

PROGRAMA DE DOCTORADO
MENCION BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR
FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE



Transcitosis apical-basolateral inducible del receptor opioide delta en células MDCK

11 de abril 2016

Alumna: Catalina Grabowski Pinto
Directo de tesis: Dr. Alfonso González de la Rosa

Resumen

Las células epiteliales cumplen funciones vectoriales de absorción y secreción en base a su fenotipo con polaridad apical-basolateral. Este fenotipo se caracteriza por una membrana plasmática dividida por las uniones estrechas en dos dominios con estructura, composición y funciones distintas: el dominio apical se orienta hacia el lumen de una cavidad mientras que el dominio basolateral está en contacto con las células vecinas y con la membrana basal. La composición proteica de cada dominio se mantiene por el tráfico vesicular en la ruta exocítica y endocítica que destina proteínas cargo al dominio correspondiente según las señales apicales o basolaterales codificadas en su estructura. Las proteínas de transmembrana basolateral alojan señales específicas en su región citosólica, en su mayoría basadas en residuos de tirosina en el contexto NPxxY, YxxΦ y dileucinas en los contextos DxxLL o [D/E]xxxL[L/I]. Las señales apicales son más diversas y pueden estar en la secuencia de la proteína o bien ser modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones. Estas señales son decodificadas por la célula a través de una maquinaria de adaptadores citosólicos. El adaptador AP1B que se localiza principalmente en el endosoma de reciclaje común (CRE) se ha involucrado en la destinación basolateral, mientras que la maquinaria de destinación apical es menos conocida. Una vez insertas en la membrana plasmática ciertas proteínas se endocitan y pueden ser destinadas a degradación en lisosomas o recicladas a su polo de origen o al polo opuesto por transcitosis.

Gran parte del conocimiento sobre la transcitosis proviene de estudios sobre la ruta de transcitosis apical-basolateral del receptor de polioinmunoglobulinas (pIgR), caracterizándose sus señales de destinación, los compartimentos endocíticos involucrados y el requerimiento del citoesqueleto. La ruta inversa desde el polo apical al basolateral se ha estudiado principalmente para proteínas solubles (albúmina e inmunoglobulinas) y sólo para una proteína de transmembrana, el receptor neonatal Fc (FcRn). FcRn transita de manera constitutiva desde el polo apical al basolateral y vice-versa, incluyendo un paso por el CRE y su dependencia del citoesqueleto es distinta según el sentido del tráfico.

Datos de nuestro laboratorio indican que los receptores de opioides al ser expresados en células epiteliales (MDCK) se destinan inicialmente a la superficie apical, pero al ser activados por agonista se redistribuyen a la región basolateral. Sin embargo, está pendiente definir si esto correspondería realmente a transcitosis apical-basolateral porque no se ha logrado detectar si los receptores opioides se insertan realmente en la membrana plasmática basolateral.

En esta tesis nos concentramos en estudiar el tráfico del receptor opioide δ (DOR) planteándonos la siguiente hipótesis: “El tráfico del DOR en células MDCK involucra señales apicales y basolaterales y una ruta de transcitosis apical-basolateral regulada que incluye al CRE y a la función del citoesqueleto”. Y los objetivos específicos: 1) Definir si el DOR estimulado por agonista desde el polo apical se transporta vía vesículas y se inserta en la membrana plasmática

basolateral; 2) Definir las señales apicales y basolaterales que determinan la ruta de transcitosis apical-basolateral del DOR; 3) Evaluar si la ruta apical-basolateral del DOR incluye el tránsito por el CRE y si depende del complejo adaptador AP1B; 4) Evaluar la contribución del citoesqueleto de microtúbulos y actina en esta ruta.

Primero implementamos nuevas estrategias para la detección y cuantificación de la aparición del DOR en la superficie basolateral, ya que las técnicas de biotinylation dominio-selectiva fueron infructuosas. Nuestros resultados mostraron que el DOR activado se endocita desde la superficie apical y luego de su transporte en vesículas se inserta en la membrana del polo basolateral. Demostramos así que entra en una ruta de transcitosis apical-basolateral regulada por estímulo externo.

Análisis por inmunofluorescencia utilizando marcadores endosomales mostró que el DOR endocitado desde el polo apical pasa por el CRE. Sin embargo, en células MDCK silenciadas para el complejo AP1B, que reside en este compartimento, mostramos que el transporte del DOR al polo basolateral no se altera, indicando que es independiente de este adaptador.

Abordamos la búsqueda de posibles señales de destinación apical y basolateral mediante mutaciones sitio dirigida de residuos dentro las secuencias análogas a las descritas. Mutando los motivos de N-glicosilación demostramos que la distribución apical del DOR es independiente de N-glicosilación. Mutaciones en dos supuestos motivos basolaterales basados en tirosinas interrumpieron la salida del DOR desde el retículo endoplásmico, impidiéndonos evaluar la contribución de estos motivos en la destinación basolateral post-transcitosis. Mutaciones que reemplazaron dos leucinas presentes en la tercera asa intracelular de DOR no afectaron su transcitosis hacia el polo basolateral.

También demostramos que la endocitosis del DOR es independiente de actina, mientras que su transcitosis al basolateral se inhibió con latrunculin A, un inhibidor de la polimerización de los monómeros de actina, acumulándose vesículas en la región subapical. Como no se ha descrito una función para la actina en la transcitosis apical-basolateral, esto sugiere la existencia de una nueva ruta de transcitosis, que no sólo sería inducible sino también dependiente de microfilamentos de actina.

Abstract

Epithelial cells play essential functions in absorption and secretion as their membranes are divided into two functionally distinct domains: an apical domain that is oriented towards the lumen of a cavity and a basolateral domain that is in contact with neighboring cells and the lateral membrane.

The protein composition of each domain is maintained through exocytic and endocytic pathways. In both pathways, proteins segregate in order to attach to the correct membrane. Apical and basolateral membrane proteins contain, in their sequence or structure, information or signals that dictate their destination.

Basolateral signals are short peptide sequences in the cytosolic region of proteins and are based on tyrosine and dileucine residues. Apical signals are more diverse they may be present in the protein sequence or may be a post-translational modifications, such as glycosylations.

The cell decodes these signals through a machinery of cytosolic adapters. For segregation of basolateral proteins, the adapter protein complex AP1B that is located in the common recycling endosome (CRE) is required. Proteins, once embedded in the plasma membrane, may be endocytosed and returned to its their pole of origin or enter the lysosomal degradation route.

Certain proteins have a particularity of being destined to one pole in their biosynthetic route. Then they are endocytosed and destined to the opposite pole by a process known as transcytosis.

Most of the knowledge regarding transcytosis comes from studies of apical-basolateral transcytosis of the poly-immunoglobulin receptor (pIgR). By studying the intracellular trafficking of this receptor, the endocytic signals, endocytic compartments, and the requirement of the cytoskeleton for this trafficking have been characterized.

The reverse route from the apical to basolateral pole has only been described for a protein called the neonatal Fc receptor (FcRn). FcRn is known to pass through the CRE compartment, however the role of microtubules and the actin cytoskeleton in this process is not yet clear.

In our laboratory, we discovered that opioid receptors, when expressed in epithelial cells (MDCK), are destined to the apical surface but when activated by its agonist, the receptors are redistributed to the basolateral pole, suggesting a route of apical-basolateral transcytosis that to date has not been demonstrated.

The opioid receptor type δ (DOR) has two N-glycosylation motifs in its extracellular region, and also contains classical basolateral destination signals based on tyrosine and leucine residues that can determine this apical-basolateral transcytosis.

In this thesis we propose the following hypothesis: "The trafficking of opioid receptor δ (DOR) in MDCK cells shows the existence of a apical-basolateral transcytosis route that is regulated by apical-basolateral signals, trafficking through CRE and function of cytoskeleton".

Our results showed that activated DOR is endocytosed from the apical surface and then inserted into the membrane at the basolateral pole, showing an

undescribed route of apical-basolateral transcytosis. Site directed mutations of the two N-glycosylation motifs demonstrated that the distribution of the apical DOR is independent of N-glycosylation. The endocytosed DOR from the apical pole passes through the CRE without relying on the AP1B complex to reach the basolateral pole. Regarding the basolateral signals, mutations of the two tyrosine motifs in the intracellular region of the DOR interrupted receptor traffic from the endoplasmic reticulum to the cell surface, preventing the evaluation of the contribution of these motifs in the destination of the DOR to the basolateral pole. However, the mutation of the dileucine motif, present in the third intracellular loop of the DOR, did not affect the basolateral destination of the activated DOR. We also showed that DOR endocytosis is independent of actin but not the basolateral transcytosis is not.

INDICE DE MATERIAS

1. Planteamiento del problema	5
2. Hipótesis y Objetivos	10
3. Introducción	11
3.1 Fundamentos del tráfico vesicular de proteínas.	11
3.2 Tráfico de proteínas en la ruta exocítica y endocítica.....	12
3.2.1 Ruta exocítica o biosintética.....	12
3.2.2. Ruta endocítica.	13
3.3 Maquinaria de formación de vesículas, selección de carga y fusión. 14	
3.4 Destinación de proteínas en células polarizadas.....	15
3.4.1 Señales basolaterales.	17
3.4.2 Señales apicales.	19
3.5 El citoesqueleto en el tráfico vesicular de proteínas.....	22
3.6 Compartimentos endocíticos en células polarizadas.....	24
3.7 Transcitosis	25
3.7.1 Ruta de transcitosis basolateral-apical: pIgR	25
3.7.2 Ruta de transcitosis apical-basolateral: FcRn	28
3.8 Receptores de opioides.....	30
4. Materiales	33
Plasmidios	33
Enzimas.....	33

Anticuerpos primarios.....	33
Otros reactivos	34
5. Métodos	35
5.1 Técnicas de Biología Molecular.....	35
5.1.1 Generación de mutaciones puntuales.....	35
5.1.2 Construcción proteínas fusión.....	38
5.1.3 Amplificación y secuenciación.....	40
5.2 Técnicas de Biología Celular	43
5.2.1 Cultivo y mantención de células MDCK	43
5.2.2 Transfección celular y selección de clones.	43
5.2.3 Cultivo de células en filtros de policarbonato bicamerales (cámaras Transwell).....	45
5.2.4 Ensayo transporte de Inulina.....	46
5.2.5 Lisis celular	46
5.2.6 Biotinilación selectiva de proteínas de superficie (Sulfo-NHS-Biotina).....	46
5.2.7 Biotinilación con marcaje metabólico.	47
5.2.8 Ensayo transcitosis con biotina reducible (Sulfo-NHS-SS-Biotin).48	
5.2.9 Precipitación de proteínas biotiniladas con Neutraavidina.	49
5.2.10 Inmunoblot	50
5.2.11 Fluorografía.....	50
5.2.12 Inmunofluorescencia indirecta.....	51

5.2.13 Marcaje de la superficie apical en células vivas.....	51
5.2.14 Marcaje con estreptavidina Alexa-568.	52
5.2.15 Adquisición de imágenes.	53
5.2.16 Cuantificación de imágenes.	53
6. Resultados	54
6.1 Cambios de distribución del DOR inducidos por su estimulación en células MDCK.....	54
6.2 El receptor DOR estimulado por su ligando es transportado por vesículas desde el polo apical al basolateral sin afectar la integridad de las uniones estrechas.	62
6.3 Cinética de la transcitosis del DOR: Análisis cuantitativo mediante inmunofluorescencia.....	65
6.4 Análisis del tráfico intracelular del DOR mediante híbridos con GFP	67
6.5 Análisis de posibles motivos de destinación polarizada en el DOR... 72	
6.5.1 Análisis de la N-glicosilación como posible señal de destinación apical del DOR	72
6.5.2 Análisis de posibles señales basolaterales en la transcitosis apical-basolateral del DOR.....	75
6.6 Análisis de la ruta intracelular del DOR en la vía de transcitosis basolateral.....	79
6.7 El complejo AP1B no se requiere en el tráfico apical-basolateral del DOR.	83
6.8 Rol del citoesqueleto en la transcitosis apical-basolateral del DOR. .	86

7. Discusión	95
7.1 Evidencias de transcitosis apical-basolateral del DOR.....	95
7.2 Ruta intracelular de la transcitosis apical-basolateral del DOR.	97
7.2.1 La transcitosis apical-basolateral del DOR involucra un tránsito por el CRE.....	97
7.2.2 La transcitosis apical-basolateral del DOR es independiente del complejo AP1B.....	99
7.3. Búsqueda de las señales de tráfico apical y basolateral del DOR..	101
7.3.1 Destinación apical del DOR: Posibles señales.....	101
7.3.2 Análisis de las señales basolaterales en el DOR.	104
7.4. Endocitosis del DOR en el polo apical es independiente de actina y lleva a transcitosis más que a degradación lisosomal.	107
7.5. La ruta de transcitosis del DOR es dependiente de actina.	110
7.6 Rutas de transcitosis en neuronas.	113
7.7 La ruta de transcitosis apical-basolateral del DOR tiene elementos que la distinguen como una nueva ruta de tráfico.	114
8. Conclusiones	117
9. Bibliografía	118

1. Planteamiento del problema

Las células epiteliales con polaridad apical/basolateral tienen la membrana plasmática dividida por las uniones estrechas en dos dominios de morfología, función y composición bioquímica distintos. Esta propiedad es fundamental en la función fisiológica de los epitelios que actúan como barreras entre compartimentos externos e internos del organismo y ejercen un transporte vectorial entre ellos. El dominio apical de estas células está dirigido hacia el lumen de estructuras tubulares conectadas con el exterior (tubo intestinal; túbulo renales, etc) mientras que el dominio basolateral está orientado hacia compartimentos internos del organismo, formando contactos con células vecinas y con la membrana basal, y recibe estímulos y nutrientes provenientes de la sangre (Mellman & Nelson 2008). Este fenotipo es la base de las funciones de absorción y secreción polarizada de las células epiteliales y se altera en patologías como el cáncer y la fibrosis (Royer & Lu 2011).

La composición proteica de la membrana plasmática está determinada por el tráfico vesicular de proteínas en las rutas exocítica y endocítica. Este tráfico está controlado por señales de destino codificadas en las proteínas cargo y por una maquinaria que reconoce estas señales y las acopla a la generación de vesículas de transporte destinadas a fusionarse con una membrana blanco específica (Rodriguez-Boulán & Macara 2014).

La segregación de proteínas de membrana hacia el polo apical o basolateral de una célula epitelial polarizada ocurre primero en la región más trans del aparato de Golgi, la red-trans Golgi (TGN) y luego en compartimentos de reciclaje endocítico. La ruta exocítica a la salida del TGN puede intersectar a la ruta de reciclaje endocítico en el llamado compartimento de reciclaje común (CRE) de ubicación perinuclear inmediatamente adyacente al TGN. A este compartimento entran también proteínas que se endocitan ya sea desde el polo apical como del polo basolateral, que luego son destinadas a una ruta de degradación lisosomal o recicladas a la membrana plasmática del mismo polo o del polo contrapuesto, ruta llamada de transcitosis (Brown et al 2000, Gonzalez & Rodriguez-Boulán 2009)

Las proteínas apicales pueden tener sus señales de destinación localizadas en sus dominios extracelulares, de anclaje a la membrana o citosólicos, y pueden ser de distinta naturaleza, incluyendo glicanes, tallos glicosilfosfatidil inositol y regiones proteicas (Rodriguez-Boulán & Gonzalez 1999, Weisz & Rodriguez-Boulán 2009). Las señales basolaterales conocidas se han localizado sólo en los dominios citosólicos de proteínas de transmembrana y las más caracterizadas corresponden a: NPxY, Yxx Φ (N corresponde a asparragina, P a prolina e Y a tirosina, x a cualquier aminoácido y Φ a un aminoácido hidrofóbico) y dileucinas en un contexto de aminoácido hidrofóbicos DxxLL o [D/E]xxxL[L/I] (D es aspartato, E es glutamato, L es leucina e I es isoleucina). Este tipo de señales son decodificadas por adaptadores de clatrina AP1A y AP1B, que actuarían en el CRE y presumiblemente también en el TGN (Gonzalez & Rodriguez-Boulán 2009, Gravotta et al 2012, Guo et al 2013). Sin embargo hay señales que no coinciden con las señales clásicas, como el caso del receptor de transferrina, que contiene una señal del tipo GDNS y

su tráfico basolateral depende de AP1B por un mecanismo aún desconocido (Gonzalez & Rodriguez-Boulán 2009).

