

Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante **Dr. Pablo Cid S.** Centro de Estudios Científicos

Profesor Co-Patrocinante **Dra. Ilona Concha G.** Instituto de Bioquímica Facultad de Ciencias

## LOCALIZACIÓN BASOLATERAL DEL CANAL DE CLORURO CIC-2 EN LÍNEAS CELULARES EPITELIALES

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de *Licenciado en Bioquímica* y Título Profesional de *Bioquímico* 

# GASPAR AQUILES PEÑA MÜNZENMAYER

VALDIVIA – CHILE

2005

Dedicado a mis padres Gladys y Conrado, mis hermanos Paulina y Eduardo, y a Hanile.

Agradezco a Pablo Cid, por la confianza depositada en mí, entregarme su guía y apoyo constante durante todo el trabajo desarrollado. Gracias por la constante preocupación por la formación del alumno, esas son las herramientas más valiosas para el futuro. A los investigadores del CECS, Pancho, Icha, Felipe y Steffen por haberme acogido en el laboratorio, por su compañerismo, apoyo y formación. Gracias a Jaime Figueroa, por su apoyo como profesor y amigo durante muchos años, a la Dra. Ilona Concha por su labor formativa en mis años de universidad. Gracias a ellos por abrirme las puertas de sus laboratorios.

Agradezco a mis padres Gladys y Conrado, por el apoyo incondicional en todo lo que hago, su amor y cariño han sido el empuje durante toda mi vida, y lo seguirán siendo. Gracias por entregarme una hermosa familia y las herramientas para la lucha diaria, para alcanzar las metas y sueños, y la fortaleza para levantarse en los fracasos. Gracias por confiar en mí, y darme todas las oportunidades que un hijo podría pedir, gracias por la vida en Futaleufú, es maravillosa. A mis hermanos Paulina y Eduardo, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, y ser un apoyo constante. Gracias por entregar esa alegría contagiosa, y saber que puedo contar siempre con ustedes. Agradezco a Hanile por todo su amor, cariño y apoyo durante todos estos años, gracias por estar junto a mí, acompañarme y entenderme.

Gracias a mis queridos amigos Yogui, Iván, Rodrigo, René, Denise, Chani, Jessica, Pato y Andrés por su amistad durante tantos años y tantos buenos momentos vividos.

A mis compañeros del laboratorio Marcelo, Omar, Leandro, Joel, Yasna, Isabel, Carlos Flores C., Carlos Flores P., Yamil, Areli, Carla, Carolina, Javier, Etiene, Teresa y Segundo por su amistad, compañerismo y buena onda.

Esta tesis fue realizada gracias al proyecto FONDECYT Nº1020652.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos	
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Lista de abreviaturas	vii
1. Resumen	1
1.1 Summary	2
2. Introducción	3
<b>2.1</b> ClC-2, un canal activado por voltaje	3
<b>2.2</b> ClC-2 en el cerebro	5
<b>2.3</b> ClC-2 en epitelios	7
2.4 Determinantes de la polarización	14
2.5 Hipótesis	18
<b>2.6</b> Objetivos generales	18
2.7 Objetivos específicos	19
3. Material y métodos	20
3.1 Material	20
3.2 Métodos	22
3.2.1 Digestión con enzimas de restricción	22
<b>3.2.2</b> Electroforesis en gel de agarosa	22
3.2.3 Extracción de fragmentos de DNA de un trozo de gel	24
3.2.4 Ligación de fragmentos de DNA	24

Página

3.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
<b>3.2.6</b> Transformación de células competentes	26
3.2.7 Purificación de DNA plasmidial por el método de escala pequeña (Miniprep)	29
3.2.8 Purificación de DNA plasmidial por el método de gran escala (Midiprep)	30
3.2.9 Cuantificación de DNA por espectrofotometría	30
<b>3.2.10</b> Cultivo celular	31
3.2.11 Plasmidios	31
3.2.12 Transfecciones	34
3.2.13 Inmunofluorescencia	35
3.2.14 Microscopía confocal	36
3.2.14 Resistencia transepitelial	37
4. Resultados	38
<b>4.1</b> Plasmidios de ClC-2 recombinante	38
<b>4.2</b> Transfecciones agudas en monocapas celulares	50
<b>4.2.1</b> Expresión diferencial de ClC-2 en células epiteliales sembradas en cubre objetos	50
4.2.2 Expresión de ClC-2 en células epiteliales sembradas en filtros permeables	56
<b>4.3</b> Controles de polarización celular	61
<b>4.3.1</b> Resistencia transepitelial	61
<b>4.3.2</b> Inmunolocalización de la proteína ZO-1	65
<b>4.4</b> Co-detección de ClC-2 y ZO-1	67
<b>4.5</b> Mutaciones de ClC-2 en motivos de direccionamiento	71
5. Discusión	80
5.1 Transfecciones agudas	83

5.2 Controles de polarización	85
5.3 Expresión polarizada de ClC-2 silvestre	88
5.4 Expresión de mutantes en residuos de tirosinas de ClC-2	91
5.5 Expresión de mutantes de di leucinas de ClC-2	94
5.6 Conclusiones	105
5.7 Proyecciones del trabajo	106
6. Bibliografía	108

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vectores de expresión recombinantes.	40
Figura 2: Modelo topológico para los canales de la familia ClC.	41
Figura 3: Generación del vector pClC2∆16-61-GFP.	43
Figura 4: Generación del vector pClC-2Y555F-GFP.	45
Figura 5: Esquema PCR 1.	47
Figura 6: Esquema PCR 2.	48
Figura 7: Separación electroforética de los productos de las PCR 1 y 2.	49
Figura 8: Generación del vector pClC-2Y64A-GFP.	51
Figura 9: Digestiones con enzimas de restricción del vector ClC-2Y64A-GFP.	52
Figura 10: Expresión basolateral de ClC-2.	55
Figura 11: Expresión diferencial de ClC-2.	57
Figura 12: Sistema de filtros permeables.	59
Figura 13: Expresión de ClC-2 en filtros permeables.	60
Figura 14: Células MDCK formando una monocapa.	62
Figura 15: Esquema de una cámara de Ussing.	64
Figura 16: Inmunolocalización de la proteína ZO-1.	68
Figura 17: Co-detección de ClC-2 y ZO-1.	70
Figura 18: Ubicación de los motivos de direccionamiento.	73
Figura 19: Expresión de mutantes de ClC-2 para motivos de tirosina.	75
Figura 20: Expresión diferencial de mutantes de di leucinas.	77
Figura 21: Co-detección del mutante LL812-813AA con ZO-1.	79

Figura 22. Esquema del direccionamiento de proteínas en epitelios.	81
Figura 23. Mecanismo posible de direccionamiento 1.	100
Figura 24. Mecanismo posible de direccionamiento 2.	103

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacción de digestión con enzimas de restricción.	23
Tabla 2. Reacción de ligación de fragmentos de DNA.	25
Tabla 3. Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).	27
Tabla 4. Programa de ciclos de la PCR.	28
Tabla 5. Resistencias transepiteliales de las monocapas celulares.	66

Página

## LISTA DE ABREVIATURAS

μl: microlitro
μm: micrómetro
pb: pares de bases
Kb: Kilo bases
mV: milivoltios
mA: miliamperios
R: resistencia
U: unidades enzimáticas
dNTPs: desoxi nucléotidos di fosfato
IPTG: isopropil-β-D-thiogalactósido
DO<sub>260</sub>: densidad óptica medida a 260 nm
CIC-2: chloride channel 2
hSlo: human Slowpoke channel

GFP: green fluorescent protein

ZO-1: zónula occludens 1

SFB: suero fetal bovino

#### **1. RESUMEN**

El canal de cloruro ClC-2 está ampliamente expresado tanto en células epiteliales como en otros tipos celulares. Muchas de las funciones que se le han atribuido en células epiteliales, como participar en la secreción o absorción de fluidos, requieren de su expresión polarizada. En el colon, ClC-2 se expresa basolateralmente en las células del epitelio superficial, sugiriendo un papel en la absorción de fluidos. Sin embargo, existe controversia respecto a la localización subcelular del ClC-2 en células epiteliales. Para resolver este punto se evaluó la polarización del canal recombinante en líneas celulares polarizadas. Las células se crecieron en cubre objetos o filtros permeables y se realizaron transfecciones agudas del canal recombinante fusionado a la proteína fluorescente verde, o marcado con el epítope HA. La confluencia de las células se evaluó por inmunolocalización de la proteína ZO-1 de las uniones estrechas y medición de la resistencia transepitelial. Mediante microscopía confocal se observó que el canal presenta una expresión basolateral en células MDCK, Caco-2 y LLCPK-1 µ1B, mientras que en LLCPK-1 µ1A se observó expresión no polarizada. Se analizaron mutaciones en motivos de direccionamiento basados en tirosinas ó di-leucinas, presentes en ClC-2, y se observó que la mutación de la di leucina 812-813 por alaninas, cambió el direccionamiento basolateral de ClC-2 a una localización apical en células MDCK. Estos resultados permiten concluir que ClC-2 es un canal basolateral en líneas celulares polarizadas y que en dicho direccionamiento participan un motivo de di leucina, presente en extremo carboxilo terminal del canal, y la proteína µ1B del complejo adaptador de clatrina AP-1.

#### **1.1 SUMMARY**

The chloride channel ClC-2 is widely expressed in epithelial cells and other cells types. Many of the functions that have been attributed to ClC-2 in epithelial cells, such as a participation in fluid secretion or absorption, require a polarized expression. In the colon, ClC-2 is expressed basolaterally in cells of the surface epithelium, suggesting a role in fluid absorption. There is, however, controversy about the subcellular localization of ClC-2 in epithelial cells. To resolve this controversy, we have assessed the polarization of recombinant channel in polarized cell lines. Cells were grown upon glass coverslips or permeable membranes, and transient transfections were done with the recombinant channel fused to green fluorescence protein or HA tagged. The confluence of cells was assessed by immunolocalization of the tight junction protein ZO-1 and by measuring transepithelial resistance. Confocal microscopy revealed that the channel has a basolateral expression in MDCK, Caco-2 and LLCPK1 µ1B cells, while in LLCPK1 µ1A there was no polarized expression. We analyzed mutations of potential targeting motifs based in tyrosine or di-leucine. Mutation of di-leucine 812-813 to di-alanine changed the basolateral targeting of ClC-2 to an apical location in MDCK cells. These results allow us to conclude that ClC-2 is a basolateral channel in polarized cell lines. A di-leucine motif within the C-terminus of channel directs its targeting which requires the µ1B protein subunit of clathrin adaptor complex AP-1.

## 2. INTRODUCCIÓN

#### 2.1 ClC-2, un canal activado por voltaje.

El canal de cloruro ClC-2 es una proteína integral de membrana, de aproximadamente 99 Kilo Daltons, que pertenece a la familia de canales de cloruro activados por voltaje, con una topología de transmembrana similar al resto de los miembros de esta familia. Presenta doce dominios de transmembrana, con los extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia el espacio intracelular, y la presencia de dos motivos CBS (Cistationina- $\beta$  sintasa) en el extremo carboxilo terminal (Jentsch et al., 1990, Steinmeyer et al., 1991, Schmidt-Rose and Jentsch, 1997). Esta familia consta de nueve miembros en mamíferos, con una homología de secuencia que varia del 30 al 90% (Jentsch et al., 1999). Esta diversidad se incrementa por la presencia de splicing alternativo como se ha demostrado para CIC-2 (Chu et al., 1996, Chu, S. and Zeitlin, P.L. 1997, Cid et al., 2000). Análisis de cristalografía de rayos X en dos canales CIC bacterianos (EcClC y StClC), han demostrado que se encuentran formando dímeros, compuestos por dos subunidades idénticas (homo-dímeros), (Dutzler et al., 2002). Se ha identificado la presencia de estos canales tanto en la membrana plasmática como en la membrana de organelos intracelulares. La importancia fisiológica de algunos de estos canales se ha verificado por distintas enfermedades producidas por mutaciones en sus genes. Así, mutaciones en ClC-1, específico del músculo, produce miotonía (Koch et al., 1992), una enfermedad asociada a hiperexitabilidad eléctrica en la membrana de las células musculares. Mutaciones en el canal ClC-Kb causa una forma del síndrome de Bartter, una enfermedad asociada con pérdida masiva de sal en el riñón (Simon et al., 1997), lo que da cuenta de una función a nivel de la membrana plasmática en el transporte transepitelial. La enfermedad de Dent, que produce proteinuria, cálculos renales y falla renal, se genera por mutaciones en el canal CIC-5 (Lloyd *et al.*, 1996), éste se expresa en la membrana de endosomas y probablemente contribuye a su acidificación (Günther *et al.*, 1998). Un modelo de ratón *knock out* para el canal CIC-3, presente en endosomas y vesículas sinápticas, genera la pérdida degenerativa del hipocampo y los fotorreceptores (Stobrawa *et al.*, 2001). Mutaciones en el canal CIC-7, generan osteoporosis severa en modelos murinos y en humanos. Este canal también está relacionado con acidificación de endosomas. (Kornak *et al.*, 2001). Para el canal CIC-2 sin embargo, la función no es tan clara.

CIC-2 está ampliamente expresado en distintos tejidos y tipos celulares. Por análisis de *Northern blot*, se ha visto su expresión en tejido cardíaco, cerebro, pulmón, riñón, páncreas, estómago, intestino, hígado, así como en las líneas celulares T84 y Caco-2 (derivadas de intestino humano), Hela, CHO, Neuro-2A, A10, COS, PC-12 (Thiemann *et al.*, 1992). En condiciones de reposo este canal permanece cerrado, sin embargo se observa una activación lenta a potenciales hiperpolarizantes, presentando una secuencia de selectividad aniónica del tipo  $CI^{-} \ge Br^{-} \ge \Gamma$  (Thiemann *et al.*, 1992). Se ha reportado una activación dependiente de hinchamiento celular por shock hipotónico, en experimentos donde el canal ha sido expresado en oocitos de anfibios (Gründer *et al.*, 1998). CIC-2 también es activado por acidificación del pH extracelular, alcanzando mayor activación a pH 6,5 (Jordt and Jentsch, 1997). Sin embargo, a pH menores a 6,5 el canal se inhibe (Arreola *et al.*, 2002). También se ha propuesto, un mecanismo de activación dependiente de Proteína kinasa A (PKA) (Sherry *et al.* 1997). Finalmente, se ha demostrado un efecto del cloruro intracelular sobre la conductancia de CIC-2, sugiriendo una activación por el ion permeante (Pusch *et al.*, 1999, Catalán *et al.*, 2004).

La amplia distribución del canal en distintos tejidos y tipos celulares ha sido verificada tanto por técnicas de biología molecular, inmuno análisis y por electrofisiología, identificándose las corrientes características de ClC-2. Estas corrientes son bloqueadas por cationes divalentes, especialmente por cadmio, por pH alcalino y pH ácido menor a 6,5. Se desarrollan con una activación lenta sólo a potenciales hiperpolarizantes, mientras que a potenciales despolarizantes el canal no se abre, lo que hace que el ClC-2 sea un rectificador de entrada. Para un canal de cloruro esto significa que permite la salida del ión desde el espacio intracelular, o el ingreso del cloruro hacia el interior de un organelo, dependiendo de la localización del canal.

Estas características de activación han generado muchas especulaciones respecto a la función del canal en condiciones fisiológicas, ya que al permitir la salida del cloruro desde el interior de la célula, debería tener una importante participación en la homeostasis de este ion, y con ello un rol en el equilibrio electroquímico, salino y osmótico de los sistemas celulares en los cuales se expresa. Por esta razón, numerosos estudios le han atribuido distintas funciones a CIC-2, dependiendo del tejido, el tipo celular, y de su distribución subcelular.

#### 2.2 ClC-2 en cerebro.

ClC-2 se expresa en forma importante en el cerebro (Thiemann *et al.*, 1992), por lo que se cree podría estar cumpliendo funciones, ya sea en el equilibrio de la concentración de electrolitos, tanto en neuronas en reposo y en actividad sináptica, o en la mantención de dicho equilibrio a nivel de células gliales, por lo cual estaría cumpliendo una función de regulación de las concentraciones de cloruro en el micro ambiente del sistema nervioso central.

En experimentos utilizando rebanadas de cerebro de ratones adultos, se ha demostrado la presencia de las corrientes características de ClC-2 en astrocitos. Esta conductancia de cloruro es regulada con el desarrollo del animal, y está presente predominantemente en células de ratón adulto, esto sugiere un rol importante del canal en astrocitos diferenciados y maduros (Makara *et al.*, 2003). En estudios de inmuno tinción se encontró la presencia de ClC-2 en los pies terminales de astrocitos en contacto con capilares (Sík *et al.*, 2000), este hallazgo podría sustentar un posible rol de ClC-2 en la disminución de la concentración de cloruro intracelular en astrocitos durante la actividad sináptica. Otros autores han propuesto un rol para ClC-2 en la regulación del volumen celular de los astrocitos, ya que se observó que la conductancia tipo ClC-2 en estas células en cultivos primarios, fue sensible a cambios en el volumen celular (Fava *et al.*, 2001). Sin embargo, la participación de ClC-2 en la regulación del volumen celular, es controversial, ya que este tipo de activación se describió para el canal recombinante expresado en oocitos de anfibio (Gründer *et al.*, 1992), mientras que en otros tipos celulares no se ha observado lo mismo (Strange, 2002).

La presencia de ClC-2 en cerebro también ha sido identificada en neuronas, y se ha postulado su participación en la homeostasis del cloruro en neuronas GABAérgicas (Staley, 1994). Las sinapsis inhibitorias mediadas por el receptor de GABA<sub>A</sub>, dependen del flujo de cloruro a través del receptor, lo que causa una hiperpolarización de la membrana celular, y la subsecuente inhibición de la transmisión sináptica. Esta actividad inhibitoria, depende de la concentración intracelular de cloruro, la cual debe mantenerse por debajo del potencial de equilibrio del cloruro (ECl<sup>-</sup>), (Andersen *et al.*, 1980), evitando así una acumulación de cloruro intracelular que generaría depolarización mediada por el receptor de GABA<sub>A</sub> (Alvarez-Leefmans 2001, Alvarez-Leefmans *et al.*, 1988). En este contexto se ha postulado una posible participación

de ClC-2 en el mantenimiento de los niveles bajos de cloruro intracelular en neuronas GABAérgicas, tras la actividad inhibitoria del receptor de GABA<sub>A</sub>, así como en la homeostasis del cloruro en distintos estadíos de la maduración y desarrollo cerebral, esto debido a que se ha demostrado una expresión diferencial de ClC-2 en distintas etapas del desarrollo (Clayton et al., 1998, Staley, 1994). Sin embargo, un mecanismo pasivo de extrusión de cloruro en la célula, generado por un canal, es incapaz de mantener una concentración de cloruro intracelular por debajo del potencial de equilibrio de este ion. Se ha demostrado que un proceso de contransporte de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> dependiente del cotransportador KCC2, es el principal mecanismo para mantener una baja concentración de cloruro intracelular en neuronas GABAérgicas (Thompson y Gahwiler, 1989, Rivera et al., 1999). Sin embargo, bajo intensa actividad sináptica, la tasa y dirección del transporte por KCC2 se ve alterada (Thompson y Gahwiler, 1989, Payne, 1997), por lo que se postula que bajo estas condiciones, la apertura de ClC-2 evitaría la acumulación de cloruro intracelular, evitando una potencial respuesta excitatoria mediada por GABA. Así se ha propuesto que mutaciones que alteran su función estarían relacionadas con ciertos tipos de epilepsia. Esto se debería a una disminución en la tasa de extrusión del cloruro en condiciones de intensa actividad, lo que generaría que la respuesta inhibitoria de GABA se vería reducida o incluso podría llegar a ser excitatoria, resultando en hiper excitabilidad y generación de rasgos epilépticos (Haug et al., 2003).

## 2.3 ClC-2 en epitelios.

En muchas de las funciones que se le han atribuido a ClC-2 se requiere de una expresión específica del canal en ciertos tipos celulares, e incluso de localización subcelular específica,

como se ha observado en astrocitos donde se ubica en los pies terminales de estas células (Sík et al., 2000). Esta característica se ve mejor reflejada en muchos estudios que se han llevado a cabo en relación a la ubicación subcelular y función del canal en epitelios, donde se ha propuesto un rol en el movimiento transepitelial de fluidos, a través del transporte vectorial de cloruro. La dirección de este movimiento, ya sea en sentido absortivo o secretor, depende de la ubicación del canal en los distintos dominios de las membranas de estas células.

Los epitelios realizan importantes funciones de transporte de metabolitos, sales, agua y nutrientes, este transporte vectorial es posible debido a las características polarizadas de estas células, es decir, diferentes regiones de la célula difieren estructural y funcionalmente. Presentan dos dominios distintos de membrana, apical y basolateral, que expresan una batería de transportadores, canales iónicos y bombas, específicos de cada dominio. Estas propiedades son esenciales para que el epitelio pueda realizar un transporte transepitelial neto. Además, estos dominios de la membrana plasmática presentan diferencias estructurales y en la composición de las proteínas y fosfolípidos que las componen.

Las células epiteliales presentan una serie de uniones intercelulares, formadas por complejos proteicos, entre ellas están las tight junctions (uniones estrechas), desmosomas y gap junctions (uniones en hendidura). Los desmosomas son zonas de adhesión mecánica entre las células y están formadas por moléculas CAM (*cell adhesion molecules*), estas proteínas denominadas caderinas están unidas al citoesqueleto por su región citoplasmática, y su región extracelular proporciona una fuerte interacción con caderinas de las células vecinas.

Las uniones en hendiduras son canales que comunican el citosol de dos células adyacentes. Cada célula contribuye con un conexón, que es un hexámero de proteínas de transmembrana denominadas conexinas. La organización espacial de estas proteínas forma un canal que comunica a ambas células.

Las uniones estrechas, proporcionan una separación física entre la membrana apical y basolateral, evitando el movimiento de proteínas entre estos dos dominios de la membrana plasmática. Además, realizan una función de barrera al transporte intercelular de sustancias polares (Diamond, 1977), aunque este transporte al parecer puede ser regulado en ciertos epitelios, en los cuales se ha observado un flujo paracelular de ciertos iones como Mg<sup>++</sup> (Simon *et al.*, 1999). Dentro de las proteínas que participan en las uniones estrechas, una de las principales es ocludina, que se cree es la responsable de la unión célula-célula (Furuse *et al.*, 1993, Gumbiner, 1993). Otras proteínas como ZO-1, contribuyen al ensamblaje de las uniones estrechas desde la región intracelular, y las claudinas, se cree que participarían en el transporte paracelular de iones (Furuse *et al.*, 1998).

ClC-2 se expresa en varios epitelios, sin embargo, su localización subcelular, así como su función ha resultado controversial.

