Kinetic characterization of the interaction between Na⁺ and K⁺. *J. Biol. Chem.* 257:2254-2259.
- Rodriguez-Boulan, E., Paskiet, K.T., Salas, P.J.I. y Bard, E. (1984). Intracellular transport of influenza virus haemagglutinin to the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 98:308-319.
- Rodriguez-Boulan, E. y Pendergast, M. (1980). Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells. *Cell* 20:45-54.
- Rodriguez-Boulan, E. y Sabatini, D.D. (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:5071-5075.
- Rodriguez-Boulan, E. (1983). Membrane biogenesis, enveloped RNA viruses, and epithelial polarity. *Mod. Cell Biol.* 1:119-170.
- Rodriguez-Boulan, E., Paskiet, K.T. y Sabatini, D.D. (1983a).

- 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.
- Roman, L.M. y Garoff, H. (1985). Effect of deletions in the cytoplasmic tail of a transmembrane glycoprotein on transport to the basolateral domain of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 101 (5 pt. 2):105a. (abstr.).
- Roman, L.M. y Garoff, H. (1986). Alteration of the cytoplasmic domain of the membrane-spanning glycoprotein p62 of Semliki Forest Virus does not affect its polar distribution in established lines of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 103:2607-2618.
- Roth, M.G., Compans, R.W., Giusti, L., Davis, A.R., Nayak, D.P., Gething, M.-J. y Sambrook, J. (1983). Influenza virus haemagglutinin expression is polarized in cells infected with recombinant Sv 40 viruses carrying cloned haemagglutinin DNA. *Cell* 33:435-443.
- Roth, M.G., Fitzpatrick, J.F. y Compans, R.W. (1979). Polarity of influenza and vesicular stomatitis virus maturation in MDCK cells: lack of requirement for glycosylation of viral glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:6430-6434.
- Roth, M.G., Gundersen, D., Patil, N. y Rodriguez-Boulan, E. (1987). 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.
- Ruoho, A., y Kyte, J. (1974). Photoaffinity labelling of the ouabain binding site on Na,K-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:2352-2356.
- Sabanero, M., Gonzalez-Robles, A. y Meza, I. (1985). Characterization of a 36,000-dalton protein from the surface of Madin-Darby canine kidney epithelial cells involved in cell attachment and spreading. *J. Cell Biol.* 100:2001-2007.
- Saier, M.H. y Boyden, D.A. (1984). Mechanisms, regulation and physiological significance of the loop diuretic-sensitive NaCl/KCl symport system in animal cells. *Moll. Cell Biochem.* 59:11-32.
- Salas, P.J.I., Misek, D.E., Vega-Salas, D.E., Gundersen, D., Cereijido, M. y Rodriguez-Boulan, E. (1986). Microtubules and actin filaments are not critically involved in the biogenesis of epithelial cell surface polarity. *J.*

Cell Biol. 102:1853-1867.

- Salas, P.J.I., Vega-Salas, D.E. y Rodriguez-Boulán, E. (1984). Binding of MDCK cells to a collagen substratum: the initial stage of epithelial cell polarity. *J. Cell Biol.* 99 (4 pt. 2):280a (abstr.).
- Silverstein, S.C., Steinman, R.M. y Cohn, Z.A. (1977). Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:669-722.
- Spiegel, S., Blumenthal, R., Fishman, P.H. y Handler, J.S. (1985). Gangliosides do not move from apical to basolateral plasma membrane in cultured epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 821:310-318.
- Steele, R.E., Preston, A.S., Johnson, J.P. y Handler, J.S. (1986). Porous-bottom dishes for culture of polarized cells. *Am. J. Physiol.* 251:C136-C139.
- Strous, G., Du Maine, A., Zijderhand-Bleekemolen, J., Slot, J. y Schwartz, A. (1985). Effect of lysosomotropic amines on the secretory pathway and on the recycling of the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells. *J. Cell Biol.* 101:531-539.
- Turner, R.J., Thompson, J., Sariban-Sohraby, S. y Handler, J.S. (1985). Monoclonal antibodies as proof of epithelial membrane polarization. *J. Cell Biol.* 101:2173-2180.
- Van Meer, G. y Simons, K. (1986). The function of tight junction in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* 5:1455-1464.
- Van Meer, G., Gumbiner, B. y Simons, K. (1986). The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature (London)* 322:639-641.
- Vega-Salas, D.E., Salas, P.J.I., Gundersen, D. y Rodriguez-Boulán, E. (1987). Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells: polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* 104:905-916.
- Vega-Salas, D.E., Salas, P.J.I. y Rodriguez-Boulán, E. (1987). Modulation of the expression of an apical plasma membrane protein of Madin-Darby canine kidney epithelial cells: cell-cell interactions control the appearance of a novel intracellular storage compartment. *J. Cell Biol.* 104:1249-1259.

- Vestweber, D. y Kemler, R. (1985). Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO J.* 4:3393-3398.
- Walter, P. y Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for the translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7112-7116.
- Yoshida-Noro, C, Suzuki, N. y Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell-adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev. Biol.* 101:19-27.
- Ziomec, C.A., Schulman, S. y Edidin, M. (1980). Redistribution of membrane proteins in isolated mouse intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 66:849-857.

A P E N D I C E .

Publicaciones derivadas de esta tesis:

Cereijido, M., Gonzales-Mariscal, L., Avila, G. y Contreras, G.
(1987). Tight junctions. *CRC reviews*. En prensa.

Contreras, G., Cereijido, M., Avila, G. y Rodriguez-Boulán, E.
(1988). The polarized distribution of Na-K-ATPase in
epithelial cells (MDCK). Enviado a publicación al *J.
Cell Biol.*

Participaciones en congresos con los resultados de esta tesis:

Contreras, G., Lázaro, A. Bolívar, J.J. y Cereijido, M. (1987).
La distribución polarizada de la Na-K-ATPasa en las
células epiteliales implica un mecanismo que la quita de
la región apical. XXX Congreso Nacional de Ciencias
Fisiológicas. Resumen 144.

Contreras, G., Rodriguez-Boulán, E. and Cereijido, M. (1987).
Removal of Na-K-ATPase from the apical (wrong) position
in MDCK cells. *J. Cell Biol.* (4 pt. 2) 105:58a.
(absrt. 317).