Respecto de las rutas de transcitosis desde un polo a otro y las señales que participan en ellas, la mayor parte del conocimiento se basa en la ruta de transporte desde el polo basolateral al apical del receptor de poliiinmunoglobulinas (pIgR). Este receptor captura en el polo basolateral la IgA, secretadas por las células plasmáticas, la endocita y transporta hacia el polo apical desde donde se libera al lumen de distintos órganos tubulares. Por ejemplo, esto ocurre en las células de la glándula mamaria durante la lactancia, en el epitelio intestinal y en el epitelio bronquial (Rojas & Apodaca 2002).

Posteriormente se descubrió que otras proteínas también siguen esta ruta de transcitosis basolateral-apical como: el canal de agua acuoporina-2 (Yui et al 2013), el receptor de la hormona folículo estimulante (Beau et al 1997), el receptor de partículas de HDL, SRBI (Burgos et al 2004), proteínas apicales ancladas por tallo GPI (Polishchuk et al 2004) y la molécula de adhesión NgCAM (Anderson et al 2005).

La ruta de transcitosis basolateral-apical del pIgR es dependiente de microtúbulos y del citoesqueleto de actina e incluye un tránsito por el CRE y posteriormente por el llamado endosoma de reciclaje apical (ARE) que contiene la GTPasa Rab-11. Su regulación ha sido ampliamente estudiada y se han descrito las señales de destinación basolateral, de endocitosis y de transcitosis alojadas en distintos segmentos de su dominio citosólico (Rojas & Apodaca 2002, Tuma & Hubbard 2003).

La ruta inversa de transcitosis desde el polo apical hacia el polo basolateral hasta la fecha ha sido descrita solo para ligandos de megalina en el tubo renal proximal (Marino et al 2001a, Marino et al 2001b) y para el receptor FcRn en los túbulos renales proximales (Haymann et al 2000), en el duodeno (He et al 2008) y en la placenta (Firan et al 2001). El receptor de megalina se expresa en el dominio apical de las células epiteliales de los túbulos renales proximales y su señal apical se ha localizado en su dominio citosólico (Marzolo et al 2003). Megalina une ligandos tales como albúmina, tiroglobulina y la proteína de unión a retinol que luego son endocitados y transportados hacia el dominio basolateral (Marino et al 2001a, Marino et al 2001b). Se desconoce si la megalina acompaña a los ligandos o los libera en algún compartimento endocítico desde donde son luego transportados al basolateral. El FcRn de los túbulos renales proximales transporta IgG y albúmina capturándolas en compartimentos endocíticos apicales hacia la región intersticial previniendo así, su degradación lisosomal (Chaudhury et al 2003, Haymann et al 2000, Kobayashi et al 2002). En neonatos el FcRn se expresa en el polo apical de células epiteliales del duodeno donde captura de los anticuerpos presentes en la leche materna, mientras que en la placenta transporta IgG desde la sangre materna a la sangre del feto (Rojas & Apodaca 2002). Estudios en células MDCK transfectadas con el FcRn se ha descrito que se localiza tanto en el polo apical como basolateral, aunque principalmente en este polo, y hace transcitosis de manera constitutiva, no regulada por estímulos externos y en ambos sentidos (McCarthy et al 2000). Su transcitosis incluye tránsito por el CRE (Jerdeva et al 2010, Tzaban et al 2009). El papel de los microtúbulos y actina no están bien aclarados para esta ruta (Ellinger et al 2001, Hunziker et al 1990, McCarthy et al 2000).

En nuestro laboratorio, en el contexto de la tesis doctoral de Fabiola Sánchez, surgió el hallazgo de que los receptores de opioides μ , δ y κ , expresados en células MDCK eran inicialmente destinados al polo apical y luego de ser activados por sus agonistas eran redistribuidos hacia la región basolateral sugiriendo una ruta de transcitosis apical-basolateral inducible. Sin embargo, con las técnicas disponibles, como la biotinylation dominio selectiva, no se logró demostrar la inserción de estos receptores en la membrana basolateral en respuesta a la activación por agonista, condición necesaria para definir si realmente hacen transcitosis o solo redistribución hacia compartimentos localizados basolateralmente.

En la presente tesis nos concentramos en estudiar el tráfico polarizado del receptor δ expresado en células MDCK, intentando definir los determinantes de su destinación inicial hacia el polo apical y luego seguir la ruta endocítica apical y de transporte intracelular con nuevas estrategias experimentales en condiciones de estimulación con ligando.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El tráfico del receptor opioide δ (DOR) en células MDCK involucra señales apicales y basolaterales y una ruta de transcitosis apical-basolateral que incluye al CRE y a la función del citoesqueleto.

2.2. Objetivo general:

Definir si existe una ruta de transcitosis apical-basolateral inducible por ligando en células MDCK.

2.2 Objetivos específicos

1. Definir si el DOR estimulado por agonista desde el polo apical se transporta vía vesículas y se inserta en la membrana plasmática basolateral.
2. Definir las señales apicales y basolaterales que determinan la ruta de transcitosis apical-basolateral del receptor de opioides.
3. Evaluar si la ruta apical-basolateral del DOR incluye el tránsito por el CRE y si depende del complejo adaptador AP1B.
4. Evaluar la contribución del citoesqueleto de microtúbulos y actina en esta ruta.

3. Introducción

3.1 Fundamentos del tráfico vesicular de proteínas

La membrana plasmática de la célula constituye el borde que contiene los elementos necesarios para la vida. La membrana separa a la célula del medio externo a la vez que es la estructura que le permite interactuar con todo lo que esté fuera ella.

La membrana plasmática está compuesta de lípidos y proteínas. La fracción proteica corresponde a receptores, transportadores, canales iónicos, enzimas y moléculas de adhesión, las que en su conjunto, le permiten a la célula mantener su homeostasis. Así como también poder interactuar correctamente con las células vecinas. Ambos, elementos fundamentales para la mantención de tejidos y órganos. El tráfico vesicular de proteínas es el mecanismo por el cual la célula mantiene la estructura y función de la membrana plasmática.

La información genética contenida en el núcleo codifica no sólo la función de las proteínas sino que también la información sobre su destinación, señales que son decodificada por una compleja maquinaria capaz de reconocer estas señales y destinar las proteínas hacia las distintas localidades de la célula (Blobel 2000). Los mecanismos de destinación de proteínas adquieren mayor complejidad en células con fenotipo polarizado tales como las células epiteliales y neuronas, que poseen la superficie celular dividida en dominios bioquímica y morfológicamente distintos (apical/basolateral) o (axonal/somatodendrítico).

3.2 Tráfico de proteínas en la ruta exocítica y endocítica

La ruta exocítica sustenta de proteínas la membrana plasmática, mientras que la ruta endocítica las remueve para su reciclaje, degradación lisosomal o bien para transportarlas a otro dominio de la membrana plasmática (Conner & Schmid 2003, Perret et al 2005). Este transporte de proteínas se realiza en vehículos vesiculares membranosos que emergen desde un compartimento membranoso y se fusiona específicamente con otro compartimento de igual naturaleza, y así es como se constituyen los procesos de biogénesis y remoción de proteínas de superficie (Chen & Scheller 2001).

3.2.1 Ruta exocítica o biosintética

Las proteínas de secreción y de superficie comienzan su síntesis en ribosomas libres. Las proteínas de membrana contienen en su secuencia una señal de llegada al retículo endoplásmico (RE) denominada SRP de "Signal Recognition Particle" que es reconocida por un receptor citoplasmático que lleva a la proteína nascente hacia ribosomas asociados al RE. En el RE el traslocón, forma un poro en la membrana del RE que permite que de forma co-traducciona la proteína haga ingreso al lumen del RE donde la proteína continúa su síntesis, plegamiento y también adquiere modificaciones como la N-glicosilación (Blobel 2000).

Para salir del RE, y continuar en la ruta de síntesis, las proteínas deben ser reconocidas por la maquinaria COPII que selecciona la carga y ayuda a la formación de la vesícula que se transportará al Aparato de Golgi. Una vez en el Golgi las proteínas pasan por las cisternas del Golgi donde las proteínas sufre modificaciones

como glicosilaciones, sulfataciones y corte proteolítico. En la región más distal de Golgi, conocida como red Trans Golgi o TGN las proteínas son segregadas hacia la membrana plasmática o a lisosomas según dicten sus señales de destinación (Ellgaard & Helenius 2003).

La noción predominante es que el TGN es la estación última antes de la llegada de proteínas a la membrana plasmática, no obstante cada vez hay mayor evidencia de que algunas proteínas pasan por compartimentos endosomales, propios de la vía de reciclaje, antes de su llegada a la superficie (Bonifacino 2014, Gonzalez & Rodriguez-Boulan 2009).

3.2.2. Ruta endocítica

Una vez en la superficie algunas proteínas como los receptores de nutrientes, el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y el receptor de transferrina (TfR), están constantemente endocitando (Conner & Schmid 2003, Sorkin & Von Zastrow 2002, Thompson et al 2007). En cambio, otros receptores de función señalizante requieren de su activación para iniciar su endocitosis y, el destino post-endocítico va a depender del tipo de receptor y de la magnitud de la activación (Sorkin & Von Zastrow 2002).

La entrada de proteínas a la ruta endocítica va a depender de señales contenida en el dominio citosólico de las proteínas y que son reconocidas por adaptadores que interactúan con clatrina (Conner & Schmid 2002). En células no polarizadas se distinguen dos tipos de endosomas según su ubicación y proteínas cargo que contienen. Los endosomas que reciben proteínas recién endocitadas se denominan endosomas tempranos, están ubicados justo por debajo de la

membrana plasmática y en estos endosomas las proteínas son segregadas, según su destino. Pueden ser destinadas hacia endosomas de reciclaje, que se localizan en una zona más perinuclear, para volver a la membrana plasmática o bien hacia endosomas tardíos que posteriormente se transformarán en lisosomas (Maxfield & McGraw 2004).

3.3 Maquinaria de formación de vesículas, selección de carga y fusión

Para la formación de una vesícula se requiere de una maquinaria proteica que seleccione las proteínas que van a ser transportadas así como también que ejerzan la fuerza necesaria para formación y escisión de la vesícula. El proceso de generación de vesículas implica la formación de una curvatura o yemación y la fisión del cuello de la vesícula naciente (Kirchhausen 1999). Las proteínas de cubierta COP-I, COP-II y clatrina proveen la fuerza mecanoquímica para la formación de las vesículas a la vez que constituyen parte del sistema de reconocimiento de señales. COP-II y COP-I son complejos de proteínas que participan en la formación de vesículas a nivel del RE y en el tráfico retrógrado entre el Golgi y el RE, respectivamente (Ellgaard & Helenius 2003). La clatrina en conjunto con la familia de adaptadores AP (se detalla más adelante) y otras proteínas auxiliares conforman el sistema que genera vesículas endocíticas en la membrana plasmática, en endosomas y también en el TGN.

El movimiento de vesículas a lo largo del citosol es a través del citoesqueleto de microtúbulos y actina. Los cargos se mueven por el citoesqueleto gracias a que son transportados por motores moleculares que se mueven coordinadamente para

dar “pasos” sobre el citoesqueleto a la vez que hidrolizan ATP, convirtiendo la energía química en movimiento. Los motores de miosina se mueven por la actina, kinesinas y dineínas viajan a lo largo de los microtúbulos (revisado en Soldati y Schliwa 2006). Los motores se anclan a las vesículas a través de los lípidos o proteínas accesorias y, el transporte final de una proteína involucra ir cambiando de motor a la vez que viajar por las distintas proteínas del citoesqueleto (Kural et al 2007).

La fusión de la vesícula es otra etapa del tráfico vesicular que requiere alta especificidad. Las proteínas v-SNARE están presente en la membrana de la vesícula, y la vesícula que la contiene, sólo se fusiona con una membrana que contenga la contraparte t-SNARE (Chen & Scheller 2001, Mellman & Warren 2000).

Entre los elementos regulatorios se encuentran principalmente pequeñas GTPasas monoméricas que aportan elementos importantes para la vectorialidad y especificidad del transporte vesicular (Seabra et al 2002, Zerial & McBride 2001), quinasas tales como la PKD (Bossard et al 2007, Salazar & Gonzalez 2002), la PKA (Salazar & Gonzalez 2002, Bossard et al. 2007(Burgos et al 2004) y enzimas que modifican fosfatidilinositoles y contribuyen a la identidad de los compartimentos membranosos (Rodriguez-Boulan & Powell 1992, Roth 2004).

3.4 Destinación de proteínas en células polarizadas

Las células epiteliales se organizan en forma de hoja para originar el tejido epitelial formando una barrera entre lo externo e interno del organismo. Las células de los epitelios internos se organizan en cistos y túbulos. Los cistos son monocapas esféricas que contienen un lumen en su interior, mientras que los túbulos también

están formados por una monocapa pero son de morfología cilíndrica. Las células que componen estas estructuras tienen su membrana plasmática dividida en tres zonas. Una zona apical que mira hacia la superficie del lumen, una región lateral que se contacta con las células vecinas y una superficie basal que se adhiere a la matriz o membrana basal. Dado que muchas proteínas son comunes a la región lateral y basal, se les denomina colectivamente región basolateral. Los dominios, apical y basolateral se mantienen separados debido a la presencia de uniones estrechas que impiden la difusión de proteínas entre los polos (Mostov et al 2003).

Los mecanismos de segregación polarizada se conocen gracias a un modelo de células epiteliales derivadas de riñón de perro, MDCK (Madin-Darby canine kidney). En cultivo, estas células expresan uniones estrechas y forman monocapas con polaridad apical/basolateral (Cereijido et al 1998). El descubrimiento de que ciertos virus con envoltura brotan desde la superficie apical (virus de la hemaglutinina, HA) mientras que otros lo hacen del polo basolateral (virus de la estomatitis vesicular, VSVG) (Gonzalez et al 1987, Rindler et al 1985), abrió camino para el estudio de los mecanismos de segregación polarizada de proteínas. Posteriormente se clonaron las proteínas de superficie de estos virus y se demostró que la información de destinación polarizada estaba contenida en la secuencia de las proteínas (Compton et al 1989, Gonzalez et al 1987, Sabatini 2005). Trabajos posteriores localizaron la información apical de la HA en su segmento de transmembrana (Lin et al 1998) y la información basolateral de la VSVG en su dominio citosólico (Thomas et al 1993).

3.4.1 Señales basolaterales

La destinación basolateral de proteínas de membrana se basa en el reconocimiento de señales peptídicas cortas incluidas en la secuencia primaria de las proteínas. Las secuencias se encuentran en el región citoplasmática de las proteínas y las más caracterizadas son aquellas basadas en tirosina en los contextos $Yxx\Phi$ (Y corresponde a tirosina, x a cualquier aminoácido y Φ a un aminoácido hidrofóbico) o en di-leucinas en un contexto de aminoácido hidrofóbicos $DxxLL$ o $[D/E]xxxL[L/I]$ (D es aspartato, E es glutamato, L es leucina e I es isoleucina). Aunque también hay señales basadas en una sola leucina (Deora et al 2004, Wehrle-Haller & Imhof 2001) y otras que no coinciden con ninguno de estos patrones (Aroeti et al 1993).