En la secreción de HCl en la mucosa estomacal, los protones son secretados activamente en la membrana apical de las células parietales gástricas por una H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPasa (Sachs *et al.*, 1976), sin embargo, no se ha establecido cual es la entidad molecular implicada en la secreción apical del cloruro. En este contexto, se ha postulado la participación de CIC-2 en la secreción de cloruro en la mucosa gástrica. Malinowska y colaboradores en 1995, clonaron un canal de cloruro con las características de CIC-2, de la mucosa gástrica de conejo. Se estableció que el canal clonado tenía una similitud de 93% con el CIC-2 de cerebro de rata, pero presentaba una región con numerosos cambios introducidos en un loop intracelular, además algunas características variante de *splicing* de ClC-2, que sería activado por voltaje, PKA y por el bajo pH extracelular del lumen del estómago. En otro estudio realizado en mucosa gástrica de conejo, se utilizaron técnicas inmunológicas y de hibridización in situ, para demostrar la presencia de ClC-2 en las células parietales gástricas (Sherry et al., 2001). Se reportó la presencia de mRNA de ClC-2 en las mismas células donde se expresa la H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPasa. Mediante estudios de inmuno histoquímica se analizó la expresión de la proteína. Se utilizó inmunofluorescencia e inmunolocalización con partículas de oro, para demostrar la presencia de ClC-2 en un compartimento intracelular, similar a los canalículos secretorios de las células parietales activadas por bajo pH extracelular y en túbulo vesículas en células en reposo, con una distribución similar a la encontrada para la H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa. Estos compartimentos se encontraron cercanos a la membrana apical de las células secretorias, pero nunca a la basolateral. Sin embargo, en un estudio reciente, en el que se utilizaron dos anticuerpos distintos para analizar la presencia de ClC-2, en la mucosa gástrica de conejo, rata y humano, no se observó expresión de la proteína en las células parietales, en contraste con la abundante expresión de H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa (Hori et al., 2004). Este estudio indica que CIC-2 no puede ser la entidad molecular responsable del transporte de cloruro en la secreción de HCl en el estómago.

Otro de los tejidos donde se ha propuesto una participación de ClC-2, es el epitelio de las vías aéreas.

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica rescesiva causada por mutaciones en el canal de cloruro CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). La pérdida de la función de CFTR, produce una alteración en el transporte de electrolitos en el epitelio pulmonar, que afecta las propiedades del mucus, se producen infecciones e inflamación recurrente, y posteriormente se pude llegar a la destrucción del órgano. El fenotipo más severo se produce por

la enfermedad pulmonar. Estas evidencias han llevado a la búsqueda de otros canales de cloruro presentes en las vías respiratorias, como posibles blancos de regulación para desarrollar terapias contra la enfermedad.

Se ha reportado la expresión de ClC-2 en la membrana apical del epitelio pulmonar de rata y humano (Murray et al., 1996, Lipecka et al., 2002), lo que ha llevado a postular a este canal como un posible candidato como blanco farmacológico para suplir la función de CFTR. Se ha reportado que la sobre expresión de ClC-2 en células derivadas de epitelio de vías aéreas de pacientes con fibrosis quística, genera corrientes de cloruro activadas por hiperpolarización y pH ácido extracelular (pH 5.0). En experimentos de flujo de cloruro con Cl<sup>36</sup>, se observó un aumento en el eflujo de cloruro en las células que sobre expresaban ClC-2, por efecto del bajo pH extracelular (Schwiebert et al., 1998). Sin embargo, el mecanismo por el cual el canal se activa en el tejido nativo no está claro, debido a que cambios de pH tan drásticos es poco probable que sucedan, y el pH ácido bajo 6,5, inhibe la actividad del canal. Por otro lado, la activación por hinchamiento celular es aún materia de discusión. Además, existen reportes que indican que ClC-2 se expresa mayoritariamente en las vías aéreas del tejido fetal, disminuyendo su expresión en el tejido adulto (Murray et al., 1995, Sherry et al., 1997), estos hallazgos darían cuenta de una función importante del canal en el desarrollo de las vías aéreas, no así en el tejido adulto. Un estudio reciente, indica que el desarrollo del pulmón en rata se ve interrumpido cuando se inhibe la expresión de ClC-2 utilizando oligonucleótidos antisentido. Las mediciones de la diferencia de voltajes transepiteliales, mostraron una disminución de éstos en el tejido tratado con los oligonucleótidos antisentido, lo que indicaría que ClC-2 estaría participando en el transporte de fluido transepitelial (Blaisdell et al., 2004). La secreción de fluido por el epitelio pulmonar en el feto, es necesario para el desarrollo de los potenciales espacios que ocupará el aire.

Estos resultados discordantes, respecto a la función de ClC-2 en el tejido de las vías aéreas, también se han reportado por otros grupos que desarrollan estudios en el epitelio intestinal.

En el intestino delgado se ha demostrado la participación de CFTR en la secreción de cloruro (Anderson et al., 1992), sin embargo no se sabe si otras entidades moleculares también están participando en esta función. Gyömorey y colaboradores, investigaron la participación de ClC-2 en la secreción de cloruro en el íleon de ratones nativos y knock out para CFTR, y reportaron la presencia de secreción de cloruro en ambos modelos, mediante experimentos en cámara de Ussing, en los cuales se midieron las corrientes de corto circuito. Estas corrientes de cloruro fueron activadas por hipotonicidad, y fueron bloqueadas por el bloqueador de canales de cloruro 5-nitro-2-(3-fenil-propilamino). Los análisis inmunológicos mostraron una distribución subcelular de CIC-2 colocalizando con la proteína ZO-1 de las uniones estrechas (Gyömorey et al., 2000). Esta localización de CIC-2, también fue reportada en un estudio realizado en la línea celular Caco-2 (Mohammad-Panah et al., 2001). En este estudio se reportó la contribución de ClC-2 a la secreción de cloruro en estas células. Se realizaron estudios electrofisiológicos de las corrientes nativas, en los cuales se utilizó un shock hipotónico para activar dichas corrientes. Los estudios de inmunofluorescencia del canal nativo, mostraron colocalización de CIC-2 con la proteína ocludina, y la presencia de un pool intracelular. Un estudio reciente realizado en íleon de porcino, propone la participación de la secreción de cloruro mediada por ClC-2, en el reestrablecimiento de la función de barrera de este epitelio, inducido por prostaglandinas, después de daño isquémico. Los estudios de inmunolocalización indican la localización de ClC-2 en relación a las uniones estrechas (Moeser *et al.*, 2004). Esta localización es distinta de la que se ha reportado en el epitelio pulmonar y en el colon.

La principal función del colon en la homeostasis del fluido, es la reabsorción de NaCl y agua, función que realizan las células de la superficie. En la membrana apical la presencia de canales de sodio y de los intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, median la entrada de NaCl en los colonocitos por dos mecanismos, electrogénico y electroneutro. La salida del sodio por la membrana basolateral, se debería a un mecanismo electrogénico por la presencia de la Na,K-ATPasa. El mecanismo de salida del cloruro en el mecanismo electroneutro, es materia actual de investigación.

Algunos estudios han propuesto a CIC-2 como la vía de salida de cloruro desde la membrana basolateral de los colonocitos. Catalán y colaboradores investigaron la presencia de CIC-2 en colon distal de cobayo. Se reportó la presencia del mRNA en las células de la superficie, por técnicas de hibridización *in situ*. La expresión de la proteína se observó en la membrana basolateral de los colonocitos. Además se aportó evidencia funcional al registrar las corrientes características de CIC-2 en los colonocitos aislados, las cuales fueron bloqueadas por cadmio (Catalán *et al.*, 2002). Estudios recientes muestran evidencias funcionales de la presencia de CIC-2 en la membrana basolateral de colon distal de cobayo. Experimentos en que se montó el epitelio en una cámara de Ussing, y se permeabilizó la membrana basolateral. Además se aportó información respecto a la regulación del canal por un efecto directo del cloruro intracelular (Catalán *et al.*, 2004).

Estas evidencias, distintas a aquellas que ubican a ClC-2 en la membrana apical o en relación a las uniones estrechas, hacen difícil aventurar una hipótesis definitiva respecto a la contribución específica de ClC-2 en la homeostasis del cloruro en estos tejidos. Sin embargo, un modelo de ratón *knock out* para el canal, no mostró ninguno de los fenotipos esperados, como

rasgos epilépticos, retraso en el desarrollo pulmonar, acidificación gástrica o problemas gastrointestinales. Sin embargo, este modelo presentó un fenotipo de ceguera por degeneración de la retina, e infertilidad en los machos, debido a degeneración testicular. Este fenotipo sugiere una importante función de ClC-2 en el mantenimiento del microambiente iónico en estas células, las cuales dependen de la función de soporte del epitelio pigmentado retinal en el ojo, y las células de Sertoli en los testículos (Bosl *et al.*, 2001). Un modelo de ratón doble *knock out* para CIC-2 y CFTR, no mostró un agravamiento en el fenotipo de fibrosis quística, sino que se observó un aumento en la sobrevida con respecto a ratones *knock out* para CFTR (Zdebik *et al.*, 2004). Esta evidencia no sustenta la participación de CIC-2 en la secreción de cloruro, más bien sugiere indirectamente una participación en la absorción de éste.

#### 2.4 Determinantes de la polarización.

Las diferencias encontradas respecto a la localización subcelular de ClC-2 en epitelios polarizados, deberían tener una explicación, ya sea por el método de detección utilizado, por las diferencias específicas entre los tejidos estudiados, o bien por características propias del canal, que determinarían su direccionamiento en cada tipo celular.

Los epitelios polarizados así como las líneas celulares derivadas de epitelios, poseen un sistema de direccionamiento de las proteinas de membrana que es la base de la polaridad apicalbasolateral. Estos mecanismos, operan en las vías biosintéticas y de reciclaje, y están basados en señales específicas presentes en las proteínas. A través de estas señales, las proteínas direccionadas son capaces de interactuar con las proteínas de la maquinaria de direccionamiento. Las características estructurales implicadas en el direccionamiento apical incluyen N y O- glicanos, asociación a microdominios de membrana resistentes a detergente (rafts), mediantes anclajes a glicosil fosfatidil inositol, y secuencias en los dominios de transmembrana o citoplasmáticos de las proteínas (Scheiffele *et al.*, 1995, Yeaman *et al.*, 1997, Lisanti *et al.*, 1989, Lin *et al.*, 1998, Rodriguez-Boulan and Gonzalez, 1999). Las señales de direccionamiento basolateral, están formadas por secuencias peptídicas cortas presentes en la región citoplasmática de las proteínas, que también han sido identificadas en endocitosis y direccionamiento lisosomal. Estas señales incluyen motivos basados en tirosinas del tipo NPXY ó YXXØ, en los que X puede ser cualquier aminoácido y Ø corresponde a un aminóacido con un grupo R voluminoso hidrofóbico. Además se han identificado motivos de di-leucinas y di-hidrofóbicos (Le Gall *et al.*, 1995, Matter *et al.*, 1992, Hunziker and Fumey, 1994, Bonifacino and Dell' Angelica, 1999).

Se ha descrito la participación de los complejos adaptadores de clatrina en el reconocimiento de las señales basadas en tirosinas o di-leucinas. Se han identificado cuatro complejos adaptadores heterotetraméricos, AP-1 (Adaptor Protein 1), ( $\gamma$ ,  $\beta$ 1,  $\mu$ 1,  $\sigma$ 1), AP-2 ( $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\mu$ 2,  $\sigma$ 2), AP-3 ( $\delta$ ,  $\beta$ 3,  $\mu$ 3,  $\sigma$ 3) y AP-4 ( $\varepsilon$ ,  $\beta$ 4,  $\mu$ 4,  $\sigma$ 4), que difieren en las subunidades que los componen (Hirst and Robinson, 1998, Bonifacino and Dell' Angelica, 1999, Dell' Angelica *et al.*, 1999, Hirst *et al.*, 1999). AP-2 media endocitosis desde la membrana plasmática, mientras que AP-1, AP-3 y AP-4 se piensa que participan en el direccionamiento a nivel de la red trans Golgi y/o en membranas endosomales. La interacción entre las señales basadas en tirosinas y los complejos adaptadores, es mediada por la subunidad  $\mu$  (medium) de éstos (Ohno et al., 1995, 1996), mientras que la interacción con las señales basadas en di-leucinas es menos clara. Se ha reportado la interacción de estos motivos con la subunidad  $\beta$  de los complejos adaptadores (Rapoport *et al.*, 1998), sin embargo también se ha observado interacción de las subunidades  $\mu$  de los complejos AP-1 y AP-2, con motivos basados en di-leucinas (Hofmann *et al.*, 1999). Otros

estudios indican que estos motivos serían reconocidos por los adaptadores GGA (Golgi-localized, Gamma-ear-containing, Arf-binding), (Heilker *et al.*, 1999, Bonifacino and Traub, 2003).

Se ha identificado la localización tejido específica de una de estas adaptinas, se trata de la subunidad µ1B, presente en el complejo AP-1B, que se localiza exclusivamente en células de origen epitelial (Ohno et al., 1999), como las líneas celulares MDCK, Caco-2, HT-29 y Hec-1-A. Sin embargo, una excepción es la línea celular LLCPK-1, derivada de túbulo contorneado proximal de cerdo. Estas células alcanzan la polarización, pero no expresan cantidades detectables de la proteína µ1B. Se ha reportado que estas células presentan un defecto en la polaridad de la superficie celular (Roush *et al.*, 1998). Posteriormente, se estableció que dicho defecto es debido a la ausencia de µ1B, debido a que en experimentos de direccionamiento de dos proteínas basolaterales, el receptor de LDL y el receptor de transferrina, éstas se expresaron en la membrana apical de las células LLCPK-1. Sin embargo, cuando se reestableció la expresión de µ1B, mediante una transfección estable, las células nuevamente expresaron las proteínas en la membrana basolateral. Sin embargo otras proteínas basolaterales, como la subunidad  $\beta$  de la H,K-ATPasa, no dependen de la interacción con µ1B para su direccionamiento en células MDCK y LLCPK-1 (Duffield *et al.*, 2004).

Existe controversia respecto a la localización intracelular desde la cual participa AP-1B, en el direccionamiento basolateral. Se ha reportado que AP1-B direcciona proteínas basolaterales, después de que éstas han llegado a la membrana basolateral y han sido internalizadas en células LLCPK-1, por lo que se trataría de un mecanismo de direccionamiento post-endocítico. Este mecanismo es dependiente de la expresión de  $\mu$ 1B, y además estaría conectando la ruta de reciclaje basolateral desde endosomas de direccionamiento, con la ruta endocítica apical (Gan *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios, en células MDCK, muestran la participación de AP1-B en el direccionamiento basolateral, a nivel de endosomas de reciclaje en la ruta biosintética, sugiriendo que dichos compartimentos actuarían como un intermediario entre la red trans-Golgi y la membrana plasmática, es decir, este mecanismo estaría operando antes de la llegada de las proteínas a la superficie basolateral (Folsch *et al.*, 2003, Ang *et al.*, 2004).

La cantidad de literatura disponible relacionada con el tráfico y direccionamiento de canales CIC es escasa, sin embargo existen algunos estudios en el canal CIC-5, presente en endosomas, en los cuales se observa la expresión del canal colocalizando con la H<sup>+</sup>-ATPasa, en células que realizan endocitosis en riñón, localizándose en vesículas intracelulares y una fracción en la membrana plasmática. Además, esta expresión en la membrana es dependiente de un motivo basado en tirosina del tipo PY, presente en el extremo carboxilo terminal de CIC-5, y que modula la retención del canal en la membrana plasmática por mecanismos endocíticos (Günther *et al.*, 1998, Schwake *et al.*, 2001) . En otro estudio, se analizaron las tres mutaciones en CIC-5 relacionadas con la enfermedad de Dent. Estas mutaciones generan proteínas truncadas, que eliminan el dominio CBS2 del extremo carboxilo terminal del canal. Este estudio realizado en una línea celular de tubo colector de riñón, muestra una alteración en el tráfico del canal, con retención intracelular, en una localización consistente con el complejo de Golgi, y sin expresión en la membrana plasmática (Carr *et al.*, 2003).

Estudios realizados en el canal CIC-3, en células neuronales y no neuronales, muestran la ubicación de este canal en compartimentos endosomales, esta expresión y regulación de la distribución subcelular, sería dependiente del complejo adaptador de clatrina AP-3. La ausencia de este complejo, disminuye los niveles de CIC-3 en las vesículas endosomales (Salazar *et al.*, 2004).

Estos estudios indican el rol de las características estructurales de canales CIC en el tráfico y reciclaje, y además la participación de complejos adaptadores en estos mecanismos. CIC-3 y CIC-5 son identificados primariamente como canales intracelulares a diferencia de CIC-2, sin embargo es posible que mecanismos similares, basados en la misma maquinaria intracelular y características estructurales de estos canales, pudieran estar participando en el direccionamiento y tráfico de CIC-2 en células epiteliales. Al analizar la secuencia de CIC-2, se observa la presencia de los dos dominios CBS en el extremo carboxilo terminal, así como varios motivos basados en tirosinas, de la forma canónica YXXØ, y motivos de di-leucinas. Estos constituyen putativos motivos de direccionamiento basolateral y/o de tráfico y reciclaje.

Como muchas de las funciones que se le han atribuido a CIC-2, requieren de la expresión polarizada del canal en epitelios, y existe controversia respecto a su localización subcelular, ya que ha sido localizado en la membrana apical, basolateral y asociado a las uniones estrechas, es importante investigar estos asuntos, para tratar de entender cuales son las características de direccionamiento, y en que medida éstas dependen de los rasgos estructurales del canal y de la posible participación de otras entidades moleculares en dicho direccionamiento.

#### 2.5 Hipótesis

ClC-2 es un canal basolateral en líneas celulares polarizadas derivadas de epitelios.

#### **2.6 Objetivos Generales**

- Analizar la localización subcelular del canal recombinante en líneas celulares polarizadas.
- 2. Determinar los posibles motivos de direccionamiento del canal.

### 2.7 Objetivos específicos

- **1.** Construir vectores con el canal recombinante fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP).
- Transfectar agudamente el canal fusionado a GFP, en las líneas celulares MDCK, Caco-2, LLCPK-1 μ1A y LLCPK-1 μ1B.
- **3.** Analizar la localización del canal expresado en células crecidas en cubre objetos y filtros permeables.
- **4.** Investigar la polarización de las células en cultivo por medio de inmunolocalización de proteínas de las uniones estrechas y medición de la resistencia transepitelial.
- 5. Analizar la expresión subcelular de mutantes en motivos de direccionamiento del canal fusionados a GFP o marcados con el epítope de hemaglutinina (HA) por medio de transfecciones agudas en células MDCK.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### 3.1 Material.

**3.1.1 Reactivos:** En Sigma se adquirieron los siguientes reactivos: Ácido acético, Ampicilina, Azul de bromofenol, Bromuro de etidio, HEPES, Kanamicina, Paraformaldehído, Tritón X-100. En Gibco se adquirió: Agar, Extracto de levadura, Estándar de peso molecular 1Kb DNA Ladder, Fungizona, Geneticina, Glicerol, IPTG, Penicilina-estreptomicina, Suero fetal bovino, X-gal. En Merck se adquirió: CaCl<sub>2</sub>, Etanol 100%, Glicina, Isopropanol, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Peptona, Tris base. En Invitrogen se adquirió: dNTPs, Lipofectamina 2000. Además se utilizó: Agarosa (Promega), EDTA (J.T. Baker), Gelatina (Winkler), Medio de montaje (DAKO).

**3.1.2 Anticuerpos y enzimas**: Alexa Flúor 488 y Alexa Flúor 568 (Molecular Probes), Anti HA (Roche), Anti ZO-1 (Zymed), Anti α-myc (Laboratorio Dr. Ramón Latorre), *AccI y BlpI* (New England Biolabs), *EspI y* Pfu DNA polimerasa (Fermentas), *Hind*III y Taq DNA polimerasa (Invitrogen), T4 DNA ligasa (Promega).

**3.1.3 Medios y Tampones**: α-MEM (Gibco), DMEM (Dulbecco's minimal essential medium) (Sigma), 10X Tampón 2 (NBuffer): 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, pH 7,9 (New England Biolabs), 10X Tampón Tango: 33 mM Tris-Acetato (pH 7,9), 10 mM Acetato de Magnesio, 66 mM Acetato de Potasio, 0,1 mg/ml BSA (Fermentas), 2X Tampón de ligación rápida (Rapid ligation buffer): 60 mM Tris-HCl, pH 7,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20

mM DTT, 2 mM ATP 10% PEG (Promega), 10X Tampón 2: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, pH 8,0 (Invitrogen),10X Tampón PCR (Invitrogen), PBS 1X (Phosphate Buffered Saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tampón TAE 1X: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, Tampón de corrida: Glicerol 30%, azul de bromofenol, Medio LB (Luria –Bertani) (Gibco), Medio LB-Agar: 5 gr agar por litro de medio LB, Solución STET: 10 mM Tris-Cl (pH 8), 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH8), 5% (v/v) Tritón X-100.

#### 3.2 Métodos.

**3.2.1 Digestión con enzimas de restricción:** Se realizaron digestiones dobles en un volumen final de 20  $\mu$ l, se utilizó 5  $\mu$ g/ $\mu$ l de DNA plasmidial y 10 U de enzima de restricción (10000 U/ml). Los tampones que se emplearon dependieron del par de enzimas utilizadas, y del porcentaje de actividad presentada por cada enzima en el tampón. El volumen final se ajustó con agua destilada. La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche. Un ejemplo de una reacción estándar se muestra en la tabla 1.

**3.2.2 Electroforesis en gel de agarosa:** Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, de acuerdo a lo descrito en el libro Molecular Cloning a Laboratory Manual (3<sup>a</sup> Ed. 2001), para lo cual se pesó 0,2 gr de agarosa y se disolvió en 20 ml de tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). La agarosa se disolvió por calentamiento en un horno de micro ondas, se le agregó 1 µl de bromuro de etidio y se vertió en la cámara de electroforesis. Inmediatamente, se colocó una peineta para generar los pocillos. Una vez que la agarosa se solidificó, se cubrió con tampón TAE 1X. Las muestras se mezclaron con 2 µl de tampón de corrida y se cargaron en los pocillos. Se utilizó un estándar de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. El voltaje se fijó en 65 V y la corriente en 140 mA por 45-60 minutos en una fuente de poder Model 4001 P (Life Technologies). Los geles se observaron en un transiluminador UV y se fotografiaron con una cámara conectada a un computador. Se utilizó el programa Kodak Digital Science 1D para calcular los tamaños y los nanogramos de DNA separado, usando para ésto el estándar 1 Kb DNA Ladder.