Estas señales muchas veces colindan con las señales de endocitosis de las proteínas, tal es el caso de la VSVG y el LDLR (Matter & Mellman 1994, Matter et al 1993) y al igual que las señales de endocitosis estas son interpretadas por la familia de complejos adaptadores (AP). Los AP son una familia de complejos de cuatro miembros (AP1, AP2, AP3, AP4) constituidos por dos subunidades mayores (α , γ , δ, ϵ y β 1-4), una subunidad intermedia (u 1-4) y una subunidad pequeña (σ 1-4). La nomenclatura de cada adaptador es la siguiente: AP1 (γ , β 1, u 1 y σ 1); AP2 (α , β 2, u 2 y σ 2); AP3 (δ , β 3, u 3 y σ 3) AP4 (ϵ , β 4, u 4 y σ 4). Los AP son parte de las proteínas de cubierta que seleccionan las proteínas cargo y forman la vesícula en las diferentes estaciones de tráfico endosomal. AP1, AP2 y AP3, pero no AP4 se consideran interactuantes con clatrina y se han involucrado en el tráfico vesicular emergiendo de TGN o endosomas de reciclaje (AP1); membrana plasmática en

vesículas endocíticas (AP2) y endosomas de reciclaje (AP3). La función de AP4 es controversial (Bonifacino 2014).

Del complejo AP1 existen dos isoformas, según la subunidad u que contengan, la incorporación de la subunidad u1A da origen al complejo AP1A y la u1B al AP1B. Ambos complejos se diferencian en que el AP1A es de expresión ubicua mientras que AP1B se expresa sólo en algunos epitelios polarizados, entre las que se incluyen las células MDCK (Ohno et al 1999). Células epiteliales que no expresan AP1B destinan proteínas basolaterales, como el LDLR y el TfR al polo apical (Folsch et al 1999) y la sobreexpresión de la subunidad u1B restablece la polaridad basolateral de estas proteínas. A través de técnicas de silenciamiento de la subunidad u1B se han ido descubriendo mayor cantidad de proteínas basolaterales que dependen de este complejo para su correcta localización (Bonifacino 2014) y de ahí el reconocimiento de este adaptador como necesario para la destinación basolateral.

Estructuralmente los complejo AP se dividen en tres regiones que cumplen funciones específicas: un “core” que posee el dominio de reconocimiento de señales compuesto por los dominios amino terminal de las subunidades grandes, la subunidad mediana y la pequeña; la región “hinge” que tiene contiene los motivos que unen clatrina y que conecta las regiones amino y carboxilo de las subunidades mayores y un tercer dominio “ear” que interactúa con proteínas accesorias y que corresponde al dominio carboxilo de las subunidades mayores (Boehm & Bonifacino 2001).

Los AP reconocen dos motivos peptídicos como señales. El motivo di-leucina en el contexto [D/E]xxxL[L/I] reconocido por las subunidades grandes y las

respectivas subunidades pequeñas. El segundo motivo del tipo Yxx ϕ es reconocido por la subunidad mediana de los complejos AP (Ohno et al 1995). Sin embargo existen casos como el TfR cuyo tráfico basolateral es dependiente de AP1B pero contiene una señal no canónica del tipo GDNS (Odorizzi & Trowbridge 1997).

Por tiempo se consideró al AP1B como crucial en la destinación basolateral de proteínas, sin embargo en el último tiempo han surgido evidencias de que AP1A también medie la destinación basolateral y, entre ambos, se extendería el rango de proteínas cargo que requieren de estos adaptadores (Bonifacino 2014, Guo et al 2013).

3.4.2 Señales apicales

Las señales apicales son más diversas que su contraparte basolateral. Estructuralmente las señales apicales pueden encontrarse en cualquier parte de la proteína, en el dominio extracelular, citosólico o regiones de membrana. La naturaleza de las señales también varía y pueden ser peptídicas, lípidos o carbohidratos.

El descubrimiento de proteínas ancladas por un tallo de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el polo apical fue el primer indicio de la existencia de señales apicales. Con el tiempo se descubrió que esta característica por sí sola no era suficiente y lo que se requería es que las proteínas oligomerizaran y se asociaran a microdominos de membrana ricos en glicoesfingolípidos y colesterol (balsas lipídicas) (Brown & Rose 1992, Paladino et al 2004).

La glicosilación es señal apical para varias proteínas. Los N-glicanos han sido propuestos como señales de destinación apical, tanto para proteína de membrana

como para proteínas de secreción. La N-glicosilación ocurre en el RE en los residuos asparragina que están en el contexto N-x-S/T (x es cualquier amino ácido excepto Prolina) y comprende la adición de un precursor de carbohidratos compuesto de: 3 glucosas, 9 manosas y 2 N-acetilglucosamina, que a medida que las proteínas avanzan en su ruta de biosíntesis hacia el Aparato de Golgi estas moléculas se van cortando (remociones) así como también se generan nuevas modificaciones.

La primera observación sobre el requerimiento de los N-glicanos en el tráfico polarizado fue utilizando tunicamicina, un potente inhibidor de la N-glicosilación. La tunicamicina inhibe la secreción apical de la proteína gp80, principal proteína de secreción en células MDCK y lo mismo ocurre con otra proteína de secreción como la eritropoyetina (Kitagawa et al 1994, Urban et al 1987). De modo inverso al adicionar motivos de N-glicosilación se favorece la secreción apical de la hormona de crecimiento (Scheiffele et al 1995).

Proteínas de membrana como el transportador neuronal de glicina y la endolina al ser expresadas en células MDCK se distribuyen apicalmente pero al remover sus motivos de N-glicosilación las proteínas se despolarizan (Martinez-Maza et al 2001, Potter et al 2004). Según su ubicación, la N-glicosilación es señal apical, la eritropoyetina contiene tres sitios de glicosilación pero la mutación de sólo un sitio hace que se pierda la polaridad apical (Kitagawa et al 1994), mientras que dos de los ocho motivos de N-glicosilación de la endolina son relevantes para su localización apical (Potter et al 2004).

No obstante, la N-glicosilación no es señal universal, nuestro laboratorio ha mostrado que hay mecanismos de destinación apical independientes de N-

glicosilación (Bravo-Zehnder et al 2000, Marzolo et al 1997) que aún no han sido aclarados.

Proteínas apicales como el receptor p75 y la sucrosa isomaltasa contienen modificaciones del tipo O-glicosilación que funcionan como señal apical (Alfalah et al 1999, Yeaman et al 1997). La O-glicosilación es una modificación que ocurre en el Aparato de Golgi y consiste en la adición de N-acetilgalactosamina en los residuos serina o treonina (Potter et al 2006).

Las lectinas se postulan como receptores que transcientemente pueden agrupar proteínas N-glicosiladas para destinarlas al polo apical (Delacour & Jacob 2006). Galectina 3,4 y 9 son lectinas implicadas en la destinación apical en células de riñón e intestino (Delacour et al 2006, Delacour et al 2005, Mishra et al 2010). Proteínas transmembrana también se han postulado como receptores capaces de reconocer las glicosilaciones directamente o bien reconocer parte de la proteína cuya conformación es depende de glicosilación. VIP36 es una lectina originalmente aislada de membranas de vesículas exocíticas (Fiedler et al 1994, Fullekrug & Nilsson 1998) y su sobreexpresión estimula la secreción apical de gp80 pero no la de una proteína no glicosilada (Hara-Kuge et al 2002). La proteína MAL, también ha sido nombrada como el posible receptor ya que ha demostrado tener un rol en la segregación de la gp80 sin embargo no se ha demostrado que esta interacción sea dependiente de carbohidratos (Martin-Belmonte et al 2001).

Los N-glicanes también podrían funcionar estabilizando las proteínas en la salida del TGN favoreciendo su salida hacia vesículas con destinación apical, por ejemplo promoviendo la asociación a balsas lipídicas, microdominios de membrana

enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos, asociados a la destinación apical de proteínas (Gut et al 1998, Rodríguez-Boulan & Gonzalez 1999).

3.5 El citoesqueleto en el tráfico vesicular de proteínas

El citoesqueleto está compuesto de filamentos de microtúbulos, actina y filamentos intermedios. Los microtúbulos están formados por la polimerización de un dímero de dos proteínas: α y β tubulina. En las células epiteliales la organización de los microtúbulos es altamente asimétrica, los microtúbulos están dispuestos en distinta orientación y no están asociados al centrosoma y los microtúbulos no centrosomales son los predominantes (Grindstaff et al 1998). En los epitelios el centrosoma migra hacia el polo apical, desde donde uno de los centriolos forma el cilio primario. Los extremos negativos de los microtúbulos se orientan hacia el apical y los extremos positivos se extienden hacia el basolateral (Bacallao et al 1989, Bre et al 1987).

En células epiteliales se ha demostrado que vesículas salientes del Golgi con destino apical y basolateral están asociadas a microtúbulos (Van der Sluijs et al 1990). No obstante el efecto de drogas despolimerizantes como colchicina y nocodazol no afecta a las dos rutas por igual. El tráfico apical al parecer es más sensible que el basolateral y las rutas de reciclaje también se verían diferencialmente afectadas (revisado en Munch 2004).

El tráfico de vesículas apicales está asociado al transporte de motores que se mueven en la dirección negativa de los microtúbulos como las dineínas (Kraemer et al 1999). No obstante, motores como las kinesinas, que se mueven con orientación positiva, también participan en el transporte de proteínas apicales como

la p75 (Xue et al 2010). Hasta la fecha no se han descrito motores asociados a microtúbulos en rutas de transporte basolateral.

La actina es un filamento polimérico (actina F) formado por monómeros de actina (actina G), que al igual que los microtúbulos tiene un extremo de mayor crecimiento denominado positivo y otro de crecimiento lento denominado negativo. En contraste con los microtúbulos, los filamento de actina son más cortos y el transporte basado en actina es más lento (Musch 2004). Los filamentos de actina han sido asociados a procesos de destinación tanto en la ruta exocítica como endocítica. Motores del citoesqueleto como miosina I y II se han descrito asociadas a vesículas que emergen del Golgi (Fath et al 1997, Stow et al 1998).

La organización del citoesqueleto de actina es regulado en tiempo y espacio por GTPasas monoméricas como Cdc42, Rac1, y Rho. La expresión de un dominante negativo de Cdc42 en células MDCK redirecciona proteínas de membrana basolaterales desde el TGN hacia el apical, así como también despolariza proteínas que reciclan basolateralmente hacia el apical sin afectar la polaridad de proteínas que se secretan basolateralmente, ni tampoco la de proteínas apicales como la gp114 (Cohen et al 2001b, Kroschewski et al 1999).

Experimentos farmacológicos con latrunculina A, un secuestrador de los monómeros de actina, demostraron que la ruta de reciclaje basolateral de proteínas de membrana se altera al interrumpir la organización del citoesqueleto de actina despolarizando hacia el polo apical las proteínas que endocitan por el basolateral (Sheff et al 2002).

El tercer componente del citoesqueleto son los filamentos intermedios, compuestos por una familia de más de 70 proteínas entre las que se incluyen la

queratina, vimentina, neurofilamentos, laminina, entre otros. A diferencia de los microtúbulos y actina los filamentos intermedios no tienen polaridad (Strelkov et al 2003). Durante años han sido relegados a funciones netamente estructurales o de soporte en tejidos como la piel, y el poco desarrollo del estudio de su función en áreas como el tráfico vesicular se debe en gran parte a la carencia de herramientas farmacológicas (revisado en Styers 2005). No obstante se ha demostrado que proteínas como la vimentina se asocian a proteínas periféricas asociadas a la membrana del Golgi, sugiriendo una función en el transporte de proteínas en la ruta secretoria (Gao & Sztul 2001). Consistente con esto es la observación de que células deficientes en queratina despolarizan proteínas apicales (Ameen et al 2001, Toivola et al 2004).

3.6 Compartimentos endocíticos en células polarizadas

Las células epiteliales mantienen su polaridad en gran medida por la habilidad de los compartimentos endocíticos de retornar correctamente las proteínas internalizadas a cada uno de los dominios (Mellman 1996). En las células epiteliales se reconocen endosomas tempranos apicales (AEE) y basolaterales (BEE) localizados en la periferia del citoplasma. Los AEE reciben proteínas y fluidos desde el polo apical, los fluidos endocitados por apical van a la ruta degradativa lisosomal, mientras que las proteínas que reciclan, de vuelta al polo apical, segregan de estos endosomas y son destinadas al endosoma de reciclaje apical (ARE) enriquecido en la GTPasa monomérica Rab11 en un paso que requiere del citoesqueleto de microtúbulos (Leung et al 2000). En el polo basolateral las proteínas que reciclan constantemente como el TfR endocitan hacia BEE, una

fracción del TfR puede reciclar desde estos mismos endosomas (Sheff et al 1999) pero la mayoría es transferida al CRE, localizado en la región perinuclear de la célula, para salir de vuelta a la superficie basolateral (Odorizzi et al 1996). El LDLR endocita por el polo basolateral y entra al BEE donde se desprende de su ligando mientras que el receptor entra al CRE para reciclar a la membrana basolateral, en una ruta sensible a la disrupción del citoesqueleto de microtúbulos y actina (Apodaca et al 1994, Brown et al 2000, Sheff et al 2002).

Hay una ruta intracelular de mayor complejidad que siguen algunos receptores, que consiste en la internalización por uno de los dos polos y posterior reciclaje a la membrana plasmática del polo opuesto, en un proceso denominado transcitosis.

3.7 Transcitosis

El término transcitosis fue descrito por inmunólogos al descubrir que las inmunoglobulinas estaban presentes en secreciones como la leche, saliva y lumen del intestino (Tomasi & Zigelbaum 1963) y lo que sabemos de esta ruta proviene, en gran parte, del estudio del transporte de las inmunoglobulinas en los epitelios. Sin embargo este proceso ocurre también en hepatocitos, endotelios, osteoclastos y neuronas (Kennedy & Ehlers 2011, Predescu et al 2007, Tuma & Hubbard 2003, Zhao 2012).

3.7.1 Ruta de transcitosis basolateral-apical: pIgR

La ruta de transcitosis mejor documentada es la que sigue el receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) y su ligando la IgA dimérica (dIgA), principal

inmunoglobulina de las mucosas secretada por las células plasmáticas presentes en la lamina propia. El plgR es una proteína transmembrana de tipo I que desde su biosíntesis se inserta membrana basolateral donde hace contacto con la dlG_A, la unión del ligando estimula la transcitosis del complejo (receptor-ligando) en dirección apical (Song et al 1994). En la superficie apical se encuentran proteasas que liberan la dlG_A hacia el lumen de diferentes epitelios como el lumen del intestino, bilis y leche materna (Rojas & Apodaca 2002).

La ruta endosomal que sigue el plgR ha sido extensamente estudiada en células MDCK. El plgR en la membrana basolateral es endocitado y fosforilado en tirosina (Y₆₆₈ y Y₇₃₄) (Okamoto et al 1992) y serina (S₇₂₆) (Okamoto et al 1994). Al endocitarse es transportado en vesículas hasta los BEE, para ser transportado junto a otros receptores que reciclan basolateralmente al CRE, aquí se segrega de las proteínas basolaterales y es transportado al ARE en un proceso dependiente de microtúbulos (Leung et al 2000) desde donde sale hacia la superficie apical (Brown et al 2000, Wang et al 2000a). En la superficie apical el plgR unido a la dlG_A es cortado por proteasas liberando el componente secretor (SC) hacia el extracelular. Una gran fracción del receptor no se corta y continúa reciclando sucesivamente por el compartimento ARE, donde las GTPasa Rab11 y Rab25 regulan este proceso (Casanova et al 1999, Wang et al 2000b).

La señal basolateral del plgR se encuentra en la región citosólica, en una porción de 17 aminoácidos de los cuales tres son los más importantes (H₆₅₆, N₆₅₇ y V₆₆₀) (Aroeti et al 1993, Casanova et al 1991). La señal de transcitosis del plgR hacia el polo apical está compuesta por un motivo de N-glicosilación y una señal peptídica presente en la región citoplasmática entre los residuos 731-741 (Luton et al 2009).

La unión de la plgA al plgR estimula su transcitosis a través de la quinasa p62 (Luton et al 1999). Esta quinasa, miembro de la familia de las Src, se activa en presencia de la dlG y fosforila al receptor de EGF (EGFR), esta fosforilación activa la vía de señalización MEK/ERK. ERK fosforila en serina a FIP5, un efector de Rab11, favoreciendo el transporte del plgR desde el ARE hacia la superficie apical (Su et al 2010)

La activación de proteína G estimuladoras (Gs) aumenta la tasa de transcitosis basolateral-apical del plgR a través de un aumento en los niveles de AMPc y activación de la PKA (Bomse & Mostov 1993, Hansen & Casanova 1994). Otros elementos regulatorios de la transcitosis del plgR incluyen la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), la proteína quinasa C, la fosfolipasa C y los niveles de calcio intracelular (Cardone et al 1996, Hansen et al 1995, Luton et al 1998, Tuma et al 2001).

Los microtúbulos son requeridos para el eficiente transporte del plgR, desde los endosomas tempranos basolaterales hacia los compartimentos más apicales (ARE o CRE) (Maples et al 1997, Rojas & Apodaca 2002). Inhibidores farmacológicos de la dinámica del citoesqueleto de actina, como la citocalasina D inhiben el transporte del plgR. Reguladores del citoesqueleto de actina como: RhoA, Rac y CdC42 también han sido implicados en la transcitosis basolateral-apical del plgR (Jou et al 2000, Leung et al 1999, Rojas et al 2001).

Otras proteínas que hacen transcitosis basolateral-apical es el canal de agua acuoporina-2 (Yui et al 2013), el receptor de la hormona folículo estimulante (Beau et al 1997), el receptor de partículas de HDL, SRBI (Burgos et al 2004), proteínas apicales ancladas por tallo GPI (Polishchuk et al 2004) y la molécula de adhesión

NgCAM (Anderson et al 2005). La mayoría de estos ejemplos tienen en común ser dependientes del citoesqueleto de microtúbulos.

3.7.2 Ruta de transcitosis apical-basolateral: FcRn

La ruta inversa, apical-basolateral está descrita pero sólo para un receptor, el receptor neonatal Fc (FcRn). La función neonatal de este receptor es absorber las inmunoglobulinas maternas del tipo IgG provenientes de la sangre o de la leche materna, mientras que en adultos regula la cantidad de IgG en el suero (revisado en Roopenian & Akilesh 2007) . El FcRn es un heterodímero compuesto de una proteína transmembrana de 50 kDa denominada subunidad α , que está asociada a una proteína de 15 kDa, β 2-microglobulina. En humanos el FcRn se expresa en las células de la placenta y transporta IgG de la circulación materna hacia los capilares del feto (Kristoffersen 1996, Leach et al 1996, Simister et al 1996). Mientras que en roedores el FcRn presente en la cara apical de los enterocitos transporta la IgG contenida en la leche materna hacia la sangre del neonato (Jones & Waldmann 1972). La unión del FcRn a la IgG es mayor a pH ligeramente ácido (6.5) que a pH neutro (Jones & Waldmann 1972, Rodewald 1976). Así, en el intestino donde el pH es ácido se favorece la unión, mientras que en la placenta el FcRn expresado en la membrana apical de los sincitiotrofoblastos están expuestos a pH neutral. En este caso la IgG materna es endocitada junto con otros fluidos hacia endosomas, donde el pH es más ácido, y ahí ocurre la unión con el FcRn. En ambos casos el complejo FcRn-IgG es transportado por transcitosis hacia la membrana basolateral donde el pH fisiológico promueve la disociación de la IgG del FcRn (Rojas & Apodaca 2002).

El FcRn en adultos tiene la función de regular la cantidad de IgG en el suero. En las células endoteliales la IgG es endocitada junto con otros fluidos hacia compartimentos ácidos y a concentraciones moderadas de IgG, esta se une al FcRn y recicla hacia la superficie donde la IgG es liberada al torrente sanguíneo. Cuando los niveles de IgG son más elevados y el receptor FcRn se satura, la IgG libre, no unida al FcRn, es transportada a lisosomas donde es degradada (Ghetie et al 1996).

El estudio de la ruta apical-basolateral del FcRn es complejo ya que este receptor hace transcitosis constitutiva bidireccional apical-basolateral y viceversa, siendo la transcitosis basolateral-apical la más preponderante (McCarthy et al 2000, Praetor et al 1999, Stefaner et al 1999). Además, el FcRn recicla constitutivamente por el polo apical y basolateral (Lencer & Blumberg 2005). En condiciones basales se encuentra intracelularmente o bien en el dominio basolateral de células epiteliales (Ghetie & Ward 2000).

En células MDCK han encontrado al FcRn colocalizando con el TfR, sugiriendo que podría encontrarse en el CRE (Tzaban et al 2009) y en este compartimento el FcRn endocitado desde el polo apical se cruzaría con el plgR proveniente del polo basolateral (Jerdeva et al 2010).

Hay dudas respecto cuál componente de citoesqueleto es requerido para transportar las vesículas que viajan con dirección apical-basolateral. En células MDCK el transporte de la IgG es insensible al tratamiento con nocodazol (Hunziker et al 1990), al igual que en células derivadas de placenta que expresan endógenamente en receptor FcRn (Ellinger et al 2001). Mientras que en células derivadas del túbulo colector (IMCD) la ruta del receptor FcRn requiere de los

microtúbulos intactos (McCarthy et al 2000). Lo anterior es consistente con los datos provenientes de la topografía crioelectrónica del intestino de ratas neonatas, donde describen que partículas de IgG acopladas a oro son endocitadas hacia túbulos y vesículas adyacentes a microtúbulos (Ladinsky et al 2012). En células de placenta esta descrito que el transporte apical-basolateral además de ser independiente de microtúbulos lo es de actina (Ellinger et al 2001).

3.8 Receptores de opioides

Los receptores de opioides son miembros de una superfamilia de receptores heptahelicoidales acoplados a proteína G (GPCR) caracterizados por contener siete dominios transmembrana, el extremo amino terminal orientado hacia el extracelular y el carboxilo hacia el lado intracelular. Los receptores de opioides se clasifican en tres clases según su farmacología y distribución: el μ (mu) por morfina, δ (delta) por ductos deferentes, κ (kappa) por ketazocina o encefalina. Por homología de secuencia se considera un cuarto miembro, ORL1. Sin embargo su afinidad por la morfina y otros ligandos opioides es baja (Mollereau et al 1994).

Los tres subtipos se acoplan a proteína G heterotrimérica del tipo Gi/Go sensibles a la toxina pertussis, llevando a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y el bloqueo de la producción de AMP cíclico.

Estos receptores son activados por ligandos endógenos como las encefalinas y dinorfinas y por ligandos exógenos como la morfina y péptidos agonista, ambos utilizados como potentes analgésicos. Al igual que muchos GPCRs, la activación de los receptores de opioides induce endocitosis mediada por clatrina y el adaptador citoplasmático β -arrestina (Hanyaloglu & von Zastrow 2008). El receptor activado es

fosforilado, en residuos serina, por quinasas asociadas a proteína G, esto produce el acoplamiento de β -arrestina hacia el receptor con el consecuente desacoplamiento de la proteína G. En la superficie, la dinamina I se une al complejo receptor- β -arrestina permitiendo su invaginación y posterior endocitosis en vesículas cubiertas de clatrina (Chu et al 1997) .

El destino postendocítico de cada receptor difiere para los distintos subtipos. Así, el receptor μ recicla hacia la membrana plasmática, mientras que el receptor δ entra a la ruta de degradación lisosomal (Law & Loh 1999, Tsao & von Zastrow 2000). Esta diferencia, al parecer, está en el extremo carboxilo de los receptores. Se ha descrito que el receptor μ , en su extremo carboxilo, contiene una secuencia peptídica necesaria para su reciclaje (Tanowitz & von Zastrow 2003). Para el receptor δ la diferencia podría estar dada por la asociación, a su extremo carboxilo, de una proteína adaptadora llamada GASP cuya unión sería determinante para llevar al DOR a la ruta degradativa (Whistler et al 2002).

El fenómeno de redistribución hacia el polo basolateral del DOR inducido por ligando es compartido por los otros miembros de la familia de receptores de opioides, μ y κ (tesis FS). Por lo tanto la señal que dirige estos receptores al dominio basolateral debiese ser una secuencia común a los tres sub tipos de receptores. En la secuencia de aminoácidos de las asa intracelulares de estos receptores encontramos en la primera y segunda asa un motivo del tipo Yxx Φ y en la tercer asa del DOR una dileucina. Haciéndonos suponer que cualquiera de estos motivos podría funcionar como señal basolateral.

En esta tesis nos propusimos caracterizar esta ruta de transcitosis apical-basolateral concentrándonos en el DOR. Nos propusimos dilucidar la señal apical

que lleva inicialmente el DOR hacia la superficie apical y la señal basolateral comprometida en su destinación al polo basolateral luego de activarse por ligando. También evaluaremos la contribución del adaptador AP1B en este proceso así como la contribución del citoesqueleto.

4. Materiales

Plasmidios

Se utilizaron los siguientes vectores de expresión para células eucariotas:

pcDNA 3, que contiene el receptor el cDNA del DOR con un epitope Flag en el extremo amino terminal y que fue donado por el Dr. Cristopher Evans del Departamento de Psiquiatría y Ciencias del Biocomportamiento, UCLA. Los Angeles, USA.

EGFP-N1, se obtuvo de Clontech laboratorios.

EGFP-C1, se obtuvo de Clontech laboratorios.

Rab11- GFPS25N se obtuvo del laboratorio de Michel Ehlers

Enzimas

De Thermo Scientific se obtuvieron las siguientes enzimas: Pfu, T4 DNA ligasa, Nhe I, Fast AP.

De Fermentas se obtuvieron las siguientes enzimas: Dpn1, Sal I

De Promega se obtuvieron las siguientes enzimas: Xho I, BamH I

Anticuerpos primarios

De Sigma Aldrich se obtuvieron los siguientes anticuerpos: anti:Flag hecho en conejo y hecho en raton (M1). Así como también los anticuerpo secundarios anti:IgG de ratón o conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP).

De BD Biosciences se obtuvo el anticuerpo monoclonal anti: E-caderina.

El anticuerpo contra la proteína gp135, hecho en ratón, se obtuvo del laboratorio del Dr. Rodríguez Boulan, New York, EEUU.

De Molecular Probe, se obtuvieron los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa.

Otros reactivos

De Corning son los filtros bicamerales.

De Sigma Aldrich son los siguientes reactivos: DADLE, forskolin, tunicamicina, nocodazol, colchicina, citocalasina D y latrunculina A.

De Molecular Probe, se obtuvo la estreptavidina acoplada a Alexa 568.

De GIBCO se obtuvo la geneticina (G418).

De Pierce se obtuvo la Sulfo-NHS-Biotina y la Sulfo-NHS-SS-Biotina.

De Thermo Scientific se obtuvo la Sepharose-Neutravidina, el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL y estándares de peso molecular preteñidos de proteínas.

De Electron Microscopy Science, se obtuvo el medio de montaje Fluoromont G.

De Quigen se obtuvo el kit para purificar DNA.

Los oligonucleótidos se mandaron a diseñar a IDT.

5. Métodos

5.1 Técnicas de Biología Molecular

5.1.1 Generación de mutaciones puntuales

Para generar las mutaciones puntuales en el receptor δ (DOR) se utilizó la técnica de mutación sitio-dirigida. La estrategia experimental consiste en diseñar oligonucleótidos específicos y complementarios al cDNA que se quiere mutar (cDNA parental). El oligonucleótido además contiene en su secuencia el codón que se quiere mutar, así la ADN polimerasa extiende el cDNA con la mutación. Corriendo el producto de PCR en un gel de agarosa se corrobora el éxito de la reacción. Luego el producto de PCR se digiere con la enzima Dpn, enzima capaz de degradar sólo el DNA parental. El producto digerido se transforma en bacterias Calcio competentes y posteriormente el cDNA se amplifica y se secuencia para corroborar la inserción de la mutación.

5.1.2 Generación de partidores

Contábamos con el cDNA del receptor δ (secuencia de ratón) contenido en el vector pcDNA3. Se diseñaron partidores internos complementarios y el codón que se quería mutar se cambió por uno que codificara para alanina. Se sustituyeron los siguientes aminoácidos: asparragina 18 (N₁₈A), asparragina 33 (N₃₃A), tirosina 77

(Y_{77A}), tirosina (Y_{147A}), leucina 223 (L_{243A}) y leucina 244 (L_{244A}). En la tabla I se muestra la secuencia de los partidores y en negrita el codón mutado.

5.1.3 Reacción de la polimerasa (PCR)

Los PCR mutagénicos se realizaron en un termociclador “Programmable Thermal Controlle” (MJ Reserch, Inc) y para amplificar se utilizó la DNA polimerasa Pfu. La reacción se realiza en tubos eppendorf de 0,6 mL con: 20 ng de DNA molde o parental, 200 µM de un mix de dNTPs 10 nM, 200 nM de cada partidior, 5 µL tampón Pfu 10X, 0,5 µL Pfu en un volumen final de 50 µL que se completa con agua tridestilada. El programa de amplificación que se utilizó está en la Tabla II. El producto de PCR se genera con 25 ciclos de amplificación. Al término de la amplificación se cargaron 5 µL de producto en un gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia de producto.

5.1.4 Digestión con Dpn1

El método de inserción de mutaciones puntuales se basa en que existe una enzima, Dpn1, capaz de discriminar el DNA metilado (parental) del no metilado (producto de la reacción de PCR). El producto del PCR mutagénico se incuba con Dpn1 para digerir el cDNA parental, así sólo el cDNA mutado se transforma en bacterias competentes para amplificarlo. Se incubaron 1 uL de Dpn1 (10 unidades) con 10 uL de producto de PCR por 2 h a 37°C. Terminada la digestión se transformaron bacterias competentes con 5-10 µL de PCR digerido.

5.1.5 Preparación de *E.coli* calcio competentes

Las bacterias competentes se prepararon a partir de cepas de *E. coli* DH5 α . Se inocularon *E. coli* en 1 mL de medio LB y se dejaron creciendo toda la noche en agitación (200-250 rpm) a 37°C. Al otro día se inocularon 500 μ L de cultivo bacteriano en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio Luria-Bertani (LB). Midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro se siguió el crecimiento bacteriano hasta que alcanzar una OD de 0,375. El cultivo se vació a dos tubos de polipropileno estériles y se dejaron reposar en hielo entre 5-10 min. Se centrifugaron a 3000 rpm por 7 min a 4°C. Se vació el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl₂ fría y estéril (CaCl₂ 60mM, glicerol 15%, PIPES 10mM, pH 7, 0). La resuspensión fue suave y manteniendo las células en hielo. Se dejaron en hielo por 30 min. Luego se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 2 mL de solución de CaCl₂. El pellet resuspendido se dejó en hielo durante toda la noche. Luego se hicieron alícuotas 100 μ L de bacterias en eppendorf de 1,5 mL y se almacenaron a -80°C.

5.1.6 Transformación bacteriana

El procedimiento utilizado es el descrito para la transformación de *E. coli* que se basa en la permeabilización de la células con CaCl₂. Las bacterias calcio competentes alicuotadas en un tubo eppendorf de 1,5 mL y almacenadas a -80°C se sacaron en hielo y se esperó a que se descongelen. Luego se mezclaron con 10 μ L de cDNA y se esperaron 30 min en hielo y luego se les dio un pulso de calor a 42°C por 30 seg. Luego se volvieron al hielo y se les agregó 900 μ L de LB y se

incubaron por 1 hora a 37°C con agitación suave. Las bacterias se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm. El pellet de bacterias se resuspendió en 100 µL de LB y se colocaron en una placa de LB-agar que contiene el antibiótico de selección adecuado. Según la cantidad de producto que se obtuvo en el PCR mutagénico se sembró la totalidad de bacterias o una fracción. Las placas se incubaron en estufa a 37°C toda la noche con el agar invertido para el desarrollo de las colonias resistentes.

5.1.2 Construcción proteínas fusión

5.2.1 GFP-DOR

El cDNA fue clonado en el vector pEGFP-C1 para generar un constructo que contenga el receptor δ fusionado al GFP por su extremo amino terminal. Diseñamos partidores para amplificar el cDNA del DOR incluyendo al péptido Flag. Los partidores incluyen los sitios de corte de Sal I y BamH I (tabla III).