Reactivos	Volumen
BlpI	1 µl
HindIII	1 µl
Tampón 10X	2 µl
DNA plasmidial	3 µl
ddH <sub>2</sub> O	13 µl

**Tabla 1:** Reacción de digestión con enzimas de restricción. En este ejemplo de una reacción estándar se utilizaron las enzimas *BlpI* y *Hind*III. El mismo protocolo se utilizó para digestiones con otras enzimas.

**3.2.3 Extracción de fragmentos de DNA de un trozo de gel**: Los fragmentos de DNA separados en el gel se observaron en un transiluminador, y se extrajeron cortando el trozo de gel. Estos trozos se pesaron en balanza analítica tarando un tubo de 1,5 ml, y se purificó el DNA utilizando el kit QIAEXII Gel Extraction Kit (150) (Quiagen). La agarosa se derritió a 50°C por 10 minutos, en un tampón con un pH  $\leq$  7.5 (Tampón QX1). Luego se agregó una solución que contenía una resina en suspensión (QIAEX II), a la cual se une el DNA a pH ácido. El DNA unido a la resina se lavó 2 veces con un tampón que contenía etanol 100% (Tampón PE). La resina se secó por 30 minutos, y el DNA se eluyó con 20 µl de agua destilada. Los pasos de precipitación y resuspensión de la resina se realizaron en una micro centrífuga a 12000-13000 x g.

**3.2.4 Ligación de fragmentos de DNA**: Se realizaron reacciones de ligación de los plasmidios linearizados y los fragmentos de DNA que se deseaba insertar en el plasmidio. Mediante el programa Kodak Digital Science 1D se calculó la concentración aproximada de plasmidio e inserto que se obtuvo de los pasos de purificación previos, y se utilizó una relación estequiométrica de 3/1 del inserto con respecto al plasmidio. Como el peso del fragmento depende de su tamaño, se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de inserto utilizada: ng de vector x Kb inserto x 3 / Kb vector = ng inserto

Para estas reacciones se utilizó siempre una cantidad de 50 ng de plasmidio y se incluyó siempre un control de religación del plasmidio, el que no contenía el inserto. El volumen final de la reacción fue 10  $\mu$ l, se utilizó la enzima T4 DNA ligase (3 U/ $\mu$ l) y el tampón 2X Rapid Ligation Buffer. Las reacciones se incubaron a 4°C durante toda la noche. Un ejemplo de una reacción estándar se muestra en la tabla 2.

Reactivos	Volumen
T4 DNA ligasa	1 μl
Tampón 2X	5 µl
DNA plasmidial (50 µg/µl)	1 µl
Inserto	Χ μΙ
ddH <sub>2</sub> O	Volumen hasta completar 10 µl

:

**Tabla 2:** Reacción de ligación de fragmentos de DNA. En la reacción control de religación se omitió el inserto, completando el volumen con agua destilada. Todas las reacciones de ligación para generar vectores de CIC-2 recombinante, se realizaron siguiendo el mismo protocolo.

**3.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**: Se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Se utilizó una mezcla de las enzimas Pfu y Taq Polimerasa (proporción 1:3), en un volumen final de reacción de 50 μl. Los partidores utilizados se obtuvieron en Integrated DNA Technologies, Inc. En todas las reacciones se incluyó un blanco de muestra, en el cual no se incluyó el templado. Se realizó un calentamiento inicial a 94°C por 30 segundos de la mezcla de reacción sin el templado. Pasados los 30 segundos, se cargó el templado y se dio inicio al programa establecido en el termociclador. Un ejemplo de una reacción estándar se muestra en la tabla 3. La tabla 4 muestra el programa de ciclos de la PCR.

**3.2.6 Transformación de células competentes:** Se utilizó el método de shock térmico para transformar células competentes DH5 $\alpha$  (Gibco) con el plasmidio resultante de la reacción de ligación. Se prepararon placas con medio LB-agar, conteniendo ampicilina, IPTG y X-gal, ó kanamicina, dependiendo del sistema de selección y resistencia a antibiótico presente en el plasmidio utilizado. Se ocupó una concentración de 0,5 mM de IPTG, 80 µg/ml de X-gal, 100 µg/ml de ampicilina ó 100 µg/ml de kanamicina por cada placa que contenía 20-30 ml de medio. El medio LB-agar se derritió en un horno de micro ondas y se mantuvo a 50°C por 30 minutos, luego se agregó el IPTG, X-gal, ampicilina ó kanamicina en la concentración correspondiente y se vació en placas de vidrio. Luego de su solidificación se mantuvieron a temperatura ambiente en campana de bioseguridad.

Se utilizaron alícuotas de  $25\mu$ l de células DH5 $\alpha$ , las que se sacaron de un congelador a -70°C y se mantuvieron en hielo por 5 minutos. Luego se agregó 3  $\mu$ l de la reacción de ligación a la suspensión celular y se mantuvieron en hielo por 20 minutos. Terminada la incubación en hielo, la mezcla se incubó en un baño termoregulado a 42°C por 60 segundos, inmediatamente, se
	Blanco de muestra	Muestra	
Reactivos	Volumen (µl)	Volumen (µl)	
Templado (14 ng/µl)	0	1	
Partidor 1 (10 µM)	1	1	
Partidor 2 (10 µM)	1	1	
dNTPs (10 mM)	1	1	
Tampón 10X	5	5	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	3	
Pfu-Taq	0,3	0,3	
ddH <sub>2</sub> O	39	38	

**Tabla 3:** Reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Ejemplo de una reacción estándar. Este procedimiento se utilizó para generar mutaciones puntuales en la secuencia de ClC-2, mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Número de Ciclos	Denaturación	Alineamiento	Elongación
	T° / tiempo (seg.)	T <sup>o</sup> / tiempo (seg.)	T <sup>o</sup> / tiempo (seg.)
15	94°C / 15	60°C / 30	72°C / 60
final	94°C / 15	60°C / 30	72°C / 300

**Tabla 4:** Programa de ciclos de la PCR. La mezcla de reacción se sometió a 15 ciclos de polimerización, programando las temperaturas y tiempos para cada paso como se indican en la tabla.

puso nuevamente en hielo por 2 minutos más. Luego se le agregó 400 µl de medio LB, y se incubó 1,5 horas a 37°C con agitación a 150 rpm.

Una vez terminada la incubación a 37°C, las bacterias se sembraron en las placas de LBagar con asa de vidrio. Se utilizó 200 µl de la mezcla de células por cada placa. Las placas se incubaron en posición invertida a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se verificó la presencia de colonias positivas, las cuales se resuspendieron en 5 ml de medio LB, en presencia de 100 µg/ml de ampicilina o kanamicina, dependiendo del plasmidio utilizado, y se incubaron a 37°C con agitación a 240 rpm hasta la aparición de turbidez en el medio (crecimiento bacteriano).

**3.2.7** Purificación de DNA plasmidial por el método de escala pequeña (Miniprep): Se colectaron 1.5 ml del cultivo bacteriano líquido y se centrifugaron a 12000-13000 x g por 5 minutos en micro centrífuga (Eppendorf). Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 110 µl de solución STET (10 mM Tris-Cl (pH 8), 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH8), 5% (v/v) Tritón X-100). La muestra se hirvió a baño maría por exactamente 1 minuto y se dejó en hielo hasta que se enfrió. Luego se centrifugó a 12000-13000 x g por 10 minutos y se colectó el sobrenadante (aproximadamente 100 µl) en un tubo nuevo, a esta fase acuosa se le agregó igual volumen de isopropanol frío (-20°C) y se mezcló por vortex durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 12000-13000 x g por 10 minutos. Luego se centrifugó a 12000-13000 x g por 10 minutos.

**3.2.8 Purificación de DNA plasmidial por el método de gran escala (Midiprep):** Se utilizó 50 ml de cultivo bacteriano líquido y se realizó la purificación del DNA plasmidial con el kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Este kit se basa en la lisis alcalina de las células, en presencia de SDS (0.2 M NaOH, 1% SDS), y la purificación del DNA por medio de una columna que contiene una resina a la cual se une el DNA. El cultivo bacteriano se centrifugó y el líquido se descartó. El sedimento celular se resuspendió en un tampón que contenía RNasa (Cell Resuspension Solution), luego se agregó un tampón de lisis (Cell Lysis Solution), se mezcló por inversión, y la reacción se detuvo con un tampón de neutralización (Neutralization Solution). Se centrifugó para obtener un sobrenadante claro que contenía el DNA, éste sobrenadante se filtró y se cargó en la columna. El líquido se hizo pasar por la columna por medio de la aplicación de presión generada por una bomba de vacío. La columna se lavó con una solución salina (Column Wash Solution) y se secó por 30 segundos. El extremo de la columna que contenía la resina y el DNA unido a ella se cortó y se transfirió a un tubo de 1.5 ml. Después de que se eliminó el exceso de solución de lavado y los restos de resina, el DNA se eluyó con 300 µl de agua destilada libre de nucleasas, precalentada a 70°C. El DNA se guardó a -20°C.

**3.2.9 Cuantificación de DNA por espectrofotometría:** Se utilizó un espectrofotómetro Spectronic® Genesys<sup>TM</sup>2. La muestra de DNA plasmidial purificado se diluyó 100 veces, y se le midió la absorbancia contra un blanco de agua destilada a una longitud de onda de 260 nm. Se utilizó la relación  $1DO_{260}=50 \ \mu g/ml$  para calcular la concentración de la muestra, a través de la siguiente fórmula:

 $\mu g/\mu l = DO_{260} \times 50 \ \mu g/ml \times dilución \times 1ml/1000 \ \mu l$ 

**3.2.10 Cultivo celular:** Las células MDCK se cultivaron en medio DMEM, conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% penicilina-streptomicina, 1% fungizona. Las células Caco-2 se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM, conteniendo 10 % de suero fetal bovino, 1% penicilina-estreptomicina, 1% fungizona. Las células LLCPK-1 µ1A y LLCPK-1 µ1B (proporcionadas amablemente por el Dr. Ira Mellmann), se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM conteniendo 10% de suero fetal bovino, 1.8 mg/ml de geneticina (G418). Todas las líneas celulares se cultivaron en placas de 110 mm, y se subcultivaron cuando se había alcanzado 90% de confluencia. Para soltar las células se utilizó una solución de tripsina 5X en PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para las células MDCK y Caco-2, y tripsina 1X en PBS 1X para las células LLCPK-1 µ1A y LLCPK-1 µ1B. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>.

# 3.2.11 Plasmidios:

**CIC-2 nativo**: Se utilizó un vector de expresión pEGFP-hClC-2 en el cual está sublclonado el cDNA del ClC-2 nativo humano, fusionado a la proteína fluorescente verde, ésta se unió al extremo carboxilo terminal del canal.

### ClC-2 mutagénicos:

**Mutación puntual Y179A**: Se utilizó un vector pCR3.1 en el cual está subclonado el cDNA del ClC-2 humano, marcado con un epítope HA, con la mutación que genera el cambio de la tirosina en la posición 179 por una alanina.

**Mutación puntual Y555F**: Se utilizó un vector pCR3.1 (Invitrogen) en el cual está subclonado el cDNA del CIC-2 de cobayo, con la mutación que genera el cambio de la tirosina en la posición 555 por una fenilalanina. Este vector se digirió con las enzimas de restricción *Blp*I y *Esp*3I, y se obtuvo un fragmento de 1411 pares de bases que contenía la mutación. Posteriormente este fragmento se ligó a un vector pEGFP-gpClC-2 en el cual está subclonado el cDNA del ClC-2 de cobayo nativo, previamente digerido con las enzimas de restricción *Blp*I y *Esp*3I. Este procedimiento generó un vector conteniendo la mutación de ClC-2 Y555F, fusionado a la proteína fluorescente verde.

**Deleción 16-61**( $\Delta$ **16-61**): Se utilizó un vector pCR3.1 (Invitrogen) en el cual está subclonado el cDNA del ClC-2 de cobayo que contiene la deleción de 135 pares de bases, que genera la pérdida de 45 amino-ácidos, desde el número 16 al 61. Este vector se digirió con las enzimas de restricción *Blp*I y *Hind*III, y se obtuvo un fragmento de 373 pares de bases, que contenía la deleción. Posteriormente, este fragmento se ligó a un vector pEGFP-gpClC-2 en el cual está subclonado el cDNA del ClC-2 de cobayo nativo, previamente digerido con las enzimas de restricción *Blp*I y *Hind*III. Este procedimiento generó un vector con la deleción de ClC-2  $\Delta$ 16-61 fusionado a la proteína fluorescente verde.

**Mutación puntual Y64A**: Se realizó mediante mutagénesis sitio dirigida por dos rondas de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la primera ronda de amplificación se utilizó como templado el vector pEGFP-hClC-2 wt (ClC-2 humano nativo fusionado a GFP) y el siguiente set de partidores:

Partidores mutagénicos:

Primer sentido hClC2Y64A 5' gctcttggaa**gct**ggacggagcc 3'

Primer anti sentido hClC2Y64A 5' ggctccgtccagagc 3'

En negrita se indica el codón mutagénico correspondiente a alanina, que remplazó al codón nativo tat, que corresponde a una tirosina en la posición 64.

Partidores no mutagénicos:

Primer sentido pEGFPN1 5' aatgtcgtaacaactccg 3'

Primer anti sentido hClC2as5 5' tcaccagagccgggaagagc 3'

Esta primera ronda de amplificación generó dos fragmentos de 382 y 932 pares de bases respectivamente. Estos fragmentos se purificaron y se utilizaron como templado para la segunda ronda de amplificación por PCR. Los partidores que se emplearon en la segunda ronda de PCR son los no mutagénicos de la primera amplificación. Esta segunda reacción generó un fragmento de 1314 pares de bases, el cual se purificó y se subclonó en el vector de clonamiento pGEM-T Easy. Con este vector se transformaron bacterias DH5α y las colonias se seleccionaron por sembrado en placas de agar LB con ampicilina, IPTG y X- gal. El vector se purificó y se digirió con las enzimas de restricción *Hind*III y *Acc*I. El fragmento resultante que contenía la mutación se ligó al vector pEGFP-hClC2 previamente digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Acc*I. Este procedimiento generó un vector con la mutación de ClC-2 Y64A fusionado a GFP, la presencia de la mutación fue verificada por secuenciación.

**Mutación doble LL61-62AA:** Se utilizó un vector pCR3.1 en el cual está subclonado el cDNA del ClC-2 humano, marcado con un epítope HA, con las mutaciones que generan el cambio de las leucinas número 61 y 62 por alaninas.

**Mutación doble LL812-813AA:** Se utilizó un vector pCR3.1 en el cual está subclonado el cDNA del ClC-2 humano, marcado con un epítope HA, con las mutaciones que generan el cambio de las leucinas número 812 y 813 por alaninas.

hSlo: Se utilizó un vector que contenía el cDNA del canal de potasio hSlo (human Slowpoke channel) nativo, marcado con el epítope c-myc (proporcionado amablemente por el Dr. Patricio Orio).

**3.2.12 Transfecciones:** Las células se cultivaron en cubre objetos de vidrio o en filtros permeables de poliester de 12 mm de diámetro y 4 μm de tamaño de poro (Costar, Cambridge, MA). Los cubre objetos se dispusieron en número de 4 en una placa de 35 mm. Todas las líneas celulares se transfectaron 2 a 3 días post-confluencia, a excepción de las células Caco-2, las cuales se cultivaron por 10 días antes de realizar las transfecciones.

Se realizaron transfecciones agudas utilizando 2  $\mu$ g de DNA y 10  $\mu$ l de lipofectamina 2000. DNA y lipofectamina se diluyeron por separado en 100  $\mu$ l de medio de cultivo, sin suero fetal bovino ni antibióticos (DMEM ó  $\alpha$ -MEM dependiendo del tipo celular). Se mezclaron e incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente, durante este tiempo las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se mantuvieron con 800  $\mu$ l de medio de cultivo. Posteriormente se les agregó la mezcla de transfección y se incubaron por 5 horas, momento en el cual se detuvo la transfección, mediante el cambio del medio de cultivo a un medio conteniendo suero fetal bovino y antibióticos. Las células se analizaron 24 horas después de parada la transfección.

Para las células crecidas en filtros permeables se utilizó 2 µg de DNA y 10 µl de lipofectamina 2000 por cada filtro de 12 mm de diámetro. Durante el tiempo de incubación de la

mezcla de transfección, las células se lavaron, en ambas cámaras (superior e inferior), con medio de cultivo (sin suero fetal bovino y antibióticos). La mezcla de transfección (200 µl) se aplicó en la cámara superior, llegando a un volumen final de 500 µl con medio de cultivo. La cámara inferior se mantuvo con 1,5 ml de medio de cultivo. Los tiempos de incubación, detención y análisis fueron los mismos que los utilizados para las células crecidas en cubre objetos.

Para los análisis microscópicos, las células crecidas en cubre-objetos se lavaron 3 veces con PBS 1X, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> (PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>) y se fijaron en 4% paraformaldehído en PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron 5 veces con PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> y se montaron sobre porta-objetos con medio de montaje DAKO. Para las células crecidas en filtros permeables se realizó el mismo procedimiento de fijado, luego se cortaron los filtros y se montaron sobre porta-objetos.

**3.2.13 Inmunofluorescencia:** Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios en las concentraciones que se indican: mouse anti ZO-1 12 µg/ml, rat anti HA tag dilución 1/500 y anti  $\alpha$ -myc 12 µg/ml. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron Alexa Flúor 488 y Alexa Flúor 568 en dilución 1/500 para ambos. Las células crecidas en cubre-objetos se lavaron 3 veces con PBS 1X 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> y se fijaron en 4% paraformaldehído en PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces y se incubaron por 5 minutos con 50 mM glicina-PBS para eliminar la auto-fluorescencia. Las células se permeabilizaron con 0,2 % Tritón X-100 en PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> 0,2% gelatina, luego se realizaron 2 bloqueos por 5 minutos cada uno a temperatura ambiente, con PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> 0,2% gelatina. Las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo por 1 hora a

temperatura ambiente en cámara húmeda. Terminada la incubación, se realizaron 6 lavados por 5 minutos cada uno con PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> 0,2% gelatina. Se incubó el anticuerpo secundario como el primero, lejos de la exposición a la luz y se realizó el mismo número de lavados. Los cubre-objetos se montaron en porta-objetos con medio de montaje DAKO. Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario, reemplazando el volumen de éste por solución de bloqueo.

Para la inmunodetección de ClC-2 Y179A-HA las células se incubaron con 5 mM EDTA-PBS por 10 minutos a 4°C antes del proceso de fijado. Este tratamiento destruye las uniones estrechas con lo que el anticuerpo puede acceder a la membrana basolateral y reconocer el epítope HA, ubicado en un loop extracelular de ClC-2 Y179A, entre las alfa hélices L y M. Para la detección simultánea de ZO-1 y ClC-2 fusionado a GFP, se realizó la transfección como se indicó antes y 24 horas después de parada la transfección se realizó la inmunodetección de ZO-1.

**3.2.14 Microscopía confocal:** Todas las preparaciones se analizaron por microscopía confocal con un microscopio Zeiss LSM 5 Pascal. Las muestras se excitaron con un láser de 488 nm y la emisión se colectó entre 505 y 550 nm, para detectar la señal de la proteína fluorescente verde y del anticuerpo Alexa flúor 488. Para detectar la señal del anticuerpo Alexa Flúor 568 las muestras se excitaron con un láser de 543 nm y la emisión se colectó entre 560 y 615 nm. Se utilizaron los objetivos C-Apochromat 63x/1.4 oil, de inmersión en aceite y C-Apochromat 63x/1.2 water, de inmersión en agua. El porcentaje de intensidad del láser y la apertura del pinhole se ajustaron dependiendo de la intensidad de la señal de fluorescencia. Las imágenes en campo claro se obtuvieron utilizando luz visible.

**3.2.15 Resistencia transepitelial:** Las células se sembraron en filtros permeables (Costar, Cambridge, MA) y se analizaron 2 a 3 días post confluencia ya sea para las células transfectadas o sin transfectar. Los filtros permeables se montaron en una cámara de Ussing (Physiologic Instruments, Union City, CA). La diferencia de potencial transepitelial se midió usando un amplificador EVC4000 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). El voltaje se fijó a 0 mV. Un segundo pulso a 10 mV se dio a intervalos de 10 segundos. Los pulsos de voltaje y la adquisición de las corrientes se generaron con el programa computacional pClamp 6 (Axon Instruments, Union City, CA) a través de una interface Lab-master (Catalán *et al.* 2004). Con la diferencia de corriente medida entre 0 y 10 mV se calculó la resistencia transepitelial por medio de la ley de Ohm ( $\Delta V = \Delta I \times R$ ). Esta resistencia se normalizó al área del filtro (113.1 mm<sup>2</sup>), expresándose los valores en  $\Omega$  cm<sup>2</sup>. La solución que se utilizó en la cámara de Ussing en los lados apical y basolateral contenía 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 10 mM HEPES a pH 7,4.

#### 4. RESULTADOS

#### 4.1 Plasmidios de ClC-2 recombinante.

Para evaluar la expresión de CIC-2 en líneas celulares derivadas de epitelios, las cuales no expresan el canal, o lo expresan en muy baja proporción, es necesario contar con un sistema de expresión del canal recombinante, que incluya un adecuado sistema de detección para poder evaluar su localización. Con este propósito se utilizaron varias construcciones de CIC-2 recombinante, fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP), o marcado con el epítope de hemaglutinina (HA). Estos sistemas de expresión y detección, permiten localizar a la proteína mediante técnicas de microscopía. Se utilizaron construcciones del canal silvestre y varios mutantes de los putativos motivos de direccionamiento, que incluyen motivos basados en tirosinas, de la forma canónica YXXØ, y motivos de di leucinas (LL). Estos motivos se encuentran distribuidos en el extremo amino terminal, asas intracelulares y el extremo carboxilo terminal de CIC-2. Además se utilizó una construcción del canal de potasio hSlo, marcado con el epítope c-myc en el extremo amino terminal (Bravo-Zehnder et al. 2000), como control de expresión apical. Los plasmidios utilizados contenían el cDNA de clones de ClC-2 humano (hClC-2, human chloride channel 2) o de cobayo (gpClC-2, guinea pig chloride channel 2). La proteína fluorescente verde se fusionó al extremo carboxilo terminal del canal, mientras que el epítope HA se encuentra en una asa extracelular, entre las alfa hélices L y M. El epítope HA se insertó en una región orientada hacia el extracelular, para que pueda ser fácilmente reconocido por el anticuerpo anti HA, en el momento de realizar la inmunodetección. Las construcciones con el canal recombinante silvestre y los respectivos mutantes, así como el plasmidio que contiene el cDNA del canal hSlo silvestre son las siguientes: hClC2wt-GFP, hClC2wt-HA, gpClC2Δ16-61-GFP, hClC2Y64A-GFP, hClC2Y179A-HA, gpClC2Y555F-GFP, hClC2LL61-62AA-HA, hClC2LL812-813AA-HA, hSlo-cmyc.