5.2.2. DOR-esp-GFP

El cDNA del DOR fue clonado en el vector pEGFP-N1 modificado que contiene un espaciador peptídico (LSGGSGGSGGSGIGD) entre el sitio de multiclonamiento y la proteína GFP (Cancino et al 2007) de modo de generar un constructo que exprese el DOR acoplado a la proteína GFP por su extremo carboxilo y entre ambas proteínas un espaciador. Se generaron partidores para amplificar el

cDNA del DOR incluyendo al péptido Flag. Los partidores contienen la secuencia de corte de Nhe I y Xho I (tabla III).

En la tabla IV se muestra el programa de PCR utilizado para generar los insertos

Los vectores se digirieron por separado con cada una de las enzimas, 5ug de vector por 2 h a 37°C. Entre una digestión y otra el producto se limpió con un kit de limpieza. El vector digerido se desfosforiló. Para esto 100 ng de vector se incubaron con 1 unidad de fosfatasa alcalina de intestino de carnero (CIAP) durante 30 min a 37°C.

Luego de la obtención de los productos de PCR estos se aislaron mediante purificación de fragmentos de agarosa. Luego, al igual que los vectores, los productos de PCR también se digirieron por separado con cada enzima y entre cada digestión se limpiaron con el kit de limpieza.

Obtenido el vector y el fragmento de PCR, ambos se ligaron mezclándolos en una proporción de 3:1 (fragmento:vector). Se ligaron con 10 unidades de DNA ligasa en una mezcla que contiene 1µl de tampón 10X de ligación y agua destilada hasta completar 10 µL. La reacción se dejó incubando toda la noche a 4°C. Con el DNA ligado se transformaron bacterias competentes.

5.1.3 Amplificación y secuenciación

Los cDNA se amplificaron realizando las indicaciones del kit Axygen Axyprep. Para secuenciar las distintas construcciones se utilizaron partidores universales T7 y SP6. Además diseñamos partidores que hibridan en la parte interna del cDNA del receptor δ . Las muestras se mandaron a secuenciar a Macrogen USA.

Tabla I: Programa de amplificación PCR mutagénico

1.Denaturación	95°C	30 seg
2.Hibridación	Varía según cada partidior	1 min
3.Polimerización	68°C	7 min
4.Extensión final	68°C	7 min

Tabla II: Partidores mutagénicos

Aminoácido mutado	Secuencia partidior	T° hibridación
N ₁₈ A	5' TCCTCGCCCCTCGT CGCC CTCTCGGACGCC 3' 5' GGCGTCCGAGAG AGG GACGAGGGGCGAGGA3'	58°C
N ₃₃ A	5' GCGGGCGCC GCG GCGTCGGGG 3' 5' CCCCAGACG CCGCG GCGCCCGC 3'	75°C
Y ₇₇ A	5' GGCATCGTCCGG GCC ACCAAATTGAAG3' 5' CTTCAATTTGGT GGC CCGGACGATGCC 3'	65°C
Y ₁₄₇ A	5' AGCGTGGACCGC GCC ATTGCTGTCTGC3' 5' GCAGACAGCAAT GGC GCGGTCCACGCT 3'	62°C
L ₂₄₃ A	5' AGCGTGCGT GCG CTGTCCGGTTCC 3' 5' GGAACCGGACAG CGC ACGCACGCT 3'	70°C
L ₂₄₄ A	5' AGCGTGCGTCT GCG TCCGGTTCC 3' 5' GGAACCGGAC GCC CAGACGCACGCT 3'	70°C

Tabla III. Partidores clonamiento

Partidores	T° hibridación
GFP-DOR: Sal I: 5'AAAGTCGACATGAAGACGATCATCGCC'3 BamH I: 5'AAAGGATCCTCAGGCGGCAGCGCCACC'3	55°C
DOR-esp-GFP Nhe I: 5'AAAGCTAGCCTGCGCGCCATGAAGACG'3 Xho I: 5'AAACTCGAGGGCGGCAGCGCCACCGCC'3	55°C

Tabla IV .Programa PCR clonamiento

1.Denaturación	95°C	30 seg
2.Hibridación	55°C	1 min
3.Polimerización	72°C	1 min
4.Extensión final	72°C	1 min

5.2 Técnicas de Biología Celular

5.2.1 Cultivo y mantención de células MDCK

Las células MDCK se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda (95% aire 5% CO₂) en medio DMEM suplementado con 7,5% de suero fetal bovino (SFB) complementados con antibióticos (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina), a este medio se le llamó medio completo. Sólo para las células transfectadas establemente los medios fueron suplementados con G418 o puromicina. El protocolo de tripsinización consistió en lavar las células con PBS 1X para extraer todo el medio, se dejan con PBS durante 10-20 min en la estufa de cultivo y posteriormente se le agrega tripsina-EDTA 1X diluida en PBS por otros 10 min. Una vez que las células se despegan de la placa, la tripsina se inactivó agregando 3 mL de medio completo. Las células se centrifugan a 1000 rpm por 5 min y luego se resuspenden en medio completo. Para mantener las células creciendo se siembran en una dilución 1:100, el resto de las células se cuentan utilizando cámara de Neubauer y se siembran para experimentos según corresponda.

5.2.2 Transfección celular y selección de clones

Para generar una línea estable del DOR en células MDCK estas se transfectaron con Lipofectamine 2000 siguiendo las instrucciones de manufacturación. Para aumentar la eficiencia de transfección las células se transfectaron en suspensión. Las MDCK se tripsinizaron normalmente pero en vez de resuspenderlas en medio completo se resuspendieron en Optimem y esto se

repitió dos veces. Luego, en una placa de 35 mm se sembraron 500.000 células diluidas en 2 mL de Optimem. Para transfectarlas se utilizaron 5 µg de cDNA en 200 µL de Optimem y 10 µL Lipofectamine en 200 µL Optimem. Sobre la placa se depositó suavemente, por goteo, el complejo DNA-Lipofectamine. Luego, se incubaron por 4-5 horas y se les cambió medio agregándoles 2 mL de medio completo. A las 48 horas las células se tripsinizaron y se sembraron en una placa de 10 cm diluidas 1:50 o 1:100 con medio completo suplementado con G418 1mg/mL o puromicina 5 µg/mL. El medio se cambió cada 5 días y a la tercera semana ya era evidente la formación de colonias resistentes al antibiótico. Las colonias se aislaron utilizando cilindros estériles embebidos en vaselina. Los clones se traspararon a una placa de 24 pocillos y se cultivaron con medio completo más el antibiótico de selección. La selección de los clones se realizó por inmunofluorescencia indirecta.

Las transfecciones transcientes se realizaron en células MDCK adheridas a la placa. Para experimentos de inmunofluorescencia se sembraron 40.000 células MDCK. Luego de 48 h se transfectaron sobre 0.5 mL de Optimem con 0,5 µg de cDNA diluido en 50 µL de Optimem y 1µL de Lipofectamine diluída en 50 µL Optimem. Se incubaron con el complejo DNA-Lipofectamine por 4-5 horas y luego se les cambió a medio completo. Luego de 12 a 24 horas de expresión se realizaron los experimentos.

Dado que la eficiencia de transfección de las células MDCK no es tan alta, para evaluar la expresión de algunos constructos por inmunoblot transfectamos células Hek (línea celular derivada de riñon embrionario humano) en placa de 35 mm a 80% de confluencia con 5 µg de DNA y 10 µL de lipofectamina.

5.2.3 Cultivo de células en filtros de policarbonato bicamerales (cámaras Transwell)

El cultivo de células en filtros bicamerales (Transwell) permite que las células epiteliales se desarrollen como epitelio generando resistencia transepitelial a la vez que se puede acceder separadamente al dominio apical y basolateral. Según el diámetro del filtro es el número de células que se siembran. Para filtros de 24 mm de diámetro (Corning, cod. 3412) se sembraron 250.000 células por el lado apical o superior del filtro en un volumen de 1.5 mL y 2 mL de medio en el lado basolateral o inferior. En estas condiciones las células MDCK llegan a valores de resistencia transepitelial (RTE) máximos y estables en 3 ó 4 días lo que implica la formación de una monocapa semipermeable. El medio se cambió todos los días. Cuidadosamente se aspiró primero el medio del lado inferior y luego el superior, luego se depositó suavemente el medio por lado superior y posteriormente por el inferior. Para medir la RTE se utilizó un voltímetro EVOM Epithelial Voltohmmeter (WorldPrecision Instruments Inc., FL USA). El valor del RTE (Ωcm^2) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{RTE} = R[(\text{medio} + \text{filtro} + \text{células}) - (\text{medio} + \text{filtro})] \times \text{área filtro}$$

Los valores máximos alcanzados en filtro de 24 mm fueron entre 400-500. Para filtros de 12 mm de diámetro (Corning, cod. 3401), que se utilizan para experimentos de inmunofluorescencia, se sembraron 50.000 células en 0.5 mL de medio completo por el lado apical y 0.7 mL de medio por el compartimento basolateral. Diariamente se les cambió el medio, 0.5 mL por apical y 0.7 mL por

basolateral. Por su tamaño a estos filtros no les pudimos medir resistencia pero por experiencia sabemos que luego de 4 días en cultivo las células han formado una perfecta monocapa.

5.2.4 Ensayo transporte de Inulina

Para este ensayo se sembraron célula en filtro de 12 mm. Luego de haber llegado a confluencia las células se trataron con DADLE 5 μ M y adicionalmente se les agregó Inulina H³ 1.25 μ C/ μ L sobre 0.5 mL de medio completo. A diferentes tiempos se colectaron alícuotas de 10 μ L de medio apical y 10 μ L de medio basolateral. Finalizada la recolección la radioactividad se midió en un contador de centelleo.

5.2.5 Lisis celular

Para obtener proteínas totales o de superficie las células se lisaron con tampón Ripa: Tris 50 mM ph 7.4, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, Deoxicolato de sodio 0,5% y SDS 0,1% e inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, leupeptina 2 μ g/mL y pepstatina 2 μ g/mL) por 30 min en hielo. Luego las células se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y en caso de ser necesario se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford.

5.2.6 Biotinilación selectiva de proteínas de superficie (Sulfo-NHS-Biotina)

Para evaluar la presencia del DOR en la superficie apical o basolateral de las células MDCK ésta se cultivaron en filtros de 24 mm. Se sembraron 250.000 células

y luego de cuatro días se realizó el experimento. Los filtros se lavaron con PBS frío suplementado con CaCl_2 0.1Mm y MgCl_2 1 mM (PBSCM). Luego, las células se biotinilaron de manera separada por el lado apical o basolateral incubándolas con 0,5 mg/mL de biotina diluida en PBSCM a 4°C dos veces por 20 min con agitación suave utilizando los siguientes volúmenes: Se incubaron con 0.6 mL por el lado apical y 1 mL por el compartimento basolateral. La biotina libre se inactivó incubando los filtros con cloruro de amonio 50 mM por 5 min por ambos polos. Luego se lavaron con PBSCM y se prosiguió con el protocolo de precipitación con Neutravidina o bien se congelaron a -20°C para continuar en otro momento.

Para experimentos de inmunofluorescencia se utilizó el mismo protocolo pero los volúmenes se redujeron. Se incubaron con 0.2 mL por el apical y 0.4 mL por el basolateral y luego de biotinila, inactiva y lavar los filtros se fijaron con paraformaldehído.

5.2.7 Biotinilación con marcaje metabólico.

Las células MDCK se sembraron en filtro de 24 mm y al cuarto día se realizó el experimento. Se utilizaron dos filtros por punto. Las células se depletaron de suero por 3 h incubándolas con medio DMEM. Luego las células se marcaron metabólicamente durante toda la noche con [^{35}S]-metionina/cisteína 100 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ en medio DMEM suplementado con 3% SFB. Al siguiente día las células se trataron por el lado apical con el agonista DADLE 5 μM en medio completo suplementado con cicloheximida y metionina/cisteína no radioactiva. Terminado el tratamiento las células se biotinilaron. Los filtros se lisaron con tampón Ripa más inhibidores de proteasa por 1 h. Un hora antes de la lisis se incubó 10 μL de anti:Flag con 30 μL

de proteína A (cantidad por punto) a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 h. El lisado celular se centrifugó a 14000 rpm a 4°C y el sobrenadante se incubó con el complejo Flag-proteína A por 2 h a 4°C con agitación suave. Las muestras se lavaron haciendo sucesivos pasos de centrifugación a 2000 rpm, eliminación del sobrenadante y lavado con 0.5 mL de tampón Ripa. Luego del último lavado se extrajo la totalidad del sobrenadante y las muestras se resuspendieron con 30 μ L de SDS 10% y se calentaron a 100°C para disociar la proteína A del anticuerpo. Luego las proteínas biotiniladas se precipitaron con Neutravidina (descrito más adelante) y fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones reductoras. Posteriormente las proteínas marcadas radioactivamente se detectaron mediante fluorografía.

5.2.8 Ensayo transcitosis con biotina reducible (Sulfo-NHS-SS-Biotin)

El marcaje con esta biotina, sensible a la reducción con glutatión, se utilizó en forma similar a la biotina normal. La proteína previamente biotinilada al endocitarse se hace resistente a una solución de glutatión agregada por el extracelular. La biotina reducible se resuspende en agua destilada a una concentración de 0.2mg/ μ L y se guardan alícuotas de 50 μ L a -20°C. La biotina se disuelve en PBSCM a una concentración de 2 mg/mL. Las células sembradas en filtros Transwell se incubaron por el lado apical con 0.6 mL de biotina dos veces por 20 min a 4°C, mientras que el basolateral se mantuvo con 1mL de PBSCM. Luego las células se volvieron a 37°C con su respectivo tratamiento. Finalizado el tratamiento las células se volvieron a 4°C y se incubaron con solución reductora: glutatión 50 mM, NaCl 90mM10% SFB, MgCl 1mM, CaCl₂ 0.1mM, NaOH 60mM, pH

final 7.2-7.4. Se incubaron con 0.6 mL por apical y 1mL por basolateral separadamente por 30 min a 4°C con agitación suave. Luego los filtros se lavaron con PBSCM y se secaron aireándolos para continuar con el protocolo de precipitación con Neutravidina.

5.2.9 Precipitación de proteínas biotiniladas con Neutravidina

Para obtener las proteínas biotiniladas es necesario aislarlas de las proteínas totales, esto se hace mediante precipitación con Neutravidina, debido a la alta afinidad entre ambas proteínas.

La membrana de los filtros se extrajo del soporte cortándolos con un cuchillo. El filtro se introdujo en un tubo eppendorf y se incubaron con 0.5 mL de tampón Ripa más inhibidores de proteasa (PMSF 2 mM, leupeptina 2 ug/mL y pepstatina 2 µg/mL) por 1 h a 4°C con agitación fuerte. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4°C. El lisado se incubó con 40 µL de Sepharose-Neutravidina con tampón Ripa por 2 h a 4°C en agitación suave. El complejo proteína biotinilada-Neutravidina se lavó haciendo tres pasos de centrifugación a 2000 rpm por 2 min y lavados con 0.5 mL de tampón Ripa. Luego del último lavado se extrajo todo el Ripa y se agregaron 30 µL de tampón de carga 4X (TrisHCl pH 6.8 63mM, glicerol 8.5%, SDS2%, β-mercaptoetanol 0,72 M y una punta de espátula de azul bromo fenol). La muestra se calentó a 60°C por 5 min para luego someterse a SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las proteínas de interés se detectaron mediante inmunoblot.

5.2.10 Inmunoblot

Las proteínas provenientes de las biotinilaciones o lisado total fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones reductoras y posteriormente transferidas a membranas de polyvinylidenedifluoride (PVDF). Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti: Flag para detectar el receptor de opioides y anti: E-caderina como control de selectividad. Los anticuerpos fueron incubados en tampón PBS con 5% leche descremada. Los lavados se realizaron en tampón PBS Tween-20 0.5% cinco veces por 5 min con agitación fuerte para el anti:Flag hecho en conejo y agitación suave para anti:Ecaderina hecho en ratón. Para algunos blot se utilizó anticuerpo anti:Flag (M1) hecho en ratón que requiere de la presencia de calcio y se incubaba en una solución que contiene: 10 mM TrisHCl ph 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ , 0.2% Tween-20, 5% leche descremada . Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano anti:ratón o conejo según el anticuerpo primario utilizado. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas usando un sistema de quimioluminiscencia de ECL.

5.2.11 Fluorografía

Los geles que se utilizan en la separación de proteínas marcadas radioactivamente con [³⁵ S] metionina/cisteína se someten al proceso de fluorografía para visualizar con mejor sensibilidad la emisión del ³⁵ S. Los geles se lavaron con agua destilada y luego se fijaron por 30 min en una solución de isopropanol: agua: ácido acético 25:65:10. Posteriormente, se lavaron dos veces con agua destilada y

se incubaron con el reactivo Amplify durante 30 min. Finalmente los geles se secaron sobre un papel filtro en un secador acoplado a una bomba a 65°C por 2,5 horas y se dejaron exponiendo en una pantalla Cyclone.

5.2.12 Inmunofluorescencia indirecta

Células crecidas en cubreobjetos de vidrio o filtros se fijaron con 4% paraformaldehído, 4% sacarosa diluido en PBS por 20 min a temperatura ambiente, para experimentos de transcitosis del receptor de opioides se utilizó siempre solución fijadora preparada fresca. Las células se permeabilizaron por 15 min con 0.05% saponina diluida en PBS. Para incubar los anticuerpo se fabricó una cámara húmeda con papel absorbente embebido en agua para evitar el resecamiento de los cubres o filtros. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en saponina. El anticuerpo primario se incubó durante 1 h a 37°C o bien durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario se incubó durante 1 h a 37°C. Luego las muestras se lavaron con PBS y los filtros se cortaron cuidadosamente con un cuchillo afilado evitando que este se doble. Se montaron sobre un porta objetos de vidrio con 15-20 µL de medio de montaje Fluoromont G por el lado superior e inferior del filtro. El filtro se cubre por la parte superior con un cubre objeto de vidrio. Las muestras se dejaron secando a temperatura ambiente por 24 h.

5.2.13 Marcaje de la superficie apical en células vivas

Este ensayo se realizó en células sembradas en filtros de 12 mm. Las células vivas se llevaron a la pieza fría y se incubaron, por el compartimento apical, con 100 µL de anticuerpo anti:Flag hecho en ratón en una dilución 1:400 en DMEM

suplementado con Hepes previamente enfriado. Por el basolateral se agregaron 0.5 mL de DMEM Hepes. Luego de 40 min las células se lavaron con PBS frío para retirar el exceso de anticuerpo y se volvieron a la estufa de cultivo a 37°C en presencia o ausencia del agonista. El tratamiento con agonista DADLE 5 μ M se realizó en medio completo y se agregó por el compartimento apical en un volumen de 0.5 mL, mientras que por el basolateral se agregaron 0.7 mL de medio completo. Luego las células se lavaron con PBSCM, en algunos experimentos las células se biotinilaron y luego se fijaron con paraformaldehído. Luego de fijar los filtros estos se permeabilizan con 0.05% saponina diluida en PBS durante 15 min y se incubaron con el anticuerpo secundario también diluido en saponina durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Luego los filtros se lavaron con PBS y se cortaron cuidadosamente con un cuchillo afilado evitando que este se doble. Se montaron sobre un porta objetos de vidrio con 15-20 μ L de medio de montaje Fluoromont G por el lado superior e inferior del filtro. El filtro se cubre por la parte superior con un cubre objetos de vidrio. Las muestras se dejaron secando a temperatura ambiente por 24h.

5.2.14 Marcaje con estreptavidina Alexa-568

Luego de biotinar selectivamente las células se fijaron con 4% paraformaldehído, 4% sacarosa diluido en PBS por 20 min a temperatura ambiente. La estreptavidina Alexa 568 (2mg/mL) se incubó junto con el anticuerpo secundario diluida entre 1:500-1:1000 en 0.05% saponina durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Luego se lavaron con PBS y se montaron en porta objetos de vidrio.

5.2.15 Adquisición de imágenes

Las imágenes confocales se tomaron en un microscopio confocal Nikon modelo Eclipse C2. Tomamos secciones confocales de 0.25 μm a una resolución de 1024 x 1024 píxeles, abarcando una región entre 10-15 μm correspondiente a la altura de una MDCK sembrada a confluencia lo que genera aproximadamente 40-50 fotos por cada canal.

5.2.16 Cuantificación de imágenes

Las imágenes confocales se procesaron con el software Image J (NIH, Bethesda) y el análisis de colocalización se realizó utilizando el plugin JACoP ajustando un umbral de señal y midiendo el índice de Manders que va de 0 a 1 (Bolte & Cordelieres 2006). Los coeficientes de Manders representan al porcentaje de píxeles de un canal (el DOR) para una proteína determinada que se sobrelapan con los píxeles de un segundo canal (la estreptavidina-Alexa 568 apical o basolateral). Así, el coeficiente de Manders se puede utilizar directamente como una medida del porcentaje de proteína ubicada en determinada zona pero para facilitar la comprensión los valores se expresan en porcentaje.

6. Resultados

6.1 Cambios de distribución del DOR inducidos por su estimulación en células MDCK

Para estudiar la vía de transcitosis apical-basolateral generamos células MDCK transfectadas permanentemente con un plasmidio de expresión que contiene el cDNA del DOR con un epitope Flag en su extremo amino terminal (MDCK-DOR). Mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti:Flag seleccionamos aquellos clones con la mayor cantidad de células positivas para el DOR (Fig. 1A). Como se esperaba, el DOR mostró un patrón de distribución preferencialmente apical, dando imágenes características de microvellosidades. La proyección ortogonal de una serie de cortes confocales muestra que el DOR codistribuye con el marcador apical endógeno gp135, en oposición a la marca de la proteína basolateral E-caderina (Fig. 1B). Estas imágenes son congruentes con la distribución polarizada de proteínas de superficie detectada por biotilación dominio selectiva. Un banda de 55 kDa correspondiente al DOR maduro se observó predominantemente en el dominio apical, mientras que la E-caderina sólo se encontró en la superficie basolateral (Fig. 1C). Estos resultados reproducen las observaciones previas de la tesis de FS, indicando que la proteína DOR contiene información de destinación apical que es reconocida por las células MDCK.

Luego estudiamos el cambio de distribución del DOR hacia el polo basolateral inducida por ligando, que se había observado previamente en la tesis de FS,

intentando optimizar las técnicas de detección para definir si efectivamente el DOR se inserta en la membrana basolateral.

Primero reproducimos las imágenes en inmunofluorescencia con nuestros clones MDCK-DOR. Para esto sembramos células MDCK-DOR en filtro y esperamos 4 días para que se polaricen completamente. Luego las tratamos con el agonista peptídico del DOR, DADLE 5 μ M por 1 h, y realizamos una inmunofluorescencia indirecta contra el epítipo Flag. Observamos que el DOR efectivamente se redistribuyó adquiriendo un patrón de fluorescencia tipo panel de abeja característico de las proteínas basolaterales en presencia del agonista (Fig. 1D). Obtuvimos un resultado similar incubando las células vivas con el anticuerpo anti:Flag adicionado apicalmente por 40 min a 4°C y luego tratando las células a 37°C con DADLE por 1 h (Fig. 1E). Esto indica que las células tratadas con DADLE relocalizan el DOR desde el polo apical hacia el polo basolateral descartando una contribución del DOR proveniente de la ruta exocítica.

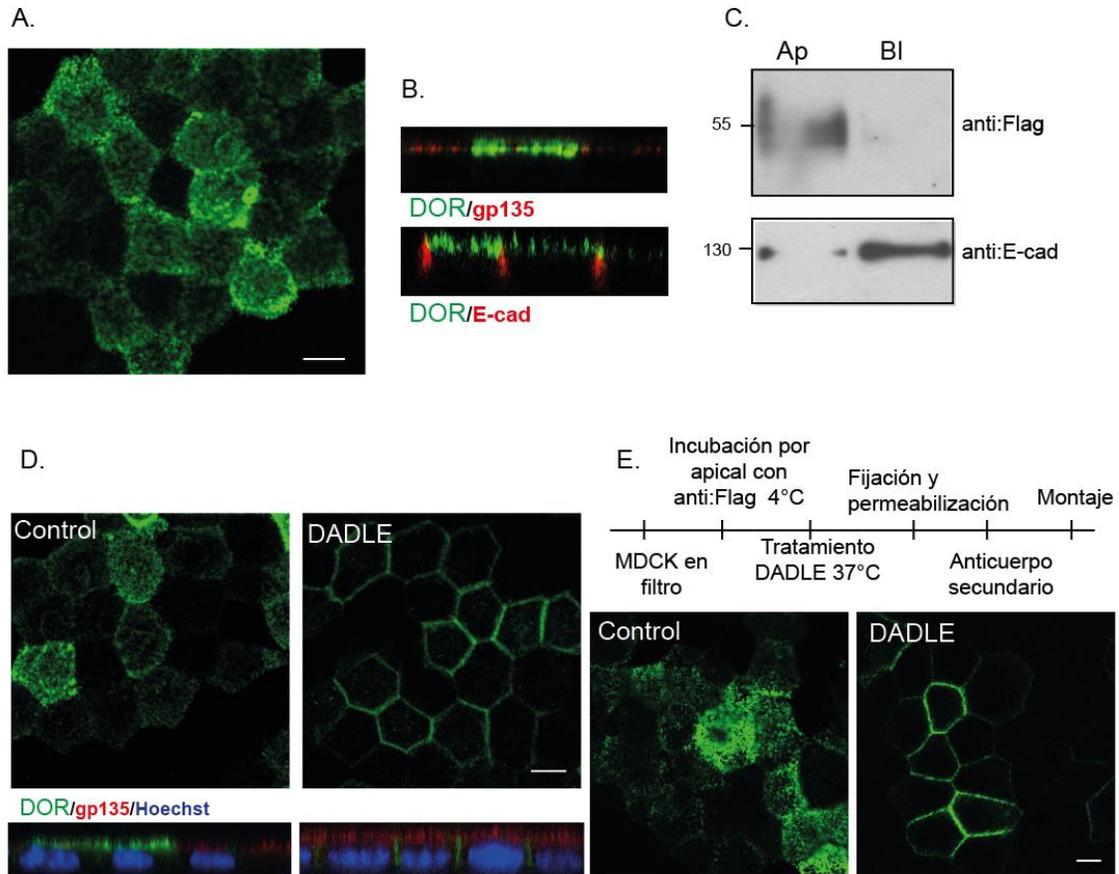


Figura 1. El DOR como modelo de transcitosis apical-basolateral en células epiteliales. Células MDCK se transfecaron establemente con un plásmido que contiene el receptor de opioides tipo δ (DOR) con un epítopo Flag en su extremo amino terminal (MDCK-DOR). A) Imagen de la expresión apical del DOR en condición basal. Inmunofluorescencia de células MDCK-DOR crecidas en filtro marcadas con anti:Flag. Barra corresponde a 10 μm . B) Corte ortogonal de células MDCK-DOR marcadas con anti:Flag más una proteína endógena apical, anti: gp135 y una basolateral anti:E-caderina. C) Mediante biotilación dominio selectiva se aislaron las proteínas del dominio apical (Ap) y basolateral (Bl) y por inmunoblot, utilizando anticuerpo anti:Flag, se detectó el DOR en el dominio apical de las células MDCK. Como control de selectividad se utilizó anti:E-caderina. Peso molecular en kDa. D) Redistribución basolateral del DOR en respuesta al tratamiento con su agonista. MDCK-DOR fueron tratadas con DADLE 5 μM por 1 h y luego fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti:Flag, anti:gp135 y tinción nuclear de Hoechst. Barra, 10 μm . En el panel inferior se muestra la proyección ortogonal. Experimento representativo, n=5. E) Esquema del ensayo de marcaje de superficie en células vivas. La imagen muestra que el DOR ubicado inicialmente en la superficie apical transita al polo basolateral en respuesta a la activación por ligando. Experimento representativo, n=3. Barra corresponde a 10 μm .

Como estos resultados todavía no demuestran que el receptor realmente se esté insertando en la membrana basolateral, intentamos distintos protocolos de detección de proteínas en la superficie celular. Con la estrategia de la biotinylation selectiva no logramos detectar aparición del DOR en la superficie basolateral. En la situación control detectamos el DOR predominantemente en la superficie apical, mientras que después de activarlo con su agonista desapareció de ambas superficies (Fig. 2A). La masa del DOR se mantuvo durante el experimento, descartando que la degradación del receptor impidiera su detección en la superficie basolateral. También probamos biotinylation después de marcaje metabólico, técnica ya utilizada en nuestro laboratorio para proteínas de difícil detección (Matus et al 2007). Esta variante sólo mostró una débil banda a la altura del DOR en la superficie apical en situación control (Fig. 2B).

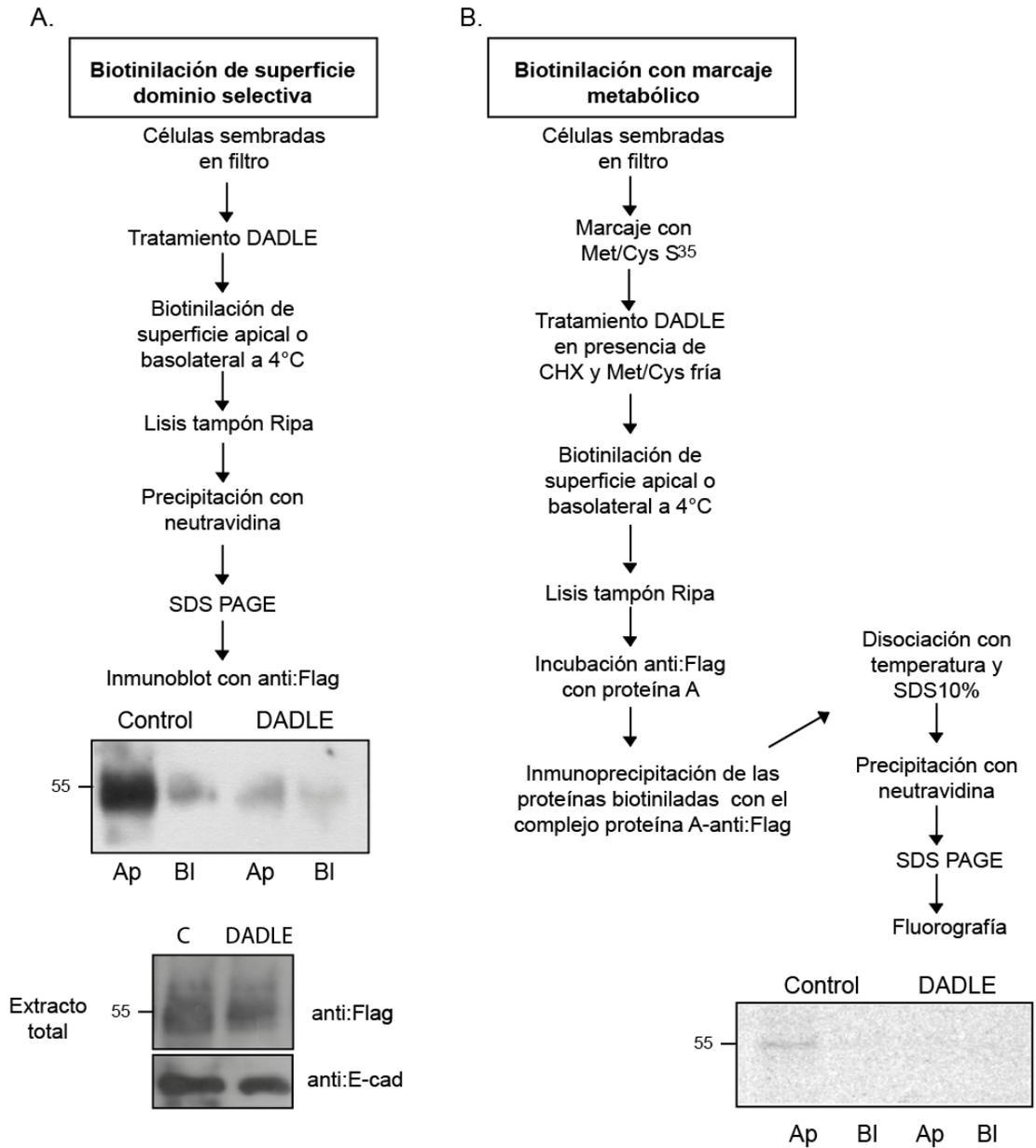


Figura 2. Ensayos bioquímicos para detectar el DOR en la superficie basolateral de células MDCK. A) Esquema y resultado del ensayo de biotinilación dominio selectiva en células MDCK-DOR controles y tratadas con DADLE. También se muestra un extracto total de células en la condición control (C) y DADLE. Como control de carga se incubó la misma membrana con anti:E-caderina. B) Esquema y resultado del ensayo de biotinilación con marcaje metabólico en células MDCK-DOR controles y tratadas con DADLE. Peso molecular en kDa. Por ambas técnica sólo pudimos detectar el DOR en la superficie apical. CHX, cicloheximida.