En la figura 1 se esquematizan los vectores de expresión utilizados. La figura 2 muestra un modelo de topología de secuencia para ClC-2, donde se indican los sitios en los cuales se introdujeron la proteína fluorescente verde o el epítope HA.

Algunas de las mutaciones utilizadas fueron generadas originalmente en vectores sin un sistema de detección por métodos microscópicos, por lo cual, mediante técnicas de biología molecular, estas mutaciones se introdujeron en vectores codificantes para la proteína fluorescente verde, para generar la correspondiente proteína de fusión conteniendo a ClC-2 mutado y fusionado a GFP.

Las mutaciones  $\Delta 16-61$  e Y555F, que se generaron originalmente en el vector pCR3.1 se introdujeron en el vector pEGFP-N1. La mutación Y64A se generó por mutagénesis sitio dirigida, y también se utilizó el vector pEGFP-N1.

### **4.1.1 Deleción** Δ16-61.

Esta deleción genera la pérdida de 138 pares de bases, que produce la pérdida de 46 aminoácidos, desde la posición 16 a la 61 del extremo amino terminal. Se realizaron cortes con enzimas de restricción, purificación de los fragmentos de interés y ligación de éstos, para generar el vector que codifica a CIC-2 mutante fusionado a GFP.

El vector pCR3.1 mide 5.000 pares de bases, y el cDNA de gpClC-2 3.212 pares de bases. Con la deleción de 138 pares de bases, el cDNA del canal mide 3.074 pares de bases. Estos tamaños generan un vector de 8.074 pares de bases. Este vector, así como el vector pEGFP-N1,



Figura 1: Vectores de expresión recombinantes. Se utilizaron los vectores pEGFP-N1, pCR3.1 y pcDNA3. El cDNA de ClC-2 se representa en color gris, el cDNA de GFP se representa en verde, los epítopes HA y c-myc se representan en naranja y celeste respectivamente, el cDNA de hSlo se representa en azul.



Figura 2: Modelo topológico para los canales de la familia ClC. Se representa la posición de la proteína fluorescente verde (GFP), en el extremo carboxilo terminal del canal, o el epítope HA (en rojo), ubicado en un loop extracelular, entre las alfa hélices L y M.

que contenía el cDNA de CIC-2 silvestre, se digirieron con las enzimas *Blp*I y *Hind* III. En ambos vectores el cDNA del canal está subclonado en el sitio correspondiente a *Hind*III, y la enzima *Blp*I corta en la posición 508 dentro del cDNA del canal. Un esquema general del procedimiento se muestra en la Figura 3 a.

Las digestiones con las enzimas de restricción produjeron dos fragmentos, que para el vector pCR3.1 ClC-2 $\Delta$ 16-61, medían 7.704 y 370 pares de bases, y para el vector pEGFP ClC-2wt medían 7.404 y 508 pares de bases. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa, y se extrajeron las bandas de 370 pares de bases (que contiene la deleción), del vector pCR3.1 y de 7.404 pares de bases, del vector pEGFP. La ligación de estos fragmentos produjo un vector de 7.774 pares de bases que contenía el cDNA de ClC-2 con la deleción, fusionado a GFP. Este vector se purificó y se le practicó un ensayo de restricción con las enzimas *Hind*III y *Blp*I, obteniéndose los fragmentos esperados de 7.404 y 370 pares de bases. En la figura 3 b se muestran las fotografías de los geles del procedimiento descrito.

### 4.1.2 Mutación Y555F.

Esta mutación genera la sustitución de una tirosina por una fenilalanina en la posición 555. Esta tirosina se ubica en la región intracelular, formando parte del extremo citoplasmático del poro de selectividad. Se utilizó la misma estrategia descrita para la mutación  $\Delta$ 16-61, para generar el vector que codifica a ClC-2 fusionado a GFP.

El vector pCR3.1 que contenía el cDNA de ClC-2 con la mutación, así como el vector pEGFP con ClC-2 nativo, se digirieron con las enzimas *Blp*I y *Esp*3I, éstas cortan en la secuencia del canal en las posiciones 508 y 1.919, respectivamente. La figura 4 a muestra un esquema del procedimiento.



Figura 3: Generación del vector pClC2 $\Delta$ 16-61-GFP. **A**: Esquema del procedimiento. En azul se representa el cDNA de ClC-2 con la deleción de 138 pares de bases, en gris se representa el canal nativo. **B**: Digestiones con enzimas de restricción del vector ClC-2 $\Delta$ 16-61-GFP. a: El carril 1 muestra la digestión del vector ClC-2  $\Delta$ 16-61, el carril 3 muestra la digestión del vector ClC-2wt-GFP, ambos cortados con las enzimas *Hind*III y *Blp*I. En rojo se destaca las bandas que se cortaron y purificaron. b: Ensayo de restricción del vector ClC-2  $\Delta$ 16-61GFP. Después de la

ligación de los fragmentos purificados, el vector resultante de digirió con las enzimas *Hind*III y *Blp*I, obteniéndose los fragmentos esperados de 7.404 y 370 pares de bases. Los carriles 2 en a y 1 en b corresponden al estándar de peso molecular 1Kb (Invitrogen). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

Las digestiones con las enzimas de restricción generaron dos fragmentos, que para el vector pCR3.1 ClC-2Y555F medían 6.800 y 1.412 pares de bases, y para el vector pEGFP ClC-2wt medían 6.500 y 1.412 pares de bases. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa, y se extrajeron las bandas de 1.412 pares de bases del vector pCR3.1, y de 6.500 pares de bases, del vector pEGFP. La ligación de estos fragmentos produjo un vector de 7.912 pares de bases que contenía el cDNA de ClC-2 con la mutación, fusionado a GFP. Este vector se purificó y se le practicó un ensayo de restricción con las enzimas *Blp*I y *Esp*3I, obteniéndose los fragmentos esperados de 6.500 y 1.412 pares de bases. En la figura 4 b se muestran las fotografías de los geles del procedimiento descrito.

### 4.1.3 Mutación Y64A.

Esta mutación genera el cambio de una tirosina por una alanina en la posición 64. Esta tirosina se ubica en el extremo amino terminal del canal. La mutación se generó por mutagénesis sitio dirigida. El procedimiento utilizado requiere dos rondas de amplificación por PCR. Se utilizaron un par de partidores mutagénicos que cambian el codón tat que codifica para una tirosina en la posición 64 por el codón gct, que codifica para una alanina. Además se utilizaron un par de partidores no mutagénicos. En la primera ronda de amplificación se utilizaron los partidores mutagénicos y no mutagénicos, y se usó como templado un vector que codifica para el



Figura 4: Generación del vector pClC-2Y555F-GFP. A: Esquema del procedimiento. En gris se representa el cDNA del canal ClC-2 silvestre, en rojo se representa la mutación puntual Y555F. B: Digestiones con enzimas de restricción del vector ClC-2Y555F-GFP. a: El carril 1 muestra la digestión del vector ClC-2 Y555F, el carril 3 muestra la digestión del vector ClC-2wt-GFP, ambos cortados con las enzimas *Blp*I y *Esp*3I. En rojo se destaca las bandas que se cortaron y purificaron. b: Ensayo de restricción del vector ClC-2Y555F-GFP. Después de la ligación de los

fragmentos purificados, el vector resultante de digirió con las enzimas *Blp*I y *Esp*3I, obteniéndose los fragmentos esperados de 6.500 y 1.412 pares de bases. Los carriles 2 en A y 1 en B corresponden al estándar de peso molecular 1Kb (Invitrogen). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

ClC-2 humano fusionado a GFP. La figura 5 muestra un esquema de las posiciones de los partidores.

Los partidores GFP sentido (sen) y Y64A antisentido (as) generaron un producto de amplificación de 382 pares de bases, y los partidores Y64A sen y as 5 generaron un producto de amplificación de 932 pares de bases (figura 7). Estos productos de amplificación se separaron en geles de agarosa y las bandas se cortaron y purificaron.

En la PCR 2 se utilizó como templado las bandas purificadas de la PCR 1, y los partidores no mutagénicos. La denaturación inicial de los fragmentos, es seguida por una sobrelapación de los extremos, en la región complementaria correspondiente a los partidores mutagénicos, este fragmento es amplificado a partir de los extremos 3' OH libres. Luego este fragmento es amplificado a partir de los partidores no mutagénicos. Un esquema de este procedimiento se muestra en la figura 6.

La PCR 2 genera un producto de amplificación de 1.291 pares de bases que contiene el codón mutagénico. Este fragmento se separó en gel de agarosa, se extrajo la banda y se purificó. Las fotografías de los geles de las PCR 1 y 2 se muestran en la figura 7.

El fragmento purificado de la PCR 1 se subclonó en el vector pGEMt Easy. Con el plasmidio resultante se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  competentes. Posteriormente el vector se purificó y se digirió con las enzimas *Hind*III y *Acc*I. Este fragmento se ligó a un vector que



Figura 5: Esquema PCR 1. Se utilizó como templado el vector hClC-2wt-GFP. Los partidores mutagénicos Y64A sentido y antisentido se indican en rojo. Los partidores no mutagénicos GFP sentido y antisentido 5 se indican en negro. Se indican las posiciones de corte de las enzimas de restricción *Hind*III y *Acc*I que se utilizaron para subclonar el segmento mutado.



Figura 6: Esquema PCR 2. Se utilizó como templado los fragmentos purificados en la PCR 1. A: Sobrelapación de los fragmentos en la región complementaria de 23 pares de bases, correspondiente a los partidores mutagénicos. Esta región se amplifica a partir de los extremos 3' OH libres. B: El fragmento extendido en A, es amplificado a partir de los partidores no mutagénicos. En rojo se indica el codón mutagénico, en negro la región del vector pEGFP-N1 y en gris hClC-2.



Figura 7: Separación electroforética de los productos de las PCR 1 y 2. La PCR 1 generó dos fragmentos de 382 y 932 pares de bases, que se extrajeron y purificaron (carril 2 y 4). La PCR 2 generó un fragmento de 1291 pares de bases que se extrajo y purificó. Los carriles 1 corresponden a los controles sin templado y los carriles 3 de PCR 1 y 2 de PCR 2 corresponden al estándar de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

contenía el cDNA de ClC-2 humano fusionado a GFP, previamente digerido con las mismas enzimas, así se obtuvo el vector hClC-2Y64A-GFP. Un esquema del procedimiento se muestra en la figura 8.

Las digestiones con las enzimas de restricción generaron dos fragmentos, que para el vector pGEMt Easy Y64A medían 3.241 y 1.065 pares de bases, y para el vector pEGFP CIC-2wt medían 6.423 y 1.065 pares de bases. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa, y se extrajeron las bandas de 1.065 pares de bases del vector pGEMt Easy, y de 6.423 pares de bases, del vector pEGFP. La ligación de estos fragmentos originó un vector de 7.488 pares de bases que contenía el cDNA de CIC-2 con la mutación, fusionado a GFP. Este vector se purificó y se le practicó un ensayo de restricción con la enzima *Pst*I. Esta enzima tiene tres sitios de corte dentro de la secuencia de CIC-2 humano, por lo que se generaron tres fragmentos de 690, 909 y 5.889 pares de bases. La presencia de la mutación se verificó por secuenciación. En la figura 9 se muestran las fotografías de los geles del procedimiento descrito.

Estos procedimientos permitieron generar los vectores con las mutaciones  $\Delta$ 16-61, Y555F e Y64A de ClC-2 fusionado a la proteína fluorescente verde.

# 4.2 Transfecciones agudas en monocapas celulares.

# 4.2.1 Expresión diferencial de ClC-2 en células epiteliales sembradas en cubre objetos.

Para poder estudiar la expresión polarizada de ClC-2, se utilizaron líneas celulares derivadas de epitelios. Estas células al ser mantenidas en cultivo forman monocapas, llegando a desarrollar características similares a las que tenían en el tejido del cual se originaron, como presencia de uniones estrechas, ribete en cepillo y valores de resistencias transepiteliales



Figura 8: Generación del vector pClC-2Y64A-GFP. En gris se representa el cDNA del canal ClC-2 nativo, en naranja se representa la mutación puntual Y64A. El fragmento mutado se originó en las rondas de PCR (Figura 7 PCR 2).



Figura 9: Digestiones con enzimas de restricción del vector ClC-2Y64A-GFP. A: El carril 2 muestra la digestión del vector pGEMt Easy que contenía el fragmento de ClC-2 con la mutación Y64A. B: El carril 1 muestra la digestión del vector ClC-2wt-GFP. En rojo se destacan las bandas que se cortaron y purificaron. C: Ensayo de restricción del vector ClC-2Y64A-GFP. Después de la ligación de los fragmentos purificados, el vector resultante se digirió con la enzima *Pst*I, obteniéndose los fragmentos esperados de 5.889, 909 y 690 pares de bases. Los carriles 2 en B y 1 en A y C, corresponden al estándar de peso molecular 1Kb (Invitrogen). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

características. Estas propiedades pueden variar de una línea a otra, y depender de la madurez que tenga el cultivo. Por ejemplo, las uniones estrechas empiezan a aparecer, con la presencia de la proteína ZO-1, un día post confluencia (Low *et al.*, 2000).

En este estudio se utilizaron las líneas celulares MDCK, Caco-2, LLCPK-1 µ1A y LLCPK-1 µ1B. Las células MDCK son derivadas de la región del túbulo contorneado distal y tubo colector de riñón de perro. Esta línea celular es un modelo de polarización de proteínas ampliamente estudiado (Deora et al., 2004). Las células Caco-2 son derivadas de un colocarcinoma humano, y en cultivo adquieren muchas características de los enterocitos, por lo cual han sido utilizadas como modelos de estudio de la función intestinal y de polarización (Mariadason et al., 2000, Li et al., 2004). Finalmente las células LLCPK-1 derivan de túbulo contorneado proximal de riñón de cerdo. Esta línea celular carece de la subunidad µ1B del complejo adaptador de clatrina AP-1. µ1B se expresa exclusivamente en células epiteliales, y se ha visto que las células LLCPK-1 expresan un grupo de proteínas basolaterales en la membrana apical (Roush et al., 1998, Folsch et al., 1999). Las líneas LLCPK-1 µ1A y LLCPK-1 µ1B, fueron desarrolladas por Folsch y colaboradores (Folsch et al., 1999), y corresponden a líneas transfectadas establemente con las subunidades  $\mu$ 1A o  $\mu$ 1B. En esta última se observó la restitución de la expresión basolateral de las proteínas que se expresaron en la membrana apical, en las líneas nativa y  $\mu$ 1A. Estas células se consideraron un interesante modelo para estudiar la expresión polarizada de ClC-2.

La expresión del canal en las líneas celulares se logró utilizando la técnica de transfección aguda en las monocapas polarizadas. Esta técnica tenía una eficacia limitada con la utilización de reactivos lipídicos como lipofectina y lipofectAMINA, sin embargo el desarrollo de una nueva generación de estos compuestos como lipofectAMINA PLUS y lipofectAMINA 2000, han demostrado mayor eficacia en la expresión de proteínas recombinantes en líneas celulares polarizadas, sin aumento de la citotoxicidad (Tucker *et al.*, 2003, Deora *et al.*, 2004). En este estudio las transfecciones agudas se realizaron con lipofectAMINA 2000.

Las células se sembraron en cubre objetos y se transfectaron con el plasmidio que codifica a CIC-2 silvestre fusionado a la proteína fluorescente verde, 2 a 3 días post confluencia, excepto las células Caco-2, que se transfectaron 10 días post sembrado. Con esto se aseguró la formación de las uniones estrechas, que forman una barrera física eficiente entre la membrana apical y basolateral, a partir del primer día post confluencia (Low *et al.*, 2000).

Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal 24 horas después de realizada la transfección. Se muestran imágenes representativas de un mínimo de 3 experimentos independientes, n corresponde al número de fotografías tomadas para cada experimento. Se analizaron los planos X-Y y X-Z, donde se observó que en las células MDCK y Caco-2, la señal de CIC-2 se expresó principalmente en la membrana basolateral, presentando también una señal intracelular. No se observó señal apical (Figura 10). El patrón intracelular ha sido reportado por otros autores, y se ha observado principalmente en una región perinuclear (Olsen *et al.*, 2003, Lipecka *et al.*, 2002, Dhani *et al.*, 2003).

Al analizar la expresión de ClC-2 en las líneas LLCPK-1 µ1B y LLCPK-1 µ1A, se observó que en la primera el canal se expresó en la membrana basolateral, sin embargo en las µ1A la expresión fue no polarizada, observándose señal tanto en la membrana apical como basolateral. En ambas líneas se observa una expresión intracelular (Figura 11 A, B). La distribución no polarizada en las células LLCPK-1 µ1A ha sido reportada para la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, por Folsch y colaboradores en el 2003. También se reportó esta distribución para la subunidad H del receptor asialoglicoproteína humano (Sugimoto *et al.*, 2002),



Figura 10: Expresión basolateral de ClC-2. A: Células MDCK (n=15), B: Células Caco-2 (n=8). Las células se cultivaron en cubre objetos y se transfectaron con ClC-2 silvestre fusionado a GFP 2 a 3 días post confluencia. Las células Caco-2 se transfectaron 10 días post sembrado. En ambos tipos celulares se observa la expresión de ClC-2 exclusivamente en la membrana basolateral (plano X-Z). Las barras representan 10 μm.

en las células LLCPK-1 parentales, sin embargo el modelo LLCPK-1  $\mu$ 1A fue desarrollado como un control negativo de distribución basolateral, similar a la línea parental. Esto es debido a que la subunidad  $\mu$ 1A del complejo adaptador de clatrina AP-1, no está relacionado con direccionamiento de proteínas en epitelios, a diferencia de la subunidad  $\mu$ 1B (Folsch *et al.*, 1999).

Con el propósito de comparar el patrón de expresión que presentó ClC-2, con una proteína la cual se conoce su expresión polarizada, se realizaron experimentos con el canal hSlo. Este canal transfectado establemente en células MDCK, se expresa exclusivamente en la membrana apical (Bravo-Zehnder *et al.* 2000). Con este experimento se pretendía evaluar también el método de transfección aguda en monocapas, esperándose el mismo patrón que en la transfección estable. Las células MDCK se transfectaron agudamente con el canal hSlo, en las mismas condiciones utilizadas para ClC-2. hSlo se expresó en la membrana apical de las células MDCK, con el mismo patrón que se observó con la transfección estable (Figura 11 C). Esto demuestra que la transfección aguda en monocapas no altera el patrón de expresión de una proteína que se ha estudiado con transfecciones estables.

### 4.2.2 Expresión de ClC-2 en células epiteliales sembradas en filtros permeables.

Las células epiteliales sembradas sobre cubre objetos son capaces de diferenciarse formando monocapas, sin embargo el crecimiento sobre una superficie impermeable evita el intercambio de sustancias a través de la membrana basolateral de las células. Con el propósito de acercarse lo máximo posible a lo que ocurre *in vivo*, se utilizó el sistema de los filtros permeables para proporcionarles a las células un soporte que emulara mejor una situación fisiológica.

Los filtros permeables poseen un sistema de dos cámaras independientes que permiten alimentar a las células que están formando monocapas por ambas superficies, apical y basolateral,



Figura 11: Expresión diferencial de CIC-2. Las células se sembraron en cubreobjetos y se transfectaron 2 a 3 días post confluencia con el CIC-2 silvestre fusionado a GFP, o el hSlo silvestre con el epítope c-myc. A: En las células LLCPK-1  $\mu$ 1B CIC-2 se expresó en la membrana basolateral (n=6). B: En las células LLCPK-1  $\mu$ 1A, se observó una distribución no polarizada del canal, observándose tanto en la membrana apical como en la basolateral (n=7). C: El canal hSlo

se expresa exclusivamente en la membrana apical de las células MDCK (n=6). En todas las imágenes las barras representan 10 μm.

además de permitir el intercambio de sustancias entre el medio de cultivo y la región basal de las células. Por otro lado se logra una mejor eliminación de los desechos metabólicos celulares. Con estos experimentos se pretendía además evaluar posibles diferencias en la expresión del canal, por el tipo de soporte utilizado, dependiendo del cual, se podría llegar a una mejor diferenciación de la monocapa. Así, se aseguraría la presencia de una maquinaria de direccionamiento de proteínas eficiente al momento de transfectar el canal. En la figura 12 se muestra un esquema del sistema de filtros permeables.

Las células se transfectaron en las mismas condiciones que las utilizadas cuando se sembraron en cubre objetos. Las preparaciones se analizaron 24 horas después de realizada la transfección. El patrón de expresión de ClC-2 silvestre, transfectado en las células sembradas en filtros permeables, fue el mismo que se observó en las células sembradas en cubre objetos. En las células MDCK, Caco-2 y LLCPK-1 µ1B, se expresó en la membrana basolateral, mientras que en las células LLCPK-1 µ1A se observó una expresión no polarizada. En todas las líneas celulares se observó señal intracelular (Figura 13). Este resultado indica que el soporte utilizado para sembrar las células, no influye en la formación de la monocapa y la expresión polarizada de ClC-2.

La correcta formación de la monocapa, con uniones intercelulares que forman una barrera física entre la membrana apical y basolateral, es requisito principal para el establecimiento de la polaridad de las proteínas de membrana en estos tipos celulares. Para esto, primeramente el cultivo debe alcanzar la confluencia, es decir, no deben existir espacios libres entre las células. Es en este punto cuando se empiezan a formar las uniones intercelulares, como uniones oclusivas,



Figura 12: Sistema de filtros permeables. Las células se sembraron sobre el filtro de poliester, que tiene un tamaño de poro de 0,4 µm. El medio de cultivo está en contacto con los lados apical y basolateral, en cámaras independientes.



Figura 13: Expresión de ClC-2 en filtros permeables. Las células se sembraron en filtros permeables, y se transfectaron con ClC-2 silvestre fusionado a GFP. ClC-2 se expresó en la membrana basolateral en las células MDCK, Caco-2 y LLCPK-1  $\mu$ 1B (A, n= 6; B, n= 4; C, n= 6), mientras que en las células LLCPK-1  $\mu$ 1A, se observó una expresión no polarizada (D n= 7). En todas las imágenes las barras representan 10  $\mu$ m.

uniones comunicantes y uniones estrechas. Estas son características de una monocapa celular que se ha empezado a diferenciar en un tipo epitelial. La figura 14 muestra una fotografía en campo claro de células MDCK, en la cual se evidencia la formación de la monocapa, observándose las células en alta densidad, sin espacios aparentes entre ellas. Esto demuestra que al momento de realizar los experimentos de transfecciones agudas, las células estaban efectivamente formando una monocapa. Lo mismo se observó para las células Caco-2 y LLCPK-1 µ1A y µ1B.

### 4.3 Controles de Polarización celular.

Si bien el registro de la imagen de la monocapa formada, en las fotografías en campo claro, nos entrega una aproximación de la polarización de estas células, existen otro tipo de experimentos que entregan más y mejor información acerca de este fenómeno. En este estudio se utilizaron inmunolocalización de la proteína ZO-1 (*zonula occludens*-1) de las uniones estrechas, y la medición de resistencias transepiteliales.