Como una nueva estrategia realizamos una inmunofluorescencia indirecta en condiciones no permeabilizantes adicionando el anticuerpo anti:Flag ya sea por el compartimento apical o basolateral de células MCDK-DOR cultivadas en filtros hasta confluencia. De esta manera sólo detectaríamos el DOR que se encuentra en la superficie celular respectiva (Fig. 3A). En la situación control observamos una robusta marca apical y una débil marca, casi indetectable, basolateral. En cambio, cuando incubamos las células con DADLE vimos desaparecer la marca apical mientras que apareció claramente una marca de borde basolateral, correspondiente a la interacción del anticuerpo secundario con el complejo anticuerpo primario-DOR en la superficie de este dominio. Este resultado constituye la primera evidencia de una inserción del DOR proveniente del polo apical en la membrana plasmática basolateral.

Esto nos motivó a obtener mayor evidencia de esta nueva ruta de transcitosis utilizando un protocolo de biotinylación con un reactivo reducible por glutatión (esquema Fig. 3B). Esta técnica ya ha sido utilizada por nuestro laboratorio para demostrar el tránsito de una proteína desde un polo de la superficie celular hacia el polo opuesto (Burgos et al 2004). Primero biotinilamos el dominio apical a 4°C de las células MDCK-DOR cultivadas a confluencia en cámaras Transwell. Luego de incubar por 1 h las células a 37°C con medio control o con DADLE 5 µM adicionado al medio apical, adicionamos glutatión a 4°C al compartimento apical o basolateral. De esta manera se elimina la biotina desde las proteínas que están en la superficie celular ya que el glutatión no entra a la célula. La solución reductora con glutatión rompe el puente disulfuro del enlace entre la proteína de superficie y la biotina. En la situación control, vimos que la reducción por el polo apical, pero no por el polo

basolateral, redujo la masa del DOR precipitada por Neutravidina, mostrando así la eficiencia dominio selectiva de la reducción con glutatión (Fig. 3C). En contraste, al estimular con el agonista observamos un resultado inverso. Es decir, el glutatión aplicado por el polo apical no redujo la masa del DOR biotinilado, indicando que adquirió resistencia al moverse hacia el interior de la célula y hacia el polo basolateral. Corroboramos la aparición del DOR en la superficie basolateral al adicionar el glutatión agregado por el polo basolateral, que hizo desaparecer la masa del DOR biotinilado por el polo apical.

Estos resultados, obtenidos con dos tipos de ensayo diferentes, demuestran fehacientemente que el DOR se mueve desde la superficie apical hacia la superficie basolateral al ser activado por su agonista, revelando así por primera vez la existencia de una ruta de transcitosis apical-basolateral regulada por estímulos externos.

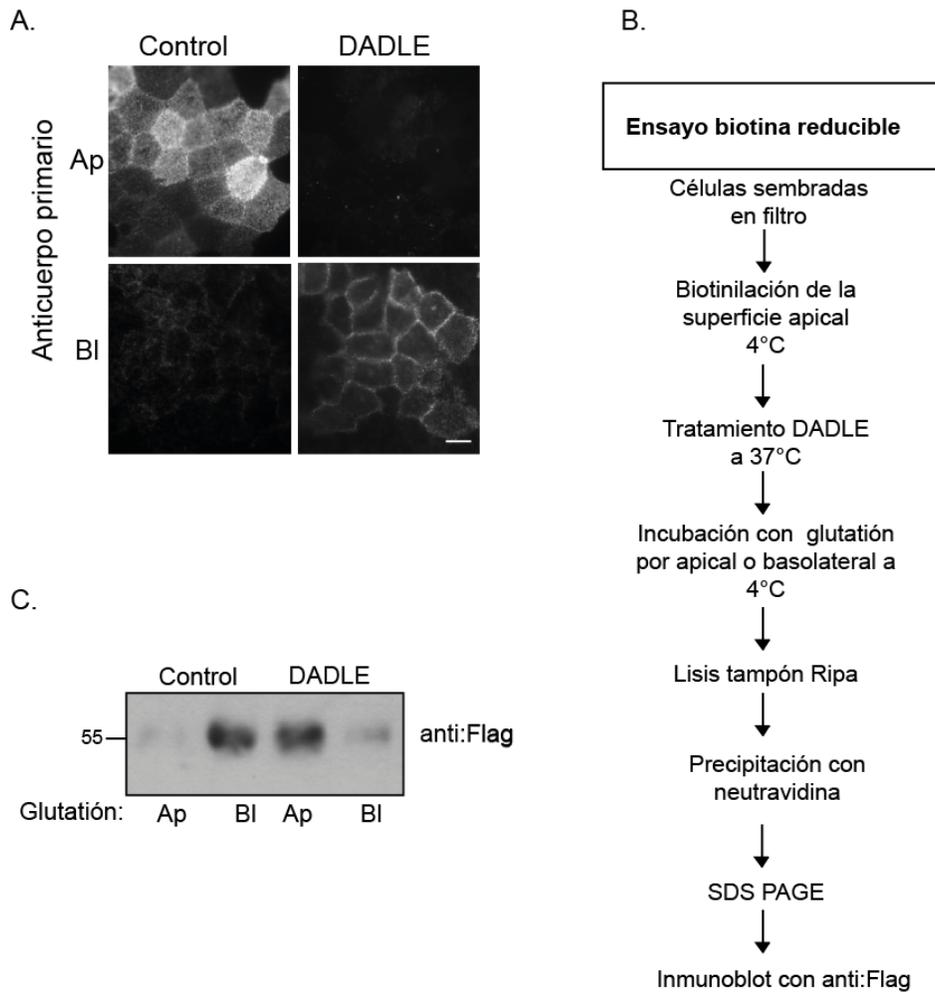


Figura 3. Inserción del DOR en la membrana basolateral en respuesta a la activación por su agonista. A) Inmunofluorescencia en condiciones no permeabilizantes de células MDCK-DOR tratadas con medio control o DADLE. El anticuerpo primario se incubó sólo por el dominio apical (Ap) o basolateral (BI) y el secundario por ambos lados. Imagen microscopia de epifluorescencia. Barra corresponde a 10 μ m. B) Esquema ensayo de biotinilación con biotina reducible. C) Ensayo de transcitosis con biotina reducible en células MDCK controles y tratadas con DADLE 5 μ M por 1 h. Peso en kDa. La desaparición de la masa del receptor al contacto con glutatión es reflejo de su presencia en la superficie. Experimento representativo , n=3.

6.2 El receptor DOR estimulado por su ligando es transportado por vesículas desde el polo apical al basolateral sin afectar la integridad de las uniones estrechas

Inicialmente al realizar los experimentos de transcitosis por inmunofluorescencia no observamos intermediarios vesiculares que dieran cuenta de la redistribución del receptor. Aún a tiempos cortos de tratamiento (15-30 min) no detectamos el DOR en vesículas o algún compartimento intracelular con la técnica corriente de permeabilización con 0.2% Tritón-X100 (Fig. 4A). Nos planteamos entonces la posibilidad de que el tratamiento opioide estuviera abriendo transitoriamente la estructura de las uniones estrechas, tal como se ha descrito en otras condiciones (Gonzalez-Mariscal et al 2008), permitiendo la difusión del DOR desde el apical al basolateral. Por lo tanto, evaluamos la integridad de las uniones estrechas con un ensayo de permeabilidad a inulina H^3 adicionada al compartimento apical de las células MDCK-DOR cultivadas a confluencia en cámaras Transwell. A distintos tiempos analizamos la cantidad de inulina H^3 que pasó al compartimento basolateral y como control positivo se utilizó el paso a través del filtro sin células (Fig. 4B). La permeabilidad de la inulina H^3 resultó ser muy baja (aprox. 3% a las 6 h) tanto en las MDCK-DOR control como en las tratadas con DADLE. Este experimento descartó la posibilidad de difusión del DOR desde el polo apical al basolateral por apertura de las uniones estrechas y nos llevó a plantearnos el protocolo de inmunofluorescencia.

Probamos permeabilizar las células con saponina 0.05%, que extrae colesterol haciendo perforaciones en las membranas, recomendado para

compartimentos enriquecidos en colesterol, (Goldenthal et al 1985). Con este sencillo cambio logramos por primera vez detectar vesículas intracelulares conteniendo DOR bajo condiciones de estimulación con su ligando (Fig. 4C). Estas vesículas se ubicaron principalmente en un plano supranuclear.

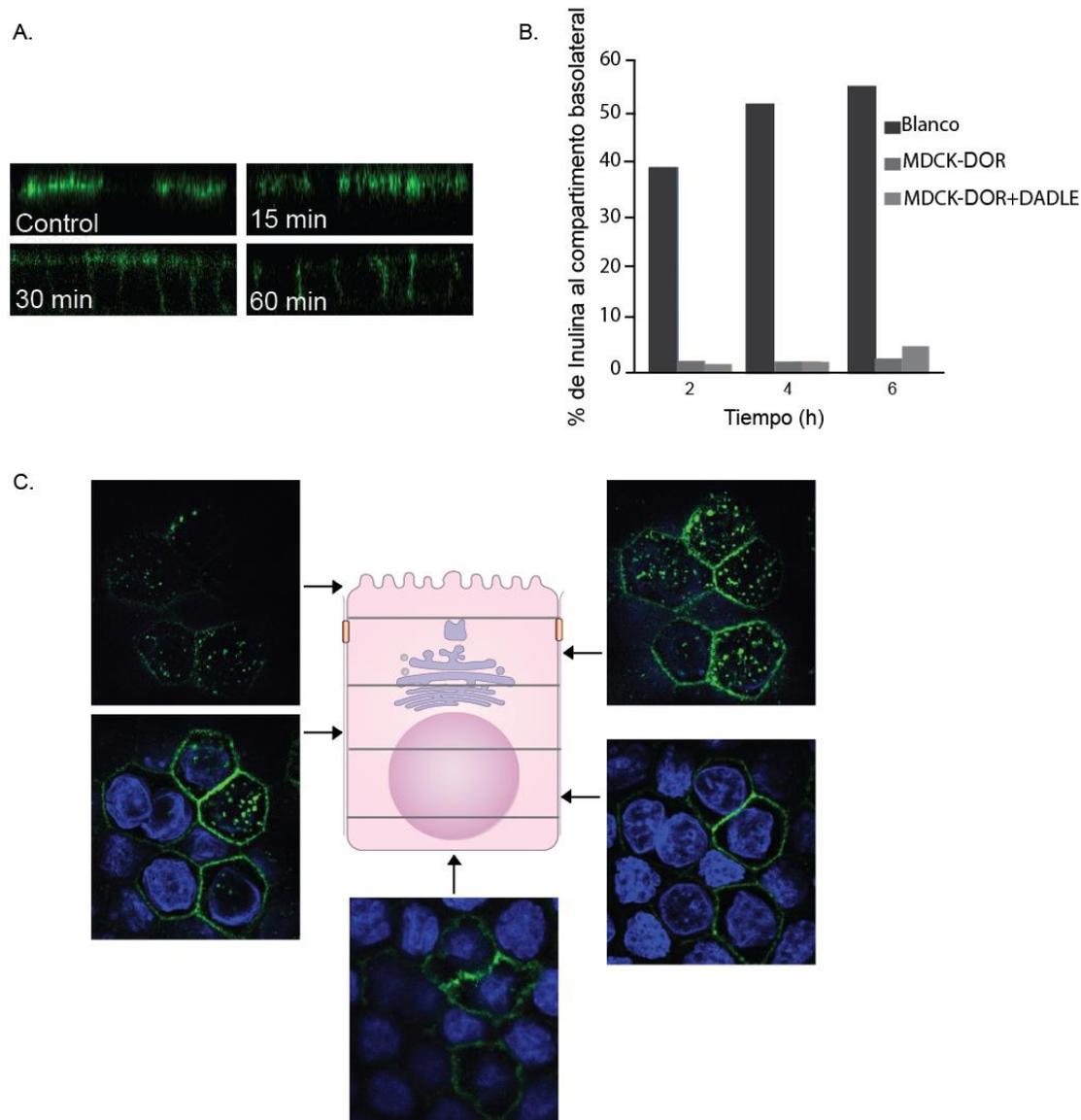


Figura 4. La activación del DOR gatilla el transporte vesicular desde el polo apical al basolateral sin afectar la integridad de las uniones estrechas A) Imágenes confocales de la distribución del DOR a diferentes tiempos. Inmunofluorescencia permeabilizada con 0.2% Triton X-100. B) Ensayo de permeabilidad a inulina H^3 . MDCK-DOR sembradas en filtro fueron incubadas por el compartimento apical con inulina H^3 1.25 $\mu C/\mu L$ en presencia o ausencia de agonista DADLE 5 μM . A diferentes tiempos se recolectó medio apical y basolateral y en un contador de centelleo se midió la radioactividad y se calculó el porcentaje de Inulina H^3 que pasa del compartimento apical al basolateral. Como control positivo se utilizó un filtro sin células. C) Imágenes de diferentes planos confocales desde el apical al basolateral. En el centro un dibujo de un célula MDCK como referencia.

6.3 Cinética de la transcitosis del DOR: Análisis cuantitativo mediante inmunofluorescencia

Dado que los métodos bioquímicos convencionales no nos permiten visualizar los cambios en la polaridad del DOR utilizamos una variante del protocolo de biotinylación dominio selectiva utilizando estreptavidina acoplada al fluoróforo Alexa 568 para detectar por microscopía de fluorescencia las proteínas de superficie. Esta técnica detecta con facilidad las proteínas de superficie del polo apical y basolateral (Fig. 5A) y su combinación con el ensayo marcaje de superficie en células vivas (Fig. 1E) nos permitió cuantificar la cantidad relativa del DOR que aparece en el polo basolateral proveniente del apical.

La figura 5B muestra una imagen confocal representativa de un ensayo de transcitosis acoplado al protocolo de biotinylación y unión de estreptavidina-Alexa 568 en la superficie basolateral. El análisis a distintos tiempos de incubación con DADLE mostró que el DOR aumenta en la superficie basolateral desde un 13% a un 50% en 60 min, manteniéndose en este valor por al menos tres horas. Esto indica que una vez que el DOR llega a la superficie basolateral se mantiene sin redistribuirse nuevamente por al menos tres horas (Fig 5C).