#### 4.3.1 Resistencia transepitelial.

La resistencia transepitelial corresponde a un indicador de la función de transporte de iones por la vía paracelular. Por lo tanto depende directamente del establecimiento de las uniones estrechas y de las proteínas que forman parte de éstas y que pueden ser permeables a ciertos iones, tales como las claudinas (Turksen *et al.*, 2004). Por lo tanto la formación y permeabilidad de las uniones estrechas determinan la resistencia e integridad de la monocapa. Una monocapa inmadura o que presente disociación de las uniones estrechas o daño celular, tendrá una baja resistencia transepitelial. La resistencia transepitelial puede ser monitoreada con un voltímetro, o



Figura 14: Células MDCK formando una monocapa. Las células se sembraron en filtros permeables, y se fotografiaron 2 a 3 días post confluencia. El mismo patrón se observó en las células Caco-2 y LLCPK-1 µ1A y µ1B. La barra representa 10 µm.
montando las monocapas en una cámara de Ussing. Este fue el método utilizado en este estudio.

Las células se crecieron en filtros permeables en las mismas condiciones utilizadas en los experimentos de localización subcelular del canal. Se montaron los filtros en una cámara de Ussing y se hicieron mediciones de las corrientes transepiteliales, manteniendo una diferencia de potencial transepitelial constante (*voltage clamp*). La resistencia transepitelial se calculó utilizando la ley de Ohm ( $\Delta V = \Delta I \ge R$ ). Estas mediciones se hicieron en células transfectadas y no transfectadas, con el propósito de monitorear la integridad de la monocapa al momento de realizar las transfecciones, y además evaluar el posible daño celular que podría producirse con el proceso de transfección. Esto se vería reflejado en una caída de la resistencia transepitelial, por formación de agujeros en la monocapa, producto de la citotoxicidad del reactivo lipídico utilizado (Tucker *et al.*, 2003). En la figura 15 se muestra un esquema general de una cámara de Ussing con sus diferentes componentes.

Las mediciones de las resistencias transepiteliales mostraron en primer lugar, que dichos valores fueron similares a los descritos en la literatura para las distintas líneas celulares estudiadas. Estos valores indican que las células estaban formando una monocapa con características polarizadas al momento de realizar las transfecciones agudas. Cada línea celular presenta valores máximos de resistencia transepitelial, después de los días de cultivo a post confluencia, y dependen de las características propias de cada tipo celular estudiado, que depende a su vez de la batería de canales, bombas y transportadores que expresa, que van a permitir un mayor o menor flujo transepitelial de iones. Las resistencias transepiteliales medidas después de las transfecciones, no difieren significativamente de las células no transfectadas. Se observa una pequeña disminución de estos valores, que no reflejaría una desorganización o daño en la monocapa. Este hecho concuerda con lo observado por Tucker y colaboradores en el 2003, que



Figura 15: Esquema de una cámara de Ussing. Las células crecidas en el filtro permeable se montan como una barrera que separa la cámara apical y basolateral, que contienen la solución de trabajo. La temperatura de la cámara está regulada por un sistema de recirculación de agua conectado a un baño termorregulado. Cada cámara se encuentra en contacto con dos electrodos, uno de voltaje y otro de corriente.

observaron una disminución de la resistencia transepitelial en células MDCK de alrededor de 100 Ohm x  $cm^2$ , dentro de las seis horas de transfección, sin embargo, parada la transfección, la resistencia transepitelial subía nuevamente hasta alcanzar los mismos valores exhibidos antes de la transfección.

Los valores de las resistencias obtenidas para los distintos tipos celulares se resumen en la tabla 5. Para las células MDCK los valores máximos de alrededor de 250 Ohm x cm<sup>2</sup>, corresponden al valor observado para las células MDCK II (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1985, Jou *et al.*, 1998). El valor alcanzado post transfección, fue de alrededor de 10 Ohm x cm<sup>2</sup> menor. Las células Caco-2 exhibieron una resistencia transepitelial máxima de alrededor de 480 Ohm x cm<sup>2</sup>, similar a lo reportado por Rao y colaboradores en 2002. En estas células la resistencia transepitelial disminuyó en alrededor de 60 Ohm x cm<sup>2</sup>, después de la transfección. Finalmente las células LLCPK-1 µ1A y µ1B exhibieron resistencias transepiteliales de alrededor de 120 Ohm x cm<sup>2</sup>, que disminuyó entre 20 y 30 Ohm x cm<sup>2</sup> después de la transfección. Los valores de resistencia exhibidos por estas células, concuerdan con los valores reportados para la línea LLCPK-1 parental (Clarke *et al.*, 2000).

Las pequeñas variaciones en los valores de las resistencias transepiteliales después de las transfecciones, indicarían que no se producen alteraciones en la función de barrera de la monocapa, conservándose la estructura y función de las uniones estrechas.

## 4.3.2 Inmunolocalización de la proteína ZO-1

Con el objetivo de tener un control adicional respecto de la polarización de las monocapas, se realizaron experimentos de inmunolocalización de la proteína ZO-1 de las uniones estrechas.

Resistencia transepitelial (Ohm cm<sup>2</sup>)

Células	Transfectadas	Sin transfectar
MDCK	251	258
Caco-2	425	484
LLCPK-1 µ1A	110	145
LLCPK-1 µ1B	105	122

**Tabla 5:** Resistencias transepiteliales de las monocapas celulares. Las células se crecieron en filtros permeables y se midió la resistencia transepitelial en una cámara de Ussing.

La proteína ZO-1 es una proteína de andamiaje intracelular, que está asociada a las uniones estrechas en las células epiteliales, a través de uniones a otras proteínas tales como claudinas y ocludinas (Stevenson *et al.*, 1986). Además está asociada al citoesqueleto a través de proteínas de unión a actina como  $\alpha$ -catenina y espectrina (Itoh *et al.*, 1997, Mattagajasingh *et al.*, 2000). Su expresión está asociada con la función de barrera de las uniones estrechas, y se ha utilizado generalmente como un marcador de la madurez de una monocapa (Rajasekaran *et al.*, 2003).

Las células se sembraron en cubre objetos en las mismas condiciones que las utilizadas para los experimentos de transfecciones agudas. Dos a tres días post confluencia se realizó la inmunolocalización de la proteína ZO-1, utilizando como anticuerpo secundario Alexa Flúor 568. En estas condiciones, en las cuales se realizaron las transfecciones agudas, se observó que las cuatro líneas celulares analizadas se encontraban expresando la proteína ZO-1 en la región más apical de los contactos célula-célula, lo que evidencia la presencia de las uniones estrechas (Figura 16).

### 4.4 Co-detección de ClC-2 y ZO-1.

Con el propósito de comparar la expresión de ClC-2 en las líneas celulares estudiadas, con una proteína que marca la localización de las uniones estrechas, y por lo tanto el límite entre la membrana apical y basolateral, se realizaron experimentos de detección simultánea de ClC-2 fusionado a GFP transfectado, y la proteína ZO-1 endógena. Con estos experimentos se pretendía identificar la expresión de ClC-2 sólo en una de las dos membranas, apical o basolateral, señal que debería estar delimitada por la expresión de ZO-1. También se evaluaría la expresión del



Figura 16: Inmunolocalización de la proteína ZO-1. Las células se sembraron en cubre objetos y se realizó la inmunolocalización de la proteína ZO-1 de las uniones estrechas, dos a tres días post

confluencia. Se observa la expresión de ZO-1 en la región más apical de los contactos célulacélula, en todas las líneas celulares estudiadas. A: MDCK, B: Caco-2, C: LLCPK-1 μ1A, D: LLCPK-1 μ1B, E: Control negativo representativo. La barra en A, C y D representa 20 μm, y en B representa 10 μm.

CIC-2 en las células Caco-2, ya que existen reportes que han identificado al canal co-localizando con las proteínas ocludina y ZO-1 de las uniones estrechas, en esta línea celular derivada de intestino humano, así como en intestino nativo (Mohammad-Panah *et al.*, 2001, Gyömorey *et al.*, 2000). Nuestros primeros resultados, si bien muestran a CIC-2 expresándose en la membrana basolateral de las células Caco-2, podría ser posible que esta señal no estuviera delimitada por las uniones estrechas, por lo que igualmente co-localizaría con la proteína ZO-1. Además, esto podría ser aún más probable en las células LLCPK-1 µ1A, en las cuales el canal presenta una expresión no polarizada.

Las células se sembraron en cubre objetos y se transfectaron con ClC-2 fusionado a GFP en las mismas condiciones utilizadas anteriormente, y se realizó la inmunodetección de ZO-1 24 horas post transfección. En las cuatro líneas celulares estudiadas, no se observó co-localización de la señal de ClC-2 con ZO-1. No se observó el patrón reportado en células Caco-2 por Mohammad-Panah y colaboradores. Tampoco se observó co-localización en las células LLCPK-1 µ1A, que sin embargo mantuvieron la expresión no polarizada del canal, observándose la señal de ClC-2 por encima y por debajo de la señal de ZO-1. En las otras líneas celulares, se observa la expresión del canal por debajo de la señal de ZO-1. En todas las líneas celulares se observó señal intracelular. En la figura 17 se muestran imágenes representativas de los experimentos descritos.



Figura 17: Co-detección de ClC-2 y ZO-1. Las células se sembraron en cubre objetos y se transfectaron 2 a 3 días post confluencia. La inmunolocalización de ZO-1 se realizó 24 horas post transfección. No se observa co-localización de ClC-2 y ZO-1 en ninguna de las líneas celulares estudiadas. En las células MDCK, Caco-2 y LLCPK-1 μ1B, se observa la señal por debajo de la señal de ZO-1, en la membrana basolateral. En las células LLCPK-1 μ1A la señal se observa tanto en la membrana apical como en la basolateral. A: MDCK (n=5), B: Caco-2 (n=11), C: LLCPK-1 μ1A (n=7), D: LLCPK-1 μ1B (n=3). En todas las imágenes las barras representan 10 μm.

#### 4.5 Mutaciones de CIC-2 en motivos de direccionamiento.

En la expresión de ClC-2 nativo en las líneas celulares estudiadas, se observó que el canal es basolateral en las células MDCK, Caco-2 y LLCPK-1  $\mu$ 1B, mientras que en las LLCPK-1  $\mu$ 1A se observó una expresión no polarizada. Este resultado, sugiere que el direccionamiento basolateral de ClC-2 en células epiteliales, sería dependiente de la subunidad  $\mu$ 1B del complejo adaptador de clatrina AP-1B.

Es un hecho bien conocido que las subunidades  $\mu$  son capaces de interactuar al menos in vitro, con señales de direccionamiento y endocitosis basadas en residuos críticos de tirosina, del tipo YXXØ (Ohno *et al.*, 1995, 1999, Aguilar *et al.*, 2001). También se ha reportado la interacción *in vitro* de las subunidades  $\mu$  con motivos de di leucinas (Hofmann *et al.*, 1999), sin embargo otros estudios han mostrado la interacción de estas señales con la subunidad  $\beta$  de los complejos adaptadores de clatrina (Rapoport *et al.*, 1998), y con los adaptadores GGA (Golgilocalized, Gamma-ear-containing, Arf-binding), (Heilker *et al.*, 1999, Bonifacino and Traub, 2003).

La presencia de motivos similares en ClC-2, ubicados en regiones intracelulares, hacen de éstos buenos candidatos como blancos de mutaciones, para poder analizar su participación en el direccionamiento del canal, teniendo como base la expresión polarizada del canal nativo en las líneas celulares derivadas de epitelios. Varios de estos motivos se mutaron, y se realizaron transfecciones agudas en células MDCK. Algunos mutantes estaban fusionados a GFP y otros estaban marcados con el epítope de hemaglutinina (HA), para su detección. Las mutaciones que se utilizaron generan los siguientes cambios:

 $\Delta$ 16-61: Deleción que genera la pérdida de 45 aminoácidos en el extremo amino terminal.

Provoca la pérdida de tres tirosinas presentes en motivos del tipo YXXØ:

Y17, en motivo ALQY, (se lee en forma reversa).

Y23 e Y26, en motivo YGRY, (se lee en ambos sentidos).

Y64A: Mutación puntual que genera el cambio de la tirosina número 64 por una alanina, en el motivo LLEY, (se lee en forma reversa).

Y179A: Mutación puntual que genera el cambio en la tirosina número 179 por una alanina, en el motivo LKEY, (se lee en forma reversa).

Y555F: Mutación puntual que genera el cambio en la tirosina número 555 por una fenilalanina, en el motivo YDSI.

LL61-62AA: Mutación doble que genera el cambio de las leucinas número 61 y 62 por alaninas.

LL812-813AA: Mutación doble que genera el cambio de las leucinas número 812 y 813 por alaninas.

La literatura presenta varios ejemplos en donde se han mutado este tipo de motivos en distintas proteínas que se expresan en la membrana basolateral de células epiteliales, y se ha visto el cambio en la polaridad de dichas proteínas, expresándose entonces en la membrana apical o no polarizadas (Bello *et al.*, 2001, Geffen *et al.*, 1993, Honing and Hunziker, 1995, Danis *et al.*, 2004, Jespersen *et al.*, 2004, Bonifacino and Dell' Angelica, 1999, Matter *et al.*, 1992). En la figura 18 se muestra la posición de estos putativos motivos de direccionamiento, y la mutación correspondiente.

Las posiciones de los residuos mutados en la secuencia del clon humano de ClC-2 son los siguientes: motivos ALQY, YGRY y LLEY: tirosinas 17, 23, 26 y 64, y leucinas 61 y 62, se encuentran en el extremo amino terminal de la proteína. Motivo LKEY: tirosina 179, se ubica en un asa intracelular, entre las alfa hélices D y E. Motivo YDSI: tirosina 555, se encuentra en uno



Figura 18: Ubicación de los motivos de direccionamiento. En rojo se indican los residuos de tirosina o leucinas que se mutaron. Se analizaron las siguientes mutaciones: Motivos ALQY, YGRY: deleción 16-61; LLEY: Y64A, LL61-62AA; LKEY: Y179A; YDSI: Y555F; LL CBS2: LL812-813AA. La línea punteada representa la posición relativa de la membrana plasmática, con los extremos amino y carboxilo terminal hacia el intracelular.

de los extremos de la alfa hélice R, formando parte de la región terminal intracelular del poro del canal. Las leucinas 812 y 813, están formando parte del motivo CBS 2, en el extremo carboxilo terminal. No se conoce exactamente la función de los motivos CBS en los canales CIC, al respecto existe un estudio de tres truncaciones en el canal CIC-5, que sugiere un posible rol del motivo CBS2 en el tráfico de este canal, sin embargo no se hizo una caracterización de los motivos estructurales que estarían dando cuenta de esa función (Carr *et al.*, 2003).

Las células se sembraron en cubre objetos y se transfectaron con los plasmidios codificantes para ClC-2 mutante, 2 a 3 días post confluencia. Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal 24 horas después de parada la transfección. El análisis de las imágenes, demostró que las mutaciones en los motivos de tirosinas no alteraron el patrón de expresión basolateral, observado en el canal nativo (figura 19). Si bien todos estos residuos mutados están formando parte de motivos del tipo YXXØ, estos no estarían involucrados en el direccionamiento basolateral del canal.

Las mutaciones  $\Delta$ 16-61, Y64A e Y555F estaban fusionadas a GFP, mientras que la mutación Y179A estaba marcada con el epítope HA.

El siguiente paso fue evaluar los motivos de di leucinas presentes en ClC-2. Se analizó un motivo presente en el extremo amino terminal en la posición 61-62, y otro ubicado en el extremo carboxilo terminal en la posición 812-813. Esta señal se encuentra formando parte del segundo motivo CBS del canal. Si bien los tipos de señales basolaterales analizados están bien descritos para otras proteínas, para los canales ClC no se sabe cuales serían los determinantes del tráfico, y menos aún del direccionamiento en células epiteliales. Para ClC-2 aún existe controversia, si se trata de un canal que se expresa en la membrana apical o basolateral de los epitelios *in vivo*. El



Figura 19: Expresión de mutantes de ClC-2 para motivos de tirosina. Las células MDCK se cultivaron en cubre objetos, y se transfectaron 2 a 3 días post confluencia. Se observa la expresión basolateral de todos los mutantes analizados. A: Mutación  $\Delta$ 16-61 (n=5), B: Y179A (n=12), C: Y555F (n=12), D: Y64A (n=8). En todas las imágenes la barra representa 10 µm.

poder identificar algún determinante molecular responsable de su direccionamiento, podría dar luces acerca de su localización en tejidos nativos.

En los experimentos con los mutantes de di leucinas las células MDCK se sembraron en cubre objetos, y se transfectaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Al analizar las imágenes obtenidas se observó que la mutación LL61-62AA del extremo amino terminal, no difirió de la localización basolateral observada en el canal nativo. Sin embargo, la mutación LL812-813AA, del motivo CBS del extremo carboxilo terminal, presentó una distribución exclusivamente en la membrana apical de las células MDCK, sin observarse tampoco una significativa señal intracelular en todas las imágenes analizadas. Este hallazgo estaría entregando el antecedente de que efectivamente CIC-2 es un canal basolateral, que es direccionado en células MDCK, a través de un motivo de di leucina. Sin embargo, como los experimentos del canal nativo se realizaron con la proteína fusionada a GFP, se debía tener el control del canal nativo con el epítope HA. Estos experimentos mostraron la localización basolateral de este constructo, al igual que el canal fusionado a GFP. Con esto se descarta una posible alteración en el direccionamiento del canal con la mutación LL812-813AA, por efecto de la presencia del epítope HA. El patrón de expresión observado para esta mutante es muy similar al observado para el canal apical hSlo, expresado en las células MDCK. En la figura 20 se muestran las imágenes de los experimentos descritos.

Estos resultados indican la dependencia en la polarización de ClC-2 en epitelios, de un motivo de di leucina presente en un motivo CBS 2, lo que podría arrojar luces de alguna de las funciones de este tipo de motivos en los canales tipo ClC.

Finalmente, con el propósito de analizar la localización de la señal apical de la mutación LL812-813AA, se hicieron experimentos de co-detección con la proteína ZO-1 de las uniones



Figura 20: Expresión diferencial de mutantes de di leucinas. Las células MDCK se sembraron en cubre objetos y se transfectaron 2 a 3 días post confluencia. A: La mutación LL61-62AA del extremo amino terminal de ClC-2 se expresó en la membrana basolateral (n=9). B: ClC-2 con la mutación LL812-813AA, del motivo CBS 2, del extremo carboxilo terminal, se expresó con un patrón similar al de hSlo (D), en la membrana apical de las células MDCK (n=11). C: El canal

nativo con el epítope HA se expresó en la membrana basolateral, al igual que el canal fusionado a GFP (n=10). Las barras representan 10 μm.

estrechas. En las imágenes se observó que la señal del canal está por sobre las uniones estrechas, o en un plano paralelo a éstas, lo que está indicando la expresión exclusivamente en la membrana apical de las células MDCK (Figura 21).

Estos resultados implican una relación entre lo observado en las células LLCPK-1 µ1A, y la mutación de las leucinas 812 y 813 del motivo CBS 2. Si bien en el primer caso se observó la expresión no polarizada del canal nativo, y en el segundo una expresión apical, en ambos casos se observa una deslocalización de ClC-2, esto debido a que en las otras líneas celulares estudiadas y todas las mutaciones analizadas, el canal se expresó siempre en la membrana basolateral.



Figura 21: Co-detección del mutante LL812-813AA con ZO-1. Las células MDCK se sembraron en cubre objetos, y se transfectaron 2 a 3 días post confluencia. 24 horas post transfección se realizó la inmunodetección de la proteína ZO-1. La señal del canal mutante se observó en la membrana apical, en un plano paralelo a las uniones estrechas. Las barras representan 10 µm.

# **5. DISCUSIÓN**

Algunas de las funciones que se le han atribuido a CIC-2 requieren de su expresión polarizada en epitelios. Su participación en el movimiento transepitelial de fluidos, a través del transporte vectorial de cloruro, necesariamente implica una localización específica de este canal, en la membrana apical o basolateral de las células epiteliales. La polarización de proteínas en epitelios, es un proceso que puede llevarse a cabo por dos vías distintas, una directa y otra indirecta. En la ruta directa las proteínas son direccionadas en la red trans Golgi directamente a la membrana apical o basolateral. Sin embargo, es probable que existan múltiples vías desde la red trans del Golgi hasta cada superficie. Por otro lado, en la ruta indirecta, las proteínas son enviadas primero a una superficie, usualmente la basolateral. Desde aquí, las proteínas son endocitadas y enviadas a endosomas tempranos. Las proteínas endocitadas, pueden ser recicladas a la superficie de origen, ser degradadas en endosomas tardíos o lisosomas, o pueden ser enviadas a la superficie opuesta por transcitosis (Figura 22). La utilización de la ruta directa o indirecta depende de la proteína y el tipo celular en donde se exprese (Mostov et al., 2000). En este contexto, la expresión polarizada de ClC-2 en epitelios, debería estar sujeta a alguno de los mecanismos descritos, por lo tanto el poder investigar la expresión de ClC-2 en líneas celulares epiteliales derivadas de tejidos diferentes, y los posibles determinantes moleculares de esta expresión, podría contribuir a comprender como se expresa el canal en los tejidos nativos y la función que cumpliría desde esa localización.



Figura 22. Esquema del direccionamiento de proteínas en epitelios. A: Direccionamiento directo. Las proteínas son direccionadas directamente, desde la red Trans del Golgi hacia la membrana de destino. 1: apical, 2: basolateral. B: Transcitosis. Las proteínas son direccionadas hacia una de las dos membranas, usualmente la basolateral (1). Luego son endocitadas (2), y recicladas desde endosomas, a la misma membrana basolateral (3), o enviadas a la membrana apical (4).

Para abordar estos puntos, es necesario contar con un modelo adecuado de experimentación, que permita desarrollar experimentos confiables y reproducibles. Se eligió trabajar con cuatro líneas celulares derivadas de epitelios diferentes. Con esta aproximación se podría estudiar el asunto de posibles diferencias en la expresión polarizada de CIC-2, por diferencias propias en los mecanismos de direccionamiento entre las líneas celulares estudiadas.

Es un hecho conocido que existen proteínas que se expresan en la membrana basolateral de ciertos epitelios, y en la membrana apical de otros. Tal es el caso de la Na-K ATPasa, que se expresa en la membrana basolateral de la mayoría de los epitelios, sin embargo en el epitelio pigmentado retinal, se expresa en la membrana apical. Lo mismo sucede con la proteína CD147, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Gundersen et al., 1991, Marmorstein et al., 1996). Otro ejemplo es el canal de potasio KCNQ1, que se ha identificado en la membrana apical de las células parietales del estómago, y en las células del túbulo contorneado proximal, mientras que en el páncreas exocrino y las células epiteliales de la tráquea se expresa en la membrana basolateral (Dedek and Waldegger, 2001, Vallon et al., 2001, Grahammer et al., 2001b). En este estudio se utilizaron las líneas celulares MDCK, derivadas de túbulo contorneado distal y tubo colector de riñón de perro, las Caco-2, derivadas de un colocarcinoma humano, y las líneas LLCPK-1 µ1A y LLCPK-1 µ1B, ambas derivadas de túbulo contorneado proximal de riñón de cerdo. Estas últimas, tienen establemente transfectadas las subunidades  $\mu$ IA y  $\mu$ IB del complejo adaptador de clatrina AP-1. Ambas subunidades están relacionadas con el tráfico de proteínas, sin embargo  $\mu$ 1A, se expresa ampliamente en distintos tipos celulares, mientras que  $\mu$ 1B se expresa exclusivamente en células de origen epitelial, y ha sido relacionada con el direccionamiento basolateral de proteínas (Folsch et al., 1999). Con estas líneas celulares, además se podría tener una aproximación en cuanto a la participación de los complejos adaptadores de clatrina, a través de sus subunidades  $\mu$ , en el direccionamiento de ClC-2.

En cuanto a la dependencia de la misma proteína en la expresión polarizada, se analizaron distintas mutaciones en motivos de direccionamiento descritos en otras proteínas. Estos están formados usualmente por secuencias peptídicas cortas, que se encuentran orientadas hacia la región intracelular (Le Gall *et al.*, 1995, Mostov *et al.*, 2000). Estas secuencias incluyen motivos basados en tirosinas, del tipo YXXØ, así como motivos de di leucinas (Hunziker and Fumey, 1994).

# 5.1 Transfecciones agudas.

Para investigar los puntos descritos, se utilizó la técnica de transfecciones agudas en las monocapas celulares. Para este fin se contaba con los plasmidios de CIC-2 recombinante, silvestre y con las mutaciones en los motivos de direccionamiento. Estos plasmidios contenían el cDNA del canal fusionado a la proteína fluorescente verde, o marcado con el epítope HA. La transfección de los plasmidios con CIC-2 silvestre, produce la expresión funcional del canal en la membrana, para las construcciones fusionadas a GFP ó marcadas con el epítope HA. Esto se determinó por mediciones realizadas en este laboratorio, de las corrientes características de CIC-2 por el método de patch clamp. Estos experimentos validan la expresión de los constructos de CIC-2 en la membrana plasmática. Además, el uso de dos tipos de marcaje del canal (GFP y HA), servirían para identificar alguna diferencia en el direccionamiento del canal en células epiteliales, producido por la interferencia ya sea de GFP ó HA.

El método de transfecciones agudas en células epiteliales con reactivos lipídicos, tales como lipofectina o lipofectAMINA ha tenido un uso limitado, debido a su poca eficiencia o toxicidad. Sin embargo, el desarrollo de nuevos compuestos ha demostrado buenos resultados. En este estudio se utilizó el reactivo lipofectAMINA 2000 (Invitrogen), según lo reportado por Tucker y colaboradores el 2003. En ese estudio se reportó la transfección aguda eficiente en monocapas de células MDCK y 16HBE14o<sup>-</sup>, con constructos del canal CFTR fusionados a GFP y sin marcaje. En estos estudios se identificó a lipofectAMINA 2000 y lipofectAMINA PLUS como los reactivos más eficientes al momento de transfectar las monocapas polarizadas. En ese estudio se muestra la expresión del canal tanto por técnicas de microscopía, inmunoprecipitación y electrofisiología (en cámaras de Ussing). Esto muestra que la expresión transitoria de proteínas en monocapas, puede lograr una expresión en cantidades cuantificables. Para el tipo de estudios que se realizaron en este trabajo, de identificación de la expresión subcelular de CIC-2, esta técnica resultó apropiada.

Las transfecciones realizadas con los constructos de CIC-2, se analizaron a las 24 horas post transfección, no a las 48 horas como se realizó en el trabajo de Tucker y colaboradores. Se observó que la mayor expresión de CIC-2 se obtenía a las 24 horas post transfección, mientras que a las 48 horas la expresión empezaba a disminuir. Esto puede deberse a las características propias de la proteína estudiada en las condiciones de transfección aguda, que podrían determinar un aumento en la velocidad de degradación de la proteína. Por esta razón no se podía realizar la transfección en los cultivos subconfluentes (90% de confluencia), y esperar a llegar a la confluencia como lo reportó Jespersen y colaboradores en el 2004, debido a que en ese momento no se observaría ya la expresión de CIC-2. Por otro lado en ese estudio las células se analizaron 3

días post sembrado, mientras que en éste, se analizaron 3 días post confluencia, lo que aseguraría una correcta polarización de la monocapa.

La eficacia del proceso de transfección también depende del tipo celular utilizado. En este estudio se observó que las células LLCPK-1 y Caco-2 resultaron más difíciles de transfectar, por lo que en estas células se observó menor expresión que en las células MDCK. Por otro lado se observó que en las células LLCPK-1 las monocapas resultantes eran más débiles que en las otras líneas, por lo que podrían haber sido más sensibles al proceso de transfección. Además, se observó que las LLCPK-1 µ1A, a medida que se extendía el tiempo de sembrado, empezaban a perder las características de monocapa, creciendo montadas, en capas múltiples, esto fue reportado también por Folsch y colaboradores en 1999. Por esta razón al momento de llegar los dos o tres días post confluencia, resultó ser el tiempo adecuado para realizar la transfección. En este momento, el cultivo todavía presentaba características de monocapa en la mayor parte del área, de lo contrario sería difícil analizar si el patrón de expresión resultante, es producto de la maquinaria de direccionamiento, o de un epitelio que perdió las características de una monocapa polarizada.

# 5.2 Controles de polarización.

Para lograr que los resultados obtenidos representen en realidad el patrón de expresión de ClC-2 en líneas celulares derivadas de epitelios, era necesario asegurar el hecho de que las células estuviesen realmente polarizadas al momento de realizar las transfecciones, debido a que la ausencia de uniones estrechas y por ende la falta de un límite físico entre la membrana apical y basolateral, podría producir la expresión distorsionada de ClC-2, observándose un patrón no polarizado.

La primera aproximación para realizar estos controles, fue verificar si las células presentaban un patrón de monocapa al momento de realizar las transfecciones. Esto se logró en primera instancia, tomando fotografías en campo claro de las células (Figura 14). Esta imágen muestra una monocapa con alta densidad celular, sin espacios aparentes entre las células. Esto indica la presencia de un cultivo celular con aparentes características de monocapa polarizada. Sin embargo, la polarización de una monocapa celular depende de muchos factores, entre ellos la presencia de proteínas como ocludina, claudinas, ZO-1, Na-K, ATPasa, y la concentración de calcio (Stevenson *et al.*, 1986, Rajasekaran *et al.*, 2001, Schneeberger y Lynch, 2004, González-Mariscal *et al.*, 1990). Esto se puede observar en células como las HT-29, derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, las cuales dependen de inductores para su diferenciación, como el butirato de sodio, o un medio de cultivo bajo en glucosa (Wice *et al.*, 1985, Pinto *et al.*, 1982). Por lo tanto, la simple observación de un cultivo con alta densidad celular no es suficiente para establecer las características polarizadas de dicho cultivo.

Para resolver esto, se hicieron experimentos de inmunolocalización de la proteína ZO-1, y medición de las resistencias transepiteliales.

Las imágenes de la figura 16, muestran la expresión de la proteína ZO-1 en las cuatro líneas celulares estudiadas, en el extremo más apical de los contactos célula-célula. Este resultado demuestra la presencia de esta proteína de las uniones estrechas al momento de realizar las transfecciones, ya que la inmunolocalización de ZO-1 se realizó dos a tres días post confluencia, el mismo tiempo que se esperó para realizar las transfecciones agudas. La señal que se observó en las células LLCPK-1 µ1A, fue un poco más débil que lo observado en las otra líneas celulares, sin embargo, en todos los experimentos realizados en esta línea se observó la presencia de ZO-1, en mayor o menor intensidad, dependiendo del campo observado. Esto puede deberse a que la monocapa en estas células, no presenta una morfología pareja en su parte superior, existiendo zonas que pueden ser más difíciles de alcanzar por el anticuerpo. También es posible que al ser sembradas en cubre objetos, las monocapas presenten zonas de mayor "relajación", al no tener los límites proporcionados por los filtros permeables. En estas zonas podría verse tal vez una menor expresión de la proteína ZO-1. Sin embargo, existe un estudio que indica la expresión de la proteína ZO-1 en el núcleo, en cultivos de células MDCK y LLCPK-1 subconfluentes, y confluentes a las cuales se les ha desorganizado los contactos célula-célula (Gottardi *et al.*, 1996). Esta señal nuclear de ZO-1 no se observó en este estudio en ninguna de las líneas celulares analizadas, indicando que efectivamente en las condiciones estudiadas estaba presente la barrera formada por las uniones estrechas.

Los estudios de medición de la resistencia transepitelial, mostraron valores que están dentro de lo descrito para las líneas celulares analizadas (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1985, Jou *et al.*, 1998, Rao *et al.*, 2002, Clarke *et al.*, 2002). Las resistencias se midieron en células transfectadas y sin transfectar. Se observó una pequeña disminución en la resistencia en las células que habían sido transfectadas, sin embargo este hecho también fue reportado por Tucker y colaboradores en sus experimentos de transfecciones agudas. Esto lo atribuyen a las 6 horas de transfección, en las cuales las células son mantenidas en un medio libre de suero fetal bovino, por lo que una vez que se ha cambiado al medio que lo contiene, esta pequeña baja en la resistencia empieza a normalizarse nuevamente. Este hecho no estaría dando cuenta de un daño en la monocapa como citotoxicidad, debido a que es reversible, por lo que tampoco se debería a una

pérdida masiva de la función de barrera de las uniones estrechas, ya que en este caso el descenso sería mucho mayor, como se ha reportado en estudios donde se desorganizan las uniones estrechas, por utilización de medios de bajo calcio, con quelantes de éste, o por inhibición de la actividad de la Na-K, ATPasa (González-Mariscal *et al.*, 1990, Rajasekaran *et al.*, 2001, Riesen *et al.*, 2002, Rothen-Rutishauser *et al.*, 2002). Por lo tanto en los experimentos realizados en este estudio, no se vería afectada la expresión polarizada de CIC-2, ya que no existiría pérdida del fenotipo polarizado de las células, manteniéndose la funcionalidad de las uniones estrechas.

Las diferencias entre las distintas líneas se deben a los diferentes orígenes de estas células, por lo que expresan distintas proteínas relacionadas con el transporte transepitelial de iones.

## 5.3 Expresión polarizada de ClC-2 silvestre.

Los experimentos realizados con las células crecidas en cubre objetos y filtros permeables, demostraron la expresión basolateral de ClC-2 silvestre fusionado a GFP en las células MDCK, Caco-2 y LLCPK-1 µ1B, mientras que en las células LLCPK-1 µ1A se observó una expresión no polarizada. La razón de hacer los experimentos con las células crecidas en dos superficies distintas, era comparar y observar posibles diferencias en la polarización del canal debido a las condiciones en que se crecen las células. El sistema de filtros permeables es el medio preferido al momento de realizar experimentos con células epiteliales, debido a la gran ventaja que presentan por la posibilidad de mantener las células bañadas de medio por ambas membranas, apical y basolateral. Esto permite un desarrollo de las células en un ambiente más fisiológico, por lo que el fenotipo epitelial polarizado debería expresarse plenamente. Por otro

lado, para experimentos de fluorescencia, el filtro de poliester utilizado en este estudio, presenta ventaja sobre los de policarbonato, debido a que es más translúcido.

Interesantemente al analizar los resultados obtenidos con las células crecidas en ambos tipos de soporte, no se observa ninguna diferencia en la polarización de CIC-2, obteniéndose los mismos resultados. Esto indica que en las condiciones en que se desarrollaron los experimentos de transfecciones agudas del canal, las células crecidas en ambas superficies, habían alcanzado un fenotipo polarizado, cuya maquinaria de direccionamiento no depende del tipo de soporte utilizado. Sin embargo, para el propósito de mantener las células en cultivo por más tiempo, el filtro permeable presenta ventajas evidentes, como el poder cambiar el medio de cultivo de ambas cámaras (apical y basolateral), con lo que se logra una mejor eliminación de los desechos metabólicos celulares.

Las células MDCK son un conocido modelo de investigación para la polarización de proteínas, sin embargo, no existen estudios en canales del tipo CIC en estas células. Al expresarse en la membrana basolateral, CIC-2 debería estar siendo direccionado por alguno de los mecanismos descritos para proteínas que han sido estudiadas en esta línea celular (Bello *et al.*, 2001, Ang *et al.*, 2003, Toye *et al.*, 2004, Deora *et al.*, 2004). Por otro lado la expresión basolateral en células Caco-2 se contrapone a lo reportado por Mohammad-Panah en el 2001, estudio en el que identificaron al canal colocalizando con la proteína ocludina de las uniones estrechas. En ese estudio, se reportó la contribución de CIC-2 endógeno en la secreción de cloruro en las células Caco-2. Se realizaron experimentos electrofisiológicos, en que se activó el canal utilizando medios hipotónicos. En experimentos de inmunofluorescencia se identificó la señal de CIC-2 colocalizando con la proteína ocludina de las uniones estrechas, sin embargo no se muestran imágenes confocales de los planos X-Z. La misma ubicación para CIC-2 fue

reportada por Gyömorey y colaboradores en el 2000, en el intestino delgado de ratón, y por Moeser y colaboradores, en íleon de cerdo (Moeser *et al.*, 2004). Se concluyó que desde esta ubicación, poco común para un canal iónico, CIC-2 podría estar participando en la secreción de cloruro. Sin embargo no se explica el mecanismo por el cual CIC-2 podría estar participando en dicha secreción. Considerando que CIC-2 es una proteína integral de membrana, y que al estar ubicada en las uniones estrechas, el cloruro no estaría saliendo directamente hacia la zona apical de estas células, más bien entraría en contacto con la zona paracelular, donde se ha identificado a proteínas como las claudinas de estar participando en el movimiento iónico (Turksen *et al.*, 2004). Por otro lado estos canales iónicos presentes en las uniones estrechas, se cree están orientados en un plano paralelo a las membranas plasmáticas apicales, para soportar un transporte iónico paracelular (Tang and Goodenough 2003).

Los resultados del presente estudio descartan la localización de ClC-2 en las uniones estrechas, ya que en los experimentos de co-detección de ClC-2 y ZO-1 no se observó colocalización en ninguna de las líneas celulares estudiadas (Figura 17). Estos resultados distintos, podrían deberse a que en el estudio de Mohammad-Panah se inmunolocalizó el canal endógeno, y en este estudio se utilizaron construcciones del canal recombinante, sin embargo no existe evidencia de que esto pudiese alterar la polarización del canal. Por otro lado, es posible que el anticuerpo utilizado en ese estudio, no estuviese reconociendo específicamente a ClC-2.

En las células LLCPK-1  $\mu$ 1B, ClC-2 se expresó en la membrana basolateral, mientras que en las  $\mu$ 1A lo hizo en forma no polarizada. Este hecho relacionaría el direccionamiento del canal con la subunidad  $\mu$ 1B del complejo adaptador de clatrina AP1B. La subunidad  $\mu$ 1B se expresa exclusivamente en células de origen epitelial (Ohno *et al.*, 1999), y se ha visto que es esencial en el direccionamiento basolateral de una variedad de proteínas de membrana, tales como el receptor de transferrina (TfR) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Folsch *et al.*, 1999, 2001). Al expresar estas proteínas en la línea LLCPK-1 µ1A, que no tiene la subunidad µ1B, LDLR se localizó en la membrana apical, y TfR se expresó en forma no polarizada, sin embargo, al reestablecer la expresión de µ1B, se localizaron nuevamente en la membrana basolateral (Folsch *et al.*, 1999). CIC-2 se localizó en la membrana basolateral de las líneas LLCPK-1 µ1B, MDCK, Caco-2, todas estas células expresan µ1B (Folsch *et al.*, 1999), sin embargo en la línea LLCPK-1 µ1A, se expresó en forma no polarizada como TfR, no apical como en el caso de LDLR. La expresión no polarizada en las células LLCPK-1 parentales y µ1A, ha sido reportada también para la subunidad H del receptor de asialoglicoproteína (AGPR), una proteína de la membrana lisosomal (Lamp-1), y para la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSVG). Todas estas proteínas se localizaron en la membrana basolateral al ser expresadas en las células LLCPK1 µ1B (Sugimoto *et al.*, 2002, Folsch *et al.*, 2003).

# 5.4 Expresión de mutantes en residuos de tirosinas de ClC-2.

Es un hecho conocido que las subunidades  $\mu$  interactúan directamente, al menos *in vitro*, con señales de direccionamiento que contienen residuos críticos de tirosinas del tipo YXXØ (Ohno *et al.*, 1995, Boll *et al.*, 1996, Aguilar *et al.*, 2001), además se ha observado que este tipo de señales interactúan específicamente con la subunidad  $\mu$ 1B (Ohno et al., 1999). De las proteínas mencionadas arriba, se sabe que el direccionamiento basolateral es dependiente de tirosinas críticas y de su interacción con  $\mu$ 1B, para AGPR-H1 y Lamp-1 (Geffen *et al.*, 1993, Honing and Hunziker, 1995, Sugimoto *et al.*, 2002). VSVG depende de un residuo crítico de tirosina para su expresión basolateral en células MDCK, y se asocia al complejo AP-1B, lo que

sugiere también una interacción entre el residuo de tirosina y la subunidad µ1B (Geffen *et al.*, 1993, Honing and Hunziker, 1995, Folsch *et al.*, 2003). Para TfR y LDLR, el direccionamiento basolateral no estaría mediado por la interacción de los residuos de tirosinas en las señales tipo YXXØ, con la subunidad µ1B, a pesar de ser dependiente de la presencia de ésta (Matter *et al*, 1992, Odorizzi and Trowbridge, 1997, Sugimoto *et al.*, 2002). Para analizar la posible participación de residuos críticos de tirosinas en el direccionamiento de ClC-2, que podrían estar interactuando con la subunidad µ1B, se hicieron experimentos con mutantes para estos residuos de tirosinas presentes en la región citoplasmática del canal, y se expresaron en células MDCK.

De los motivos de tirosina analizados, tres de ellos cumplen con la forma canónica YXXØ, donde X puede ser cualquier aminoácido, y Ø corresponde a un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, o hidrofóbica. Sin embargo, estos motivos en ClC-2 están en orientación reversa, o sea ØXXY. Esta orientación se ha descrito para un motivo de tirosina basolateral en células MDCK (Roush et al., 1998). En ClC-2 los motivos ALQY, LLEY, se encuentran en el extremo amino terminal, mientras que el motivo LKEY, se encuentra en un loop intracelular entre las hélices D y E (Figura 18). Este último es similar (pero en orientación reversa), al motivo YEKL presente en el extremo carboxilo terminal del receptor ionotrópico de glutamato NMDA, que media la internalización del receptor (Roche et al., 2001). El motivo YDSI que se encuentra formando parte de la alfa hélice R de CIC-2, mantiene la estructura canónica YXXØ. Esta tirosina participa en la coordinación del cloruro en la salida del poro de selectividad del canal, en el espacio intracelular (Dutzler et al., 2002). Sin embargo la hélice R está próxima al extremo carboxilo terminal (Figura 20), por lo que podría existir un re-arreglo estructural que exponga este putativo motivo de direccionamiento, durante el tráfico intracelular del canal. Por otro lado, el mismo motivo (YDSI), está presente en el extremo carboxilo terminal del canal de cloruro CFTR, y participa en su internalización por interacción con la subunidad  $\mu^2$  del complejo AP-2 (Peter *et al.*, 2002, Weixel *et al.*, 2001). Debido a que a menudo las mismas señales involucradas en internalización participan en direccionamiento basolateral, (Roush *et al.*, 1998, Geffen *et al.*, 1993, Harter and Mellman, 1992, Sugimoto *et al.*, 2002), las señales de tirosina presentes en CIC-2, podrían estar involucradas en su direccionamiento. La última señal de tirosina YGRY, que se encuentra en el extremo amino terminal del canal, no cumpliría con la forma canónica, debido a la repetición de la tirosina en uno de sus extremos, sin embargo, ésta tirosina podría considerarse como un aminoácido con grupo lateral voluminoso, y en ese caso si se ajustaría a la forma YXXØ.

En el análisis en las células MDCK, se observó la expresión basolateral de todas las mutaciones analizadas, por lo que éstas no estarían participando en el direccionamiento basolateral de ClC-2 (Figura 19). Esto sugiere que estas señales no estarían involucradas en una interacción con µ1B, por lo que el direccionamiento basolateral de ClC-2 en que estaría involucrada esta subunidad, no sería dependiente de la interacción entre µ1B y las señales de tirosinas presentes en el canal. Este hecho se observa en TfR y LDLR, en los cuales el direccionamiento basolateral, no depende de la interacción directa entre µ1B y su capacidad para unirse a señales basada en tirosinas (Sugimoto *et al.*, 2002). En este trabajo no se analizó la participación de las señales mutadas en la endocitosis de ClC-2.

#### 5.5 Expresión de mutantes de di leucinas de CIC-2.

Las señales de di leucina participan en direccionamiento basolateral y en endocitosis (Bonifacino and Traub, 2003, Sandoval et al., 1994, Hunziker and Fumey, 1994). Muchas de estas señales se encuentran dentro de formas canónicas del tipo D/EXXXLL ó DXXLL, las primeras han sido involucradas en endocitosis y direccionamiento basolateral, las segundas se identificaron primeramente en el transporte de proteínas desde la red Trans del Golgi hacia compartimentos endosomales (Bonifacino and Traub, 2003). Además se ha identificado la presencia de residuos fosforilables (S y T) en la posición -5 ó -4 de las señales tipo D/EXXXLL, que podrían estar involucrados en los eventos de direccionamiento (Dietrich et al., 1994, von Essen et al., 2002, Rapoport et al., 1998), y se ha reportado la interacción de señales tipo DXXLL con la proteína adaptadora GGA1 (Golgi-localized, gamma-ear-containing, Arf-binding), que media el transporte de proteínas desde la red Trans del Golgi a endosomas (Heilker et al., 1999, Misra et al., 2002, Bonifacino and Traub 2003,). CIC-2 posee una señal de di leucina en el extremo amino terminal, dos en el motivo CBS1, y uno en el CBS2, ambos en el extremo carboxilo terminal. De estas señales, la que se ubica en la posición 623-624 del CBS1 podría corresponder a la forma canónica D/EXXXLL, ya que posee la secuencia ESMILL. La di leucina ubicada en la posición 812-813 del CBS2 posee una secuencia que se ajustaría a la forma DXXLL, pero en dirección inversa: LLGVD. Además posee un potencial motivo fosforilable en la posición -4: TIFSLL. Las otras señales no se ajustarían a este tipo de motivos canónicos, sin embargo este requisito no siempre ha sido reportado para las señales de di leucina en direccionamiento. Un estudio reciente, incluso muestra el direccionamiento basolateral, dependiente de una leucina única, en la proteína CD147 (El Nemer et al., 1999, Miranda et al.,

2001, Regeer *et al.*, 2004, Deora *et al.*, 2004). En este estudio se investigaron mutaciones de di leucinas por alaninas, en las posiciones 61-62 del extremo amino terminal, y 812-813 del extremo carboxilo terminal de CIC-2.

La expresión de las mutaciones en células MDCK mostró una distribución en la membrana basolateral de la mutante LL61-62AA, sin embargo la mutante LL812-813AA se expresó en la membrana apical (Figura 20). Este resultado sugiere una relación entre la subunidad  $\mu$ 1B y el motivo de di leucina 812-813 en el direccionamiento de ClC-2. En este contexto se esperaría una interacción directa, lo que produciría una deslocalización del canal en ausencia de uno de los dos componentes. En el caso de la mutación, ClC-2 no podría interactuar con la subunidad  $\mu$ 1B endógena de las células MDCK, mientras que en las células LLCPK-1  $\mu$ 1A, el canal silvestre se deslocalizaría por la ausencia de  $\mu$ 1B.

La interacción directa de las subunidades  $\mu$  del complejo AP-1 con motivos de di leucinas ha resultado controversial, existen estudios que reportan la interacción de motivos de di leucina principalmente con la subunidad beta del complejo AP-1 (Rapoport *et al.*, 1998), sin embargo la interacción con la subunidad  $\mu$ 1 también ha sido reportada (Hofmann *et al.*, 1999). Es un hecho conocido que la subunidad  $\mu$ 1 interactúa principalmente con motivos basados en tirosinas, sin embargo en un estado fosforilado, sería capaz de interactuar con otro tipo de señales como las de di leucinas (Ghosh and Kornfeld, 2004). De acuerdo a esto, no puede descartarse de plano una interacción directa entre  $\mu$ 1B y el motivo de di leucina 812-813 de CIC-2. Sin embargo, la expresión no polarizada observada en la línea  $\mu$ 1A, contrasta con la distribución exclusivamente apical encontrada en la expresión de la mutante en las células MDCK. Además, existe controversia respecto de la ubicación donde estaría actuando  $\mu$ 1B. Se ha reportado su participación en la vía biosintética directa desde la red Trans del Golgi a la membrana basolateral (Ang et al., 2004), mientras que otro estudio indica que participaría en el direccionamiento basolateral post endocítico, desde endosomas de reciclaje (Gan *et al.*, 2002). Debido a esto, es posible que lo observado en ClC-2, no sea producto de un paso único desde la síntesis de la proteína hasta su llegada a la membrana basolateral.

Las proteínas en las células epiteliales pueden tomar dos rutas para alcanzar la membrana apical o basolateral: Pueden ser direccionadas directamente desde la red Trans del Golgi hacia la membrana de destino, o ser dirigidas inicialmente a una de las dos membranas, usualmente la basolateral, y luego ser endocitadas y re direccionadas a la membrana de destino (transcitosis) (Rodriguez-Boulan *et al.*, 2004).

Respecto a la aparición de la mutante de CIC-2 en la membrana apical de las células MDCK, Bello y colaboradores reportaron en el 2001 que la mutación de un motivo de di leucina, provoca la expresión en la membrana apical de la nucleotidasa NPP1 en esas células, otro estudio mostró lo mismo para E-cadherina en células MDCK y LLCPK-1 (Mirnada *et al.*, 2001). Sin embargo, en este último la expresión de la proteína nativa en las células LLCPK-1 fue en la membrana basolateral, esto también se ha reportado para las proteínas FcRIII-B2, sat-1 y CD147 (Roush *et al.*, 1998, Regger *et al.*, 2004, Deora *et al.*, 2004), las cuales también son basolaterales en células MDCK. La mutación de las di leucinas provoca la aparición de E-cadherina y FcRIII en la membrana apical, mientras que esta distribución observada en CD147 se debe sólo a una leucina. En sat-1 la mutación produce una acumulación intracelular de la proteína. El hecho de que todas estas proteínas se expresen en la membrana basolateral en las células LLCPK-1, indicaría que la ausencia de la subunidad µ1B no influiría en el direccionamiento, siendo éste un proceso sólo dependiente de la interacción las di leucinas con otro tipo de proteína adaptadora.

membrana basolateral dependiente de las di leucinas, sin involucrar un proceso de endocitosis y re direccionamiento en el que participaría  $\mu$ 1B (Gan *et al.*, 2002). Por otro lado, la hipótesis de que AP-1B actuaría como un intermediario entre la red Trans del Golgi y la membrana plasmática (Ang et al., 2004), desde endosomas de reciclaje en direccionamiento basolateral, también requiere de la presencia de  $\mu$ 1B, por lo que las proteínas que se expresan en la membrana basolateral en las células LLCPK-1 y que son dependientes de di leucinas, tampoco utilizarían esta vía.

En el caso de ClC-2, al parecer estarían participando tanto una señal de di leucina como µ1B en el direccionamiento basolateral. Esto plantea la pregunta del mecanismo que utiliza ClC-2 para llegar a la membrana basolateral, si éste es directo, o utiliza la vía de reciclaje, y además, como se correlaciona esto con la distribución no polar observada en las células LLCPK-1 µ1A, y la señal apical observada en las células MDCK con las mutaciones en la di leucina 812-813. Este hecho podría estar indicando que se trata de dos eventos que ocurren en lugares separados (vías distintas), o dos pasos diferentes en una misma vía. En la primera situación se trataría de un direccionamiento directo desde el Golgi a la membrana basolateral, este paso sería dependiente de la señal de di leucina, con una posterior endocitosis y reciclaje a la misma membrana, paso que estaría mediado por la subunidad µ1B. En este caso, el primer paso hacia la membrana basolateral, se llevaría a cabo por un mecanismo similar al observado en las proteínas NPP1, Ecadherina y FcRII, que dependen de señales de di leucinas (Bello et al., 2001, Miranda et al., 2001, Roush et al., 1998). Luego, cuando se remueve una señal de di leucina, se produce la deslocalización hacia la membrana apical, algo similar a lo observado en ClC-2. Esta aparición en la membrana opuesta podría estar dando cuenta de una señal apical dentro de la secuencia de ClC-2, que se vea enmascarada por la presencia de la señal de di leucina, que sería dominante respecto a la otra. Este hecho ha sido discutido por otros autores (Roush et al., 1998, El Nemer et al., 1999, Gu et al., 2001, Bello et al., 2001, Deora et al., 2004, Vagin et al., 2005). Esta señal apical podría tratarse de un sitio de N-glicosilación presente en ClC-2 en la región extracelular (Thiemann et al., 1992, Scheiffele et al., 1995). En una segunda instancia, CIC-2 al llegar a la membrana basolateral, sería endocitado, y luego reciclado a la misma membrana basolateral desde endosomas de reciclaje. Este paso sería dependiente de la presencia de µ1B, por lo que se produciría una deslocalización, en ausencia de ésta, hacia las dos membranas (apical y basolateral), que es lo observado con ClC-2 nativo en las células LLCPK-1 µ1A. Por esta razón se vería la diferencia entre la mutación de di leucina, que actuaría en el primer paso desde la biosíntesis hacia la membrana basolateral, y el canal nativo expresado en las µ1A. Sin embargo, este mecanismo necesariamente incluiría un paso de endocitosis en células epiteliales, que no ha sido descrito para canales del tipo ClC. Este paso podría estar mediado por alguna de las señales de tirosinas que se analizaron. Si bien éstas no alteraron el direccionamiento basolateral de ClC-2, no se realizaron experimentos de endocitosis, en este sentido, este paso podría estar enmascarado, debido a que si el canal es direccionado primeramente a la membrana basolateral, y no se endocita, se acumularía en ésta (Figura 19). Por otro lado las señales de di leucinas pueden funcionar como señales de direccionamiento basolateral e internalización (Hunziker and Fumey, 1994, Bonifacino and Traub, 2003), por lo que la señal mutada en ClC-2 podría estar cumpliendo ambas funciones. Sin embargo, el tipo de señales de di leucina implicadas en internalización, a menudo son del tipo D/EXXXLL (Dietrich et al., 1997, Pond et al., 1995), y ésta no corresponde en el caso de la di leucina mutada en ClC-2, por lo que es poco probable que esté cumpliendo ambas funciones. Sin embargo, ClC-2 posee otra señal de di leucina en el carboxilo terminal, que podría ajustarse a la secuencia canónica y cumplir un rol en la endocitosis del canal. Se trata de la
secuencia ESMILL, con la di leucina en la posición 623-624. De estar operando este mecanismo, una vez endocitado, CIC-2 sería dirigido a endosomas de reciclaje, en los cuales se ha identificado la presencia de la proteína µ1B (Folsch et al., 2001, Gan et al., 2002). Desde esta ubicación µ1B dirigiría el reciclaje post endocítico de ClC-2 a la membrana basolateral. Esto implicaría una interacción entre ClC-2 y  $\mu$ 1B, que podría ser a través de los mismos motivos de di leucina (Hofmann et al., 1999, Ghosh and Kornfeld, 2004), o simplemente no involucrar una interacción directa entre el canal y la subunidad a través de motivos de direccionamiento conocidos, como lo que ocurre con TfR y LDLR (Sugimoto et al., 2002). Por otro lado es probable que la interacción con el complejo AP-1B sea a través de los motivos de di leucinas presentes en ClC-2, con la subunidad β1 del complejo adaptador (Rapoport et al., 1998). En este caso la ausencia de µ1B por sí misma evitaría el reciclaje de ClC-2 a la membrana basolateral en las células LLCPK-1 µ1A, debido a que sólo µ1B ha sido involucrada en direccionamiento basolateral, mientras que µ1A participaría en el tráfico de proteínas entre la red Trans del Golgi y endosomas. Además estudios funcionales y de localización identificaron a los complejos AP-1A y AP-1B, en dominios físicos y funcionales distintos (Folsch et al., 2003). En este caso la deslocalización de CIC-2 a ambas membranas, ocurriría desde el endosoma de reciclaje, al no encontrarse el complejo AP-1B, que lo re dirija a la membrana basolateral en las células LLCPK-1 µ1A (Figura 23). Este hecho podría ser sostenido por la evidencia del reciclaje de TfR en las células LLCPK-1, en las cuales la proteína endocitada desde la membrana basolateral, es reciclada sin polaridad, mientras que la transfección estable de  $\mu$ 1B en estas células, devuelve el reciclaje de TfR a la membrana basolateral (Gan et al., 2002).

El otro escenario que podría explicar los resultados obtenidos con ClC-2, involucraría un direccionamiento directo desde la red Trans del Golgi hacia la membrana basolateral, en el que se



Figura 23. Mecanismo posible de direccionamiento 1. A: ClC-2 llegaría a la membrana basolateral por un mecanismo dependiente de el motivo de di leucina LL812-813 (1). Luego el canal se endocitaría (2), para ser reciclado a la misma membrana basolateral, desde endosomas, por un mecanismo dependiente de µ1B. B: En el mutante LL812-813AA, no se produciría el paso 1, por lo que ClC-2 se deslocalizaría a la membrana apical, desde la red Trans del Golgi (células MDCK). En el caso de las células LLCPK1 µ1A, la deslocalización hacia ambas membranas sería desde el sistema endosomal, al no producirse el paso 3, por ausencia de µ1B. N: núcleo, UE: uniones estrechas, E: endosomas, G: Golgi.

distinguirían dos pasos secuenciales, en los cuales estarían involucrados las señales de di leucina y la subunidad µ1B respectivamente. En este mecanismo, los endosomas de reciclaje actuarían como intermediarios entre el Golgi y la membrana basolateral, desde esta localización µ1B direccionaría a proteínas de la vías biosintética y de reciclaje a la membrana basolateral (Ang et al., 2004). En este caso ClC-2 sería direccionado desde la red Trans del Golgi a los endosomas por un mecanismo dependiente de la señal de di leucina. Este paso podría involucrar a proteínas accesorias del tipo GGA (Golgi-localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factorbinding protein). Estas proteínas se han identificado en el direccionamiento de proteínas de transmembrana como los receptores de manosa-6-fosfato y sortilina, desde la red Trans del Golgi a endosomas (Bonifacino and Traub, 2003). Se ha reportado la interacción de las GGAs por medio de un motivo VHS (Vps27p, Hrs and STAM) presente en su secuencia, con motivos de di leucinas que presentan la forma canónica DXXLL, en las proteínas direccionadas (Misra et al., 2002, Bonifacino and Traub, 2003). Por otro lado se ha reportado la interacción de las proteínas GGAs con el complejo adaptador AP-1, sugiriendo un mecanismo en el cual GGAs transportarían las proteínas hasta las vesículas AP-1 positivas, favoreciendo su incorporación a éstas (Bai et al., 2004, Doray et al., 2002).

El motivo de di leucina de ClC-2 mutado en este estudio, se ajusta a la forma canónica DXXLL, aunque en sentido inverso, LLGVD. Si bien es cierto que la mayoría de este tipo de motivos, posee más de un amino ácido acídico en su estructura, los análisis cristalográficos de los complejos formados entre este tipo de motivos y los motivos VHS de las proteínas GGAs, mostraron una contribución primaria y fundamental, sólo de los residuos aspartato y las leucinas, para estabilizar el complejo (Misra *et al.*, 2002). En este contexto no parece tan improbable una interacción entre el motivo de di leucina presente en ClC-2 y las proteínas GGAs. De acuerdo a

este mecanismo, ClC-2 con la mutación de la di leucina 812-813, no podría interactuar con la proteína GGA, por lo que se deslocalizaría a nivel de la red Trans del Golgi. La aparición en la membrana apical de las células MDCK, se debería al reconocimiento de una señal apical recesiva (Roush *et al.*, 1998, El Nemer et al., 1999, Gu *et al.*, 2001, Bello *et al.*, 2001, Deora *et al.*, 2004). Por otro lado, la interacción reportada entre GGA1 y AP-1, podría dar cuenta del segundo paso en este mecanismo (Bai *et al.*, 2004, Doray *et al.*, 2002). En células epiteliales esta interacción podría involucrar el paso de las proteínas transportadas por GGA1, al complejo AP-1B en el sistema de endosomas de reciclaje, y desde esta localización ser direccionadas a la membrana basolateral, sin involucrar necesariamente un evento de endocitosis de la proteína, este sería un mecanismo de direccionamiento directo, con los endosomas de reciclaje como intermediarios (Ang *et al.*, 2004). En el caso de CIC-2 expresado en las células LLCPK-1 µ1A, se produciría la deslocalización en una forma no polarizada, desde los endosomas de reciclaje, al no estar presente el complejo AP-1B, responsable del paso desde los endosomas a la membrana basolateral (Figura 24).

El hecho de que otras proteínas dependientes de di leucinas para su expresión basolateral (NPP1, E-cadherina y FcRII), no estarían tomando esta vía para llegar a la membrana basolateral, debido a que no se deslocalizan al ser expresadas en las células LLCPK-1, se debería a que no presentan el tipo de motivo canónico DXXLL, sin el cual no se sustenta la interacción con las proteínas GGA (Bello et al., 2001, Miranda *et al.*, 2001, Roush *et al.*, 1998, Misra *et al.*, 2002), por lo que su llegada a la membrana basolateral, sería por un mecanismo independiente de los adaptadores GGAs y AP-1.

Finalmente, la evidencia existente en el direccionamiento de canales del tipo ClC es escasa, sin embargo existen reportes de la interacción de ClC-3 con el complejo AP-3 en células



Figura 24. Mecanismo posible de direccionamiento 2. A: ClC-2 llegaría al sistema endosomal, por un mecanismo dependiente del motivo de di leucina LL812-813 (1), desde ahí sería enviado a la membrana basolateral por un mecanismo dependiente de  $\mu$ 1B (2). B: En el mutante LL812-813AA, no se produciría el paso 1, por lo que ClC-2 se deslocalizaría a la membrana apical, desde la red Trans del Golgi (células MDCK). En el caso de las células LLCPK1  $\mu$ 1A, la deslocalización hacia ambas membranas sería desde el sistema endosomal, al no producirse el paso 2, por ausencia de  $\mu$ 1B. N: núcleo, UE: uniones estrechas, E: endosomas. G: Golgi.

neuronales y no neuronales (Salazar et al., 2004). Otro estudio analiza las mutaciones del canal ClC-5 responsables de la enfermedad de Dent. Estas mutaciones generan truncaciones en la proteína, que eliminan el motivo CBS2 y el resto del extremo carboxilo terminal del canal, reportándose una alteración en el tráfico del canal, con retención intracelular de éste (Carr et al., 2003). Si bien es cierto ClC-3 y ClC-5 son considerados principalmente canales intracelulares, sus funciones están relacionadas con eventos de endocitosis, y por lo tanto con reciclaje desde la membrana plasmática (Günther et al., 1998, Schwake et al., 2001 Salazar et al., 2004). Sin embargo, se ha identificado un canal ClC basolateral, se trata del canal ClC-Kb, que es específico de riñón. Mutaciones en su secuencia generan el síndrome de Bartter. Este canal ha sido identificado en la membrana basolateral en células de distintos segmentos del nefrón (Simon et al., 1997, Vandewalle et al., 1997, Lourdel et al., 2003). Interesantemente, CIC-Kb conserva el motivo de di leucina, responsable de la localización basolateral de ClC-2 en las células MDCK. Este motivo está altamente conservado en ClC-2 de distintas especies. Por otro lado, los motivos CBS en general, están bien conservados entre los canales de la familia ClC, sin embargo el motivo de di leucina analizado en este trabajo, se observa sólo en los canales ClC-K a y b, ClC-1 y ClC-0, mientras que en los otros miembros de la familia, sólo se conserva una de las leucinas, la más próxima al extremo carboxilo terminal. Debido a que ClC-1 se expresa en músculo, y ClC-0 es un canal expresado en el órgano eléctrico del pez torpedo, este motivo de di leucina podría cumplir alguna función en el direccionamiento basolateral sólo en los CIC-K.

Los resultados obtenidos en este trabajo identifican a ClC-2 como un canal basolateral, que se ajustaría a lo descrito por algunos autores que lo han identificado en la membrana basolateral de epitelios nativos (Catalán *et al.*, 2004, Lipecka *et al.*, 2002). Además la evidencia de un modelo de ratón doble knock out para CFTR y ClC-2, sostiene la participación de ClC-2 en una posición en la membrana basolateral, más que en la apical (Zdebik *et al.*, 2004). Sin embargo, la identificación de CIC-2 en la membrana apical de tejidos como los epitelios de las vías aéreas (Murray *et al.*, 1995, Murray *et al.*, 1996, Sherry *et al.*, 1997, Lipecka *et al.*, 2002, Blaisdell *et al.*, 2004), podría deberse a la diferencia en la expresión de proteínas adaptadoras como  $\mu$ 1B, o GGAs en estos tejidos, o a distintos mecanismos de reconocimiento de señales en las secuencias de las proteínas como di leucinas, tirosinas o señales apicales.

## 5.6 Conclusiones.

- CIC-2 es un canal que se expresa en la membrana basolateral en líneas celulares derivadas de epitelios, que expresan la subunidad  $\mu$ 1B del complejo adaptador de clatrina AP-1B. En las células LLCPK-1  $\mu$ 1A, la ausencia de  $\mu$ 1B, provoca la deslocalización del canal, expresándose tanto en la membrana apical como en la basolateral.

- El direccionamiento de ClC-2 no dependería de la interacción de motivos basados en tirosinas con la subunidad  $\mu$ 1B. Un motivo de di leucina presente en el extremo carboxilo terminal de ClC-2, es responsable del direccionamiento basolateral del canal en células MDCK, ya que su mutación por residuos de alanina, provoca la expresión del canal en la membrana apical.

- La diferencia de expresión observada en las células LLCPK-1  $\mu$ 1A, y en el mutante de di leucina, podría deberse a que se trata de dos eventos separados de direccionamiento. Un transporte directo desde el Golgi hasta la membrana basolateral, seguido de la endocitosis del canal y un reciclaje a la membrana basolateral desde endosomas. El primer paso sería dependiente del motivo de di leucina, y el segundo, de la presencia de la subunidad  $\mu$ 1B.

- Una explicación alternativa, es la presencia de un mecanismo directo de direccionamiento, desde el Golgi a la membrana basolateral. En este caso, un primer paso desde el Golgi hasta el sistema endosomal, sería dependiente de la presencia del motivo de di leucina. La llegada de CIC-2 hasta la membrana basolateral, sería dependiente de la presencia de  $\mu$ 1B.

## 5.7 Proyecciones del trabajo.

La comprensión de los mecanismos de expresión subcelular del canal ClC-2, ayuda a avanzar en la determinación de las funciones que están cumpliendo este tipo de canales, ya sea en el mantenimiento del equilibrio electro-químico del cloruro, por ejemplo en el sistema nervioso, o su participación en procesos de transporte vectorial de iones, en células epiteliales. La evidencia de degeneración de la retina y las células germinales testiculares, en un modelo de ratón knock out para ClC-2 (Bosl et al., 2001), probablemente tiene relación con funciones que realiza ClC-2, desde localizaciones subcelulares específicas, las cuales dependen de la interacción del canal con los distintos mecanismos de direccionamiento. En este sentido, se puede avanzar en la comprensión de tales mecanismos, a través de los siguientes estudios:

Verificar la interacción entre ClC-2 y la subunidad  $\mu$ 1B del complejo AP-1B. Con este análisis se lograría identificar si se produce una asociación entre el canal y el complejo AP-1B, a nivel del sistema endosomal en el cual ha sido localizado dicho complejo. Analizar la expresión del mutante de di leucina en las células LLCPK-1 µ1A. En este caso se podría verificar el paso en el cual estaría actuando el motivo de di leucina, de estar involucrado en un proceso previo a la llegada a la membrana basolateral, se debería observar un expresión apical del mutante, al igual que en las células MDCK.

Comprobar la existencia de un paso de endocitosis desde la membrana basolateral, y los posibles motivos determinantes de ésta. Estos estudios podrían dar luces respecto a si están involucrados motivos de tirosinas o di leucinas en un proceso de endocitosis.

Investigar la posible existencia de señales apicales en la secuencia del canal. Este tipo de estudios podría ayudar a comprender la localización apical observada en el mutante de di leucina, y avanzar en las diferencias de la polarización que se han observado en tejidos nativos.

Finalmente la evidencia de la expresión apical del mutante LL812-813AA, podría considerarse una potencial herramienta en experimentos de terapia génica, para suplir la función del canal CFTR en la fibrosis quística.

## **6. REFERENCIAS**

Aguilar, R. C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R. J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H., & Bonifacino, J. S. (2001). Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J. Biol. Chem.* 276, 13145-13152.

Alvarez-Leefmans, F. J., Gamino, S. M., Giraldez, F., & Nogueron, I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J. Physiol* 406, 225-246.

Alvarez-Leefmans, F. J., Leon-Olea, M., Mendoza-Sotelo, J., Alvarez, F. J., Anton, B., & Garduno, R. (2001). Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neurosci.* 104, 569-582.

Andersen, P., Dingledine, R., Gjerstad, L., Langmoen, I. A., & Laursen, A. M. (1980). Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *J. Physiol* 305, 279-296.

Anderson, M. P., Sheppard, D. N., Berger, H. A., & Welsh, M. J. (1992). Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.* 263, L1-L14.

Ang, A. L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L. J., Pypaert, M., Warren, G., & Mellman, I. (2004). Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 167, 531-543.

Arreola, J., Begenisich, T., & Melvin, J. E. (2002). Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J. Physiol. (London)* 541, 103-112.

Bai, H., Doray, B., & Kornfeld, S. (2004). GGA1 interacts with the adaptor protein AP-1 through a WNSF sequence in its hinge region. *J. Biol. Chem.* 279, 17411-17417.

Bello, V., Goding, J. W., Greengrass, V., Sali, A., Dubljevic, V., Lenoir, C., Trugnan, G., & Maurice, M. (2001). Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase NPP1 that mediates basolateral targeting but not endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 12, 3004-3015.

Blaisdell, C. J., Morales, M. M., Andrade, A. C., Bamford, P., Wasicko, M., & Welling, P. (2004). Inhibition of CLC-2 chloride channel expression interrupts expansion of fetal lung cysts. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 286, L420-L426.

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

Bonifacino, J. S. & Dell'Angelica, E. C. (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosinebased sorting signals. *J. Cell Biol.* 145, 923-926.

Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395-447.

Bösl, M. R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff,
M. S., Holstein, A. F., & Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both
dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *EMBO J.*20, 1289-1299.

Bravo-Zehnder, M., Orio, P., Norambuena, A., Wallner, M., Meera, P., Toro, L., Latorre, R., & Gonzalez, A. (2000). Apical sorting of a voltage- and Ca2+-activated K+ channel alpha -subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13114-13119.

Carr, G., Simmons, N., & Sayer, J. (2003). A role for CBS domain 2 in trafficking of chloride channel CLC-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 600-605.

Catalán, M., Cornejo, I., Figueroa, C., Niemeyer, M. I., Sepúlveda, F. V., & Cid, L. P. (2002). Expression of ClC-2 chloride channels in surface epithelium of guinea pig colon: mRNA, protein and functional evidence. *Am. J. Physiol.* 283, G1004-G1013.

Catalán, M., Niemeyer, M. I., Cid, L. P., & Sepúlveda, F. V. (2004). Basolateral ClC-2 chloride channels in surface colon epithelium: regulation by a direct effect of intracellular chloride. *Gastroenterology* 126, 1104-1114.

Chu, S., Murray, C. B., Liu, M. M., & Zeitlin, P. L. (1996). A short CIC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping. *Nucleic Acids Res.* 24, 3453-3457.

Chu, S. & Zeitlin, P. L. (1997). Alternative mRNA splice variants of the rat ClC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of ClC-2. *Nucleic Acids Res.* 25, 4153-4159.

Cid, L. P., Niemeyer, M. I., Ramírez, A., & Sepúlveda, F. V. (2000). Splice variants of a ClC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *Am. J. Physiol.* 279, C1198-C1210.

Clarke, H., Soler, A. P., & Mullin, J. M. (2000). Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 18), 3187-3196.

Clayton, G. H., Staley, K. J., Wilcox, C. L., Owens, G. C., & Smith, R. L. (1998). Developmental expression of C1C-2 in the rat nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 108, 307-318.

Danis, C., Deschambeault, J., Do, C. S., Cohen, E. A., Rassart, E., & Lemay, G. (2004). The tyrosine-based YXXO targeting motif of murine leukemia virus envelope glycoprotein affects pathogenesis. *Virology* 324, 173-183.

Dedek, K. & Waldegger, S. (2001). Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflugers Arch.* 442, 896-902.

Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., & Bonifacino, J. S. (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* 274, 7278-7285.

Deora, A. A., Gravotta, D., Kreitzer, G., Hu, J., Bok, D., & Rodriguez-Boulan, E. (2004). The basolateral targeting signal of CD147 (EMMPRIN) consists of a single leucine and is not recognized by retinal pigment epithelium. *Mol. Biol. Cell* 15, 4148-4165.

Dhani, S. U., Mohammad-Panah, R., Ahmed, N., Ackerley, C., Ramjeesingh, M., & Bear, C. E. (2003). Evidence for a functional interaction between the ClC-2 chloride channel and the retrograde motor dynein complex. *J. Biol. Chem.* 16262-16270.

Diamond, J. M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20, 10-18.

Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A. M., & Geisler, C. (1994). CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J.* 13, 2156-2166.

Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B. L., Odum, N., & Geisler, C. (1997). Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J. Cell Biol.* 138, 271-281.

Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J., & Kornfeld, S. (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* 297, 1700-1703.

Duffield, A., Folsch, H., Mellman, I., & Caplan, M. J. (2004). Sorting of H,K-ATPase betasubunit in MDCK and LLC-PK cells is independent of mu 1B adaptin expression. *Traffic.* 5, 449-461.

Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 A reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287-294.

El, N. W., Colin, Y., Bauvy, C., Codogno, P., Fraser, R. H., Cartron, J. P., & Le Van Kim, C. L. (1999). Isoforms of the Lutheran/basal cell adhesion molecule glycoprotein are differentially delivered in polarized epithelial cells. Mapping of the basolateral sorting signal to a cytoplasmic di-leucine motif. *J. Biol. Chem.* 274, 31903-31908.

Fava, M., Ferroni, S., & Nobile, M. (2001). Osmosensitivity of an inwardly rectifying chloride current revealed by whole-cell and perforated-patch recordings in cultured rat cortical astrocytes. *FEBS Lett.* 492, 78-83.

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

Folsch, H., Pypaert, M., Maday, S., Pelletier, L., & Mellman, I. (2003). The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *J. Cell Biol.* 163, 351-362.

Folsch, H., Pypaert, M., Schu, P., & Mellman, I. (2001). Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 152, 595-606.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539-1550.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993).
Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777-1788.

Gan, Y., McGraw, T. E., & Rodriguez-Boulan, E. (2002). The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat. Cell Biol.* 4, 605-609.

Geffen, I., Fuhrer, C., Leitinger, B., Weiss, M., Huggel, K., Griffiths, G., & Spiess, M. (1993). Related signals for endocytosis and basolateral sorting of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 20772-20777.

Ghosh, P. & Kornfeld, S. (2004). The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6phosphate receptor contains four binding sites for AP-1. *Arch. Biochem. Biophys.* 426, 225-230. Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de, R. B., & Cereijido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J. Membr. Biol.* 86, 113-125.

Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R. G., Bolivar, J. J., Ponce, A., Chavez de, R. B., & Cereijido,
M. (1990). Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *Am. J. Physiol.*259, C978-C986.

Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., & Louvard, D. (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 10779-10784.

Grahammer, F., Warth, R., Barhanin, J., Bleich, M., & Hug, M. J. (2001). The small conductance K+ channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J. Biol. Chem.* 276, 42268-42275.

Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360, 759-762.

Gu, H. H., Wu, X., Giros, B., Caron, M. G., Caplan, M. J., & Rudnick, G. (2001). The NH(2)terminus of norepinephrine transporter contains a basolateral localization signal for epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 3797-3807.

Gumbiner, B. M. (1993). Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11, 551-564.

Gundersen, D., Orlowski, J., & Rodriguez-Boulan, E. (1991). Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 112, 863-872.

Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., & Jentsch, T. J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8075-8080.

Gyömörey, K., Yeger, H., Ackerley, C., Garami, E., & Bear, C. E. (2000). Expression of the chloride channel ClC-2 in the murine small intestine epithelium. *Am. J. Physiol.* 279, C1787-C1794.

Harter, C. & Mellman, I. (1992). Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 117, 311-325.

Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A. K., Sander, T., Ramirez, A., Poser, B., Maljevic, S.,
Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J., Horvath, S., Hallmann, K., Dullinger, J. S., Rau, B.,
Haverkamp, F., Beyenburg, S., Schulz, H., Janz, D., Giese, B., Muller-Newen, G., Propping, P.,
Elger, C. E., Fahlke, C., Lerche, H., & Heils, A. (2003). Mutations in CLCN2 encoding a
voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat. Genet.*33, 527-532.

Heilker, R., Spiess, M., & Crottet, P. (1999). Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* 21, 558-567.

Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B., & Robinson, M. S. (1999). Characterization of a fourth adaptorrelated protein complex. *Mol. Biol. Cell* 10, 2787-2802.

Hirst, J. & Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. Biochim. Biophys. Acta 1404, 173-193.

Hofmann, M. W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von, F. K., & Bakke, O. (1999). The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J. Biol. Chem.* 274, 36153-36158.

Honing, S. & Hunziker, W. (1995). Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat lgp120 (lamp-I) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 128, 321-332.

Hori, K., Takahashi, Y., Horikawa, N., Furukawa, T., Tsukada, K., Takeguchi, N., & Sakai, H. (2004). Is the ClC-2 chloride channel involved in the Cl<sup>-</sup> secretory mechanism of gastric parietal cells? *FEBS Lett.* 575, 105-108.

Hunziker, W. & Fumey, C. (1994). A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.* 13, 2963-2969.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., & Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J. Cell Biol.* 138, 181-192.

Jentsch, T. J., Friedrich, F., Schriever, A., & Yamada, H. (1999). The CIC chloride channel family. *Pflügers Arch.* 437, 783-795.

Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., & Schwarz, G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. *Nature* 348, 510-514.

Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Grunnet, M., Jensen, H. S., Angelo, K., Dupuis, D. S., Vogel, L. K., Jorgensen, N. K., Klaerke, D. A., & Olesen, S. P. (2004). Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J. Cell Sci.* 117, 4517-4526.

Jordt, S. E. & Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16, 1582-1592.

Jou, T. S. & Nelson, W. J. (1998). Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J. Cell Biol.* 142, 85-100.

Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., & Jentsch, T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257, 797-800.

Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., & Jentsch, T. J. (2001). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104, 205-215.

Le Gall, A. H., Yeaman, C., Muesch, A., & Rodriguez-Boulan, E. (1995). Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin. Nephrol.* 15, 272-284.

Li, J., Codina, J., Petroske, E., Werle, M. J., Willingham, M. C., & Dubose, T. D., Jr. (2004). The effect of beta-subunit assembly on function and localization of the colonic H+,K+-ATPase alpha-subunit. *Kidney Int.* 66, 1068-1075.

Lin, S., Naim, H. Y., Rodriguez, A. C., & Roth, M. G. (1998). Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142, 51-57.

Lipecka, J., Bali, M., Thomas, A., Fanen, P., Edelman, A., & Fritsch, J. (2002). Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am. J. Physiol.* 282, C805-C816.

Lisanti, M. P., Caras, I. W., Davitz, M. A., & Rodriguez-Boulan, E. (1989). A glycophospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 109, 2145-2156.

Lloyd, S. E., Pearce, S. H., Fisher, S. E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S. J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S. P., Wrong, O., Jentsch, T. J., Craig,

I. W., & Thakker, R. V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379, 445-449.

Lourdel, S., Paulais, M., Marvao, P., Nissant, A., & Teulon, J. (2003). A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: a candidate ClC-K channel. *J. Gen. Physiol.* 121, 287-300.

Low, S. H., Miura, M., Roche, P. A., Valdez, A. C., Mostov, K. E., & Weimbs, T. (2000). Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity. *Mol. Biol. Cell* 11, 3045-3060.

Makara, J. K., Rappert, A., Matthias, K., Steinhauser, C., Spat, A., & Kettenmann, H. (2003). Astrocytes from mouse brain slices express ClC-2-mediated Cl- currents regulated during development and after injury. *Mol. Cell Neurosci.* 23, 521-530.

Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinski, A., Sherry, A. M., & Cuppoletti, J. (1995). Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl<sup>-</sup> channel. *Am. J. Physiol.* 268, C191-C200.

Mariadason, J. M., Rickard, K. L., Barkla, D. H., Augenlicht, L. H., & Gibson, P. R. (2000). Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *J. Cell Physiol* 183, 347-354. Marmorstein, A. D., Bonilha, V. L., Chiflet, S., Neill, J. M., & Rodriguez-Boulan, E. (1996). The polarity of the plasma membrane protein RET-PE2 in retinal pigment epithelium is developmentally regulated. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 13), 3025-3034.

Mattagajasingh, S. N., Huang, S. C., Hartenstein, J. S., & Benz, E. J., Jr. (2000). Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 275, 30573-30585.

Matter, K., Hunziker, W., & Mellman, I. (1992). Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 71, 741-753.

Miranda, K. C., Khromykh, T., Christy, P., Le, T. L., Gottardi, C. J., Yap, A. S., Stow, J. L., & Teasdale, R. D. (2001). A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 22565-22572.

Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2002). Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* 415, 933-937.

Moeser, A. J., Haskell, M. M., Shifflett, D. E., Little, D., Schultz, B. D., & Blikslager, A. T. (2004). ClC-2 chloride secretion mediates prostaglandin-induced recovery of barrier function in ischemia-injured porcine ileum. *Gastroenterology* 127, 802-815.

Mohammad-Panah, R., Gyömörey, K., Rommens, J., Choudhury, M., Li, C., Wang, Y., & Bear, C. E. (2001). ClC-2 contributes to native chloride secretion by a human intestinal cell line, Caco-2. *J. Biol. Chem.* 276, 8306-8313.

Mostov, K. E., Verges, M., & Altschuler, Y. (2000). Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 483-490.

Murray, C. B., Chu, S., & Zeitlin, P. L. (1996). Gestational and tissue-specific regulation of C1C-2 chloride channel expression. *Am. J. Physiol.* 271, L829-L837.

Murray, C. B., Morales, M. M., Flotte, T. R., McGrath, M. S., Guggino, W. B., & Zeitlin, P. L. (1995). CIC-2: a developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12, 597-604.

Odorizzi, G. & Trowbridge, I. S. (1997). Structural requirements for basolateral sorting of the human transferrin receptor in the biosynthetic and endocytic pathways of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 137, 1255-1264.

Ohno, H., Fournier, M. C., Poy, G., & Bonifacino, J. S. (1996). Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J. Biol. Chem.* 271, 29009-29015.

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., & Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269, 1872-1875.

Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R. C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T., & Bonifacino, J. S. (1999). Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* 449, 215-220.

Olsen, M. L., Schade, S., Lyons, S. A., Amaral, M. D., & Sontheimer, H. (2003). Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *J. Neurosci.* 23, 5572-5582.

Payne, J. A. (1997). Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K+]o regulation. *Am. J. Physiol.* 273, C1516-C1525.

Peter, K., Varga, K., Bebok, Z., Nicholas-Bevensee, C. M., Schwiebert, L., Sorscher, E. J., Schwiebert, E. M., & Collawn, J. F. (2002). Ablation of internalization signals in the carboxyl-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49952-49957.

Pond, L., Kuhn, L. A., Teyton, L., Schutze, M. P., Tainer, J. A., Jackson, M. R., & Peterson, P. A. (1995). A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway.*J. Biol. Chem.* 270, 19989-19997.

Pusch, M., Jordt, S. E., Stein, V., & Jentsch, T. J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J. Physiol. (London)* 515, 341-353.

Rajasekaran, S.A., Hu, J., Gopal, J., Gallemore, R., Ryazantsev, S., Bok, D., Rajasekaran, A.K. (2003). Na,K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284, 1497-1507

Rajasekaran, S. A., Palmer, L. G., Moon, S. Y., Peralta, S. A., Apodaca, G. L., Harper, J. F., Zheng, Y., & Rajasekaran, A. K. (2001). Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 3717-3732.

Rao, R. K., Basuroy, S., Rao, V. U., Karnaky Jr, K. J., & Gupta, A. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J.* 368, 471-481.

Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E., & Kirchhausen, T. (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* 17, 2148-2155.

Regeer, R. R. & Markovich, D. (2004). A dileucine motif targets the sulfate anion transporter sat-1 to the basolateral membrane in renal cell lines. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287, C365-C372. Riesen, F. K., Rothen-Rutishauser, B., & Wunderli-Allenspach, H. (2002). A ZO1-GFP fusion protein to study the dynamics of tight junctions in living cells. *Histochem. Cell Biol.* 117, 307-315.

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.

Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Dune, L. C., Ehlers, M. D., & Wenthold, R. J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* 4, 794-802.

Rodriguez-Boulan, E. & Gonzalez, A. (1999). Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol.* 9, 291-294.

Rodriguez-Boulan, E., Musch, A., & Le Bivic, A. (2004). Epithelial trafficking: new routes to familiar places. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 436-442.

Rothen-Rutishauser, B., Riesen, F. K., Braun, A., Gunthert, M., & Wunderli-Allenspach, H. (2002). Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J. Membr. Biol.* 188, 151-162.

Roush, D. L., Gottardi, C. J., Naim, H. Y., Roth, M. G., & Caplan, M. J. (1998). Tyrosine-based membrane protein sorting signals are differentially interpreted by polarized Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 26862-26869.

Sachs, G., Chang, H. H., Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M., & Saccomani, G. (1976). A nonelectrogenic H+ pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* 251, 7690-7698.

Salazar, G., Love, R., Styers, M. L., Werner, E., Peden, A., Rodriguez, S., Gearing, M., Wainer,
B. H., & Faundez, V. (2004). AP-3-dependent mechanisms control the targeting of a chloride channel (CIC-3) in neuronal and non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 279, 25430-25439.

Sambrook & Russell (2001) Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3<sup>a</sup>. Ed.

Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., Gonzalez, N. A., Vandekerckhove, J., Jimenez, M. A., & Rico, M. (1994). The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 6622-6631.

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

Schmidt-Rose, T. & Jentsch, T. J. (1997a). Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J. Biol. Chem.* 272, 20515-20521.

Schmidt-Rose, T. & Jentsch, T. J. (1997b). Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 7633-7638. Schneeberger, E. E. & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 286, C1213-C1228.

Schwake, M., Friedrich, T., & Jentsch, T. J. (2001). An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl-channel mutated in dent's disease. *J. Biol. Chem.* 276, 12049-12054.

Schwiebert, E. M., Cid, L. P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., Guggino, W.
B., & Cutting, G. R. (1998). Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3879-3884.

Sherry, A. M., Malinowska, D. H., Morris, R. E., Ciraolo, G. M., & Cuppoletti, J. (2001). Localization of ClC-2 Cl<sup>-</sup> channels in rabbit gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* 280, C1599-C1606.

Sherry, A. M., Stroffekova, K., Knapp, L. M., Kupert, E. Y., Cuppoletti, J., & Malinowska, D. H. (1997). Characterization of the human pH- and PKA-activated ClC-2G(2 alpha) Cl<sup>-</sup> channel. *Am. J. Physiol.* **273**, C384-C393.

Sik, A., Smith, R. L., & Freund, T. F. (2000). Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neurosci.* 101, 51-65.

Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson, W. C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez, S. J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G. A., John, E., &

Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter' s syndrome type III. *Nat. Genet.* 17, 171-178.

Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., & Lifton, R. P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption. *Science* 285, 103-106.

Staley, K. (1994). The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 72, 273-284.

Steinmeyer, K., Ortland, C., & Jentsch, T. J. (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354, 301-304.

Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., & Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103, 755-766.

Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Bösl,
M. R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R., & Jentsch, T. J. (2001). Disruption of ClC-3,
a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29, 185-196.

Strange, K. (2002). Of mice and worms: novel insights into ClC-2 anion channel physiology. *News Physiol Sci.* 17, 11-16.

Sugimoto, H., Sugahara, M., Folsch, H., Koide, Y., Nakatsu, F., Tanaka, N., Nishimura, T., Furukawa, M., Mullins, C., Nakamura, N., Mellman, I., & Ohno, H. (2002). Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 2374-2382.

Tang, V. W. & Goodenough, D. A. (2003). Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys. J.* 84, 1660-1673.

Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non- epithelial cells. *Nature*. 356, 57-60.

Thompson, S. M. & Gahwiler, B. H. (1989). Activity-dependent disinhibition. III. Desensitization and GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in the hippocampus in vitro. *J. Neurophysiol.* 61, 524-533.

Toye, A. M., Banting, G., & Tanner, M. J. (2004). Regions of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) required for basolateral targeting of kAE1 in polarised kidney cells: mis-targeting explains dominant renal tubular acidosis (dRTA). *J. Cell Sci.* 117, 1399-1410.

Tucker, T. A., Varga, K., Bebok, Z., Zsembery, A., McCarty, N. A., Collawn, J. F., Schwiebert,
E. M., & Schwiebert, L. M. (2003). Transient transfection of polarized epithelial monolayers with
CFTR and reporter genes using efficacious lipids. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 284, C791-C804.

Turksen, K. & Troy, T. C. (2004). Barriers built on claudins. J. Cell Sci. 117, 2435-2447.

Vagin, O., Turdikulova, S., Yakubov, I., & Sachs, G. (2005). Use of the H,K-ATPase beta subunit to identify multiple sorting pathways for plasma membrane delivery in polarized cells. *J. Biol. Chem.* 

Vallon, V., Grahammer, F., Richter, K., Bleich, M., Lang, F., Barhanin, J., Volkl, H., & Warth,
R. (2001). Role of KCNE1-dependent K+ fluxes in mouse proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.*12, 2003-2011.

Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Bens, M., Kieferle, S., Steinmeyer, K., & Jentsch, T. J. (1997). Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* 272, F678-F688.

von, E. M., Menne, C., Nielsen, B. L., Lauritsen, J. P., Dietrich, J., Andersen, P. S., Karjalainen, K., Odum, N., & Geisler, C. (2002). The CD3 gamma leucine-based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down-regulation. *J. Immunol.* 168, 4519-4523.

Weixel, K. M. & Bradbury, N. A. (2001). Mu 2 binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 46251-46259.

Wice, B. M., Trugnan, G., Pinto, M., Rousset, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Lacroix, B., & Zweibaum, A. (1985). The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. *J. Biol. Chem.* 260, 139-146.

Yeaman, C., Le Gall, A. H., Baldwin, A. N., Monlauzeur, L., Le, B. A., & Rodriguez-Boulan, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 139, 929-940.

Zdebik, A. A., Cuffe, J. E., Bertog, M., Korbmacher, C., & Jentsch, T. J. (2004). Additional disruption of the ClC-2 Cl<sup>-</sup> channel does not exacerbate the cystic fibrosis phenotype of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mouse models. *J. Biol. Chem.* 279, 22276-22283.