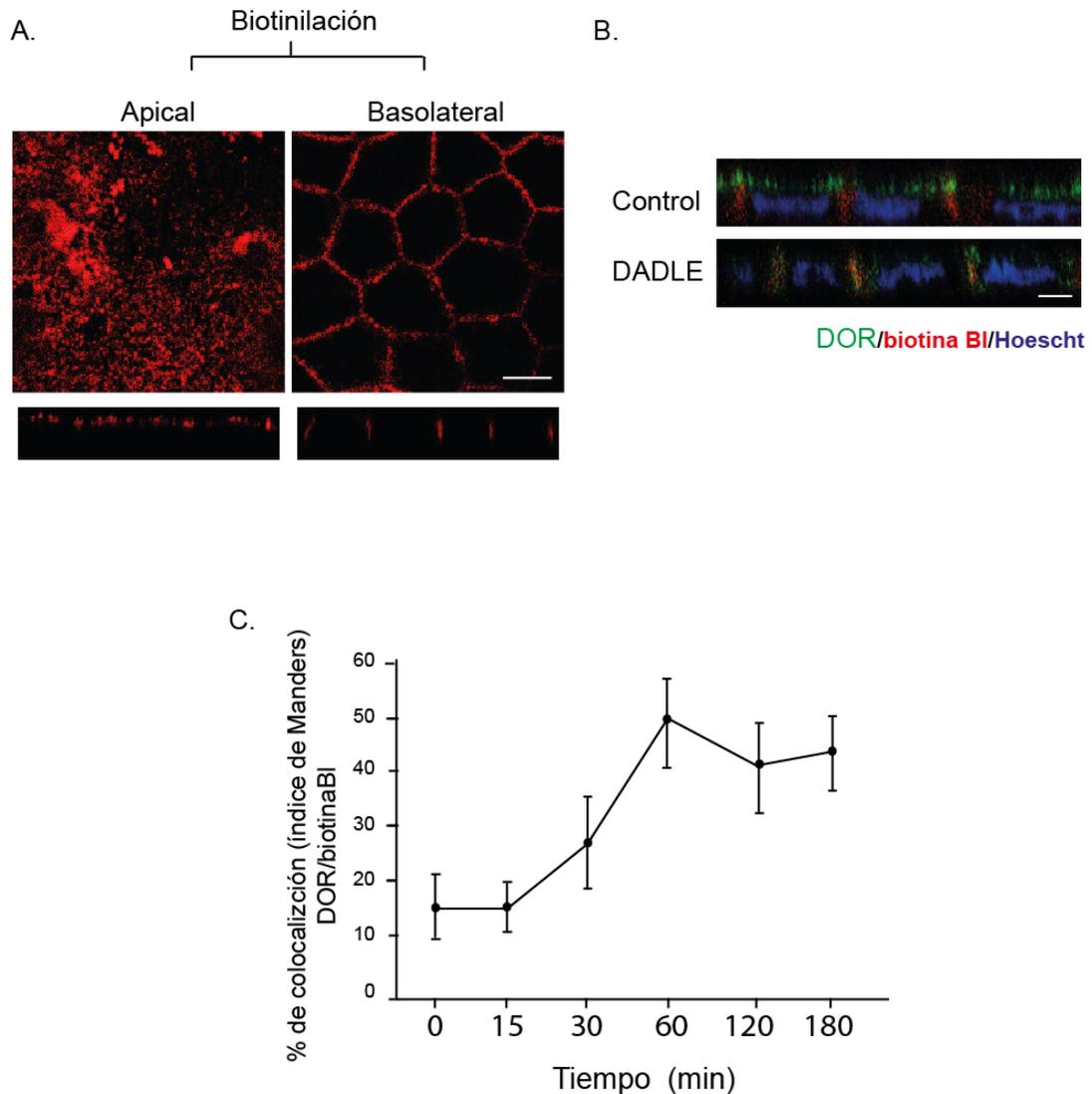


Figura 5. Cuantificación del DOR en la superficie basolateral en respuesta a la activación por su agonista DADLE. A) Células MDCK-DOR sembradas en filtro fueron biotiniladas por el compartimento apical o basolateral. Luego fueron fijadas e incubadas con estreptavidina-Alexa 568. Imagen confocal representativa de la distribución de las proteína biotiniladas y detectadas con estreptavidina Alexa 568. B) Imagen confocal representativa de MDCK-DOR control y tratadas con DADLE por 1 h y biotiniladas por basolateral (BI). Barra corresponde a 5 μ m. C) Gráfico que representa la fracción del DOR que colocaliza con la superficie basolateral marcada con estreptavidina a diferentes tiempos de incubación con DADLE 5 μ M. Las barras corresponden a la desviación estándar. Se cuantificaron en promedio 20 células por condición.

6.4 Análisis del tráfico intracelular del DOR mediante híbridos con GFP

Para el estudio del tráfico intracelular de cualquier proteína es muy útil expresarla en un vector que contenga la proteína fluorescente verde (GFP), lo cual permite seguir su tráfico "*in vivo*". La GFP es una proteína derivada de la medusa *Acquorea victoria*, que presenta fluorescencia verde intensa cuando se excita con una luz de longitud de onda de 488 nm.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la generación de un constructo DOR con el GFP acoplado en el carboxilo terminal se destina principalmente a la membrana apical, tal como la proteína nativa, pero no transita hacia el polo basolateral al estimularlo con el agonista, quedándose retenido en un compartimento intracelular. Como esto sugería que una señal de transcitosis apical-basolateral funciona parcialmente en el híbrido DOR-GFP, decidimos generar otras construcciones modificando la estrategia inicial.

Generamos una construcción adicionando el GFP en el extremo amino terminal del DOR (GFP-DOR) y otra construcción con el GFP en el extremo carboxilo pero adicionando un péptido espaciador de 15 residuos (DOR-esp-GFP). En ambos mantuvimos el epitope Flag en el extremo amino terminal. La estrategia se detalló en Métodos. Una vez clonadas y verificadas estas construcciones mediante secuenciación, las expresamos en células MDCK. El constructo GFP-DOR se expresó pero la proteína quedó retenida en el retículo endoplasmático. No logramos ver la proteína en la superficie celular aun cuando inhibimos la síntesis de proteínas con cicloheximida por varias horas para disminuir la cantidad de proteína

en el RE (Fig. 6). Probablemente la incorporación de la proteína GFP en el extremo amino del DOR afectó su correcto plegamiento y en consecuencia su salida de la ruta exocítica.

La proteína fusión DOR-esp-GFP mostró un resultado distinto, expresándose en la superficie pero con una distribución no-polarizada, contrastando con la distribución apical del receptor nativo (Fig. 7A). Con este constructo generamos una línea estable (MDCK DOR-esp-GFP) y evaluamos si el receptor localizado en el dominio apical era capaz de hacer transcitosis. Dado que esta construcción mantiene el epítipo Flag en el amino terminal realizamos el ensayo de marcaje de superficie en células vivas ya descrito. Primero, incubamos las células con el anticuerpo anti:Flag por el compartimento apical a 4°C, para luego tratarlas con DADLE 5 µM por 1 h a 37°C. Cuantificamos la distribución del DOR-esp-GFP con el método de biotinilación y unión de estreptavidina-Alexa-568 descrita en la figura 5. En la situación control, la marca del Flag (rojo) coincidió con la fluorescencia de la GFP en el plano apical, mientras que en el basolateral sólo se vio la fluorescencia de la GFP. En las células tratadas con el agonista vimos que la marca del Flag ahora coincidió con la fluorescencia de la GFP en el plano basolateral, reflejando transcitosis desde la superficie apical (Fig. 7B). Para evitar confusión no mostramos la marca de la estreptavidina-Alexa. La cuantificación con la estreptavidina-Alexa basolateral confirmó la transcitosis del DOR-esp-GFP (Fig. 7C).

El receptor FcRn tiene la capacidad de hacer transcitosis en ambos sentidos, apical-basolateral y viceversa (McCarthy et al 2001). La distribución no polarizada del constructo DOR-esp-GFP en condición basal abrió la posibilidad de evaluar si el DOR es capaz de realiza transcitosis inversa al ser activado por su ligando por el

compartimento basolateral. Para esto realizamos el ensayo de marcaje de superficie en células vivas incubando con el anticuerpo anti:Flag por el lado basolateral y luego tratándolas con DADLE por el basolateral a 37°C. En estas condiciones el DOR basolateral marcado con anti:Flag no cambió su distribución (Fig. 7D), indicando que este receptor no hace transcitosis en ambos sentidos como lo hace el FcRn.

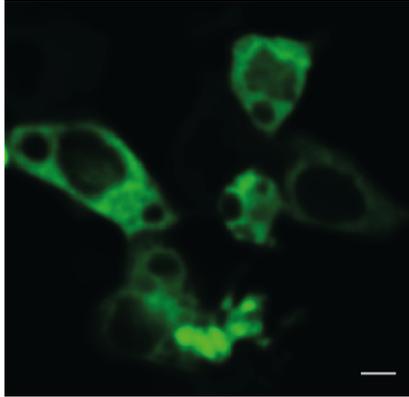


Figura 6. Expresión intracelular de la proteína fusión GFP-DOR. Imágen representativa del patrón de expresión del constructo GFP-DOR expresado en células MDCK, n=2. Barra corresponde a 10 μm .

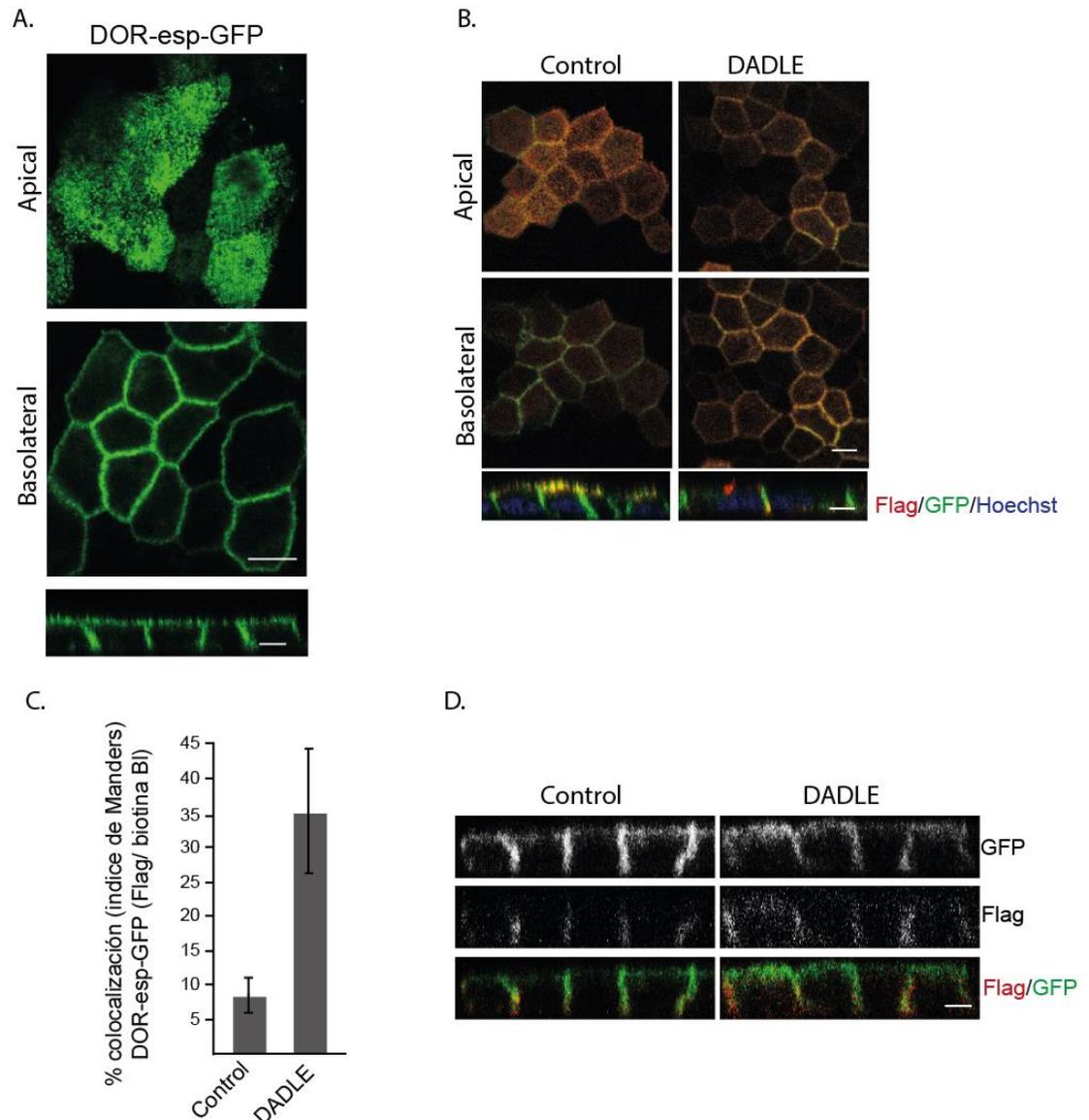


Figura 7. La proteína fusión DOR-esp-GFP se expresa en ambos polos de la célula y hace transcitosis apical-basolateral pero no a la inversa. MDCK fueron transfectadas establemente con un plasmido que contiene el receptor DOR acoplado a GFP y entre ambas un espaciador. El constructo mantiene en el amino el epítopo Flag. A) Imagen confocal de la expresión del constructo DOR-esp-GFP en células MDCK polarizadas en un plano apical, basolateral y ortogonal. La barra superior corresponde a 10 μm y la inferior a 5 μm . B) Ensayo de transcitosis en células MDCK estables para DOR-esp-GFP. Unión del anticuerpo anti:Flag (rojo) por el compartimento apical y posterior tratamiento con medio control o DADLE 5 μM por 1 h. La barra superior corresponde al 10 μm y la inferior 5 μm . C) Cuantificación de B utilizando biotinal/estreptavidina Alexa 568 como marcador de la superficie basolateral (BI). Las barras corresponden a la desviación estándar, $n=20$ células para cada condición. D) Experimento de transcitosis basolateral-apical. Las células MDCK estables para DOR-esp-GFP fueron incubadas por el basolateral con anti:Flag y luego se trataron por basolateral con medio control o DADLE 5 μM por 1 h y luego procesadas para inmunofluorescencia. Barra corresponde a 5 μm .

6.5 Análisis de posibles motivos de destinación polarizada en el DOR

Los resultados de transcitosis desde el polo apical al basolateral, pero no a la inversa, indican que el DOR contiene motivos de destinación polarizada que actuarían primero determinando su distribución apical y luego su tráfico hacia el polo basolateral. La pregunta que surge entonces es si estos motivos tienen similitud con los descritos.

6.5.1 Análisis de la N-glicosilación como posible señal de destinación apical del DOR

El determinante de polaridad apical más frecuentemente descrito es la N-glicosilación (Rodriguez-Boulan & Gonzalez 1999, Weisz & Rodriguez-Boulan 2009). El DOR en su región amino terminal contiene dos motivos de N-glicosilación que son efectivamente glicosilados (Markkanen & Petaja-Repo 2008). Por lo tanto, primero tratamos las células con un inhibidor farmacológico de la N-glicosilación tunicamicina, que inhibe a la enzima oligosacaril transferasa responsable de transferir el complejo de 14 residuos desde el dolicol a la asparagina en el contexto de los motivos de N-glicosilación, N-x-S/T (donde N es asparragina, S serina y T treonina) (Aebi et al 2010). El tratamiento con tunicamicina (10 µg/mL) por 16 h no afectó la distribución apical del DOR analizada por inmunofluorescencia (Fig. 8A). Por inmunoblot corroboramos que la banda correspondiente al receptor maduro de 55 kDa disminuyó, indicando pérdida de N-glicosilación, mientras que la banda de 43 kDa correspondiente al receptor sin sus azúcares aumentó. La E-caderina que

también es una glicoproteína (Pinho 2011) también aumentó su migración electroforética con el tratamiento con tunicamicina (Fig. 8B). No obstante, el tratamiento con tunicamicina no eliminó todo el receptor glicosilado y como el DOR homodimeriza (Cvejic & Devi 1997) podría ser que la fracción de DOR glicosilado llevara al receptor no glicosilado a la superficie apical.

Una manera más definitiva de probar el rol de la N-glicosilación es reemplazar por alanina los residuos asparragina N₁₈ y N₃₃ que son glicosilados en el DOR. Realizamos mutaciones sitio-dirigidas para reemplazaron ya sea N₁₈, N₃₃ o ambos por alanina. La transfección transitoria mostró que los DOR mutantes tienen una masa molecular menor al normal, esperable para la pérdida de los sitios de N-glicosilación (Fig. 8D). El análisis por inmunofluorescencia mostró que estos receptores se retienen bastante en el retículo endoplasmático, tal como se ha descrito para la mayoría de las proteínas de membrana al alterarse su N-glicosilación (Fiedler & Simons 1995). Sin embargo, varias células mostraron también el DOR no glicosilado con el típico patrón punteado correspondiente a una distribución apical (Fig. 8D). Podemos concluir que la N-glicosilación no es la señal que determina la localización apical del DOR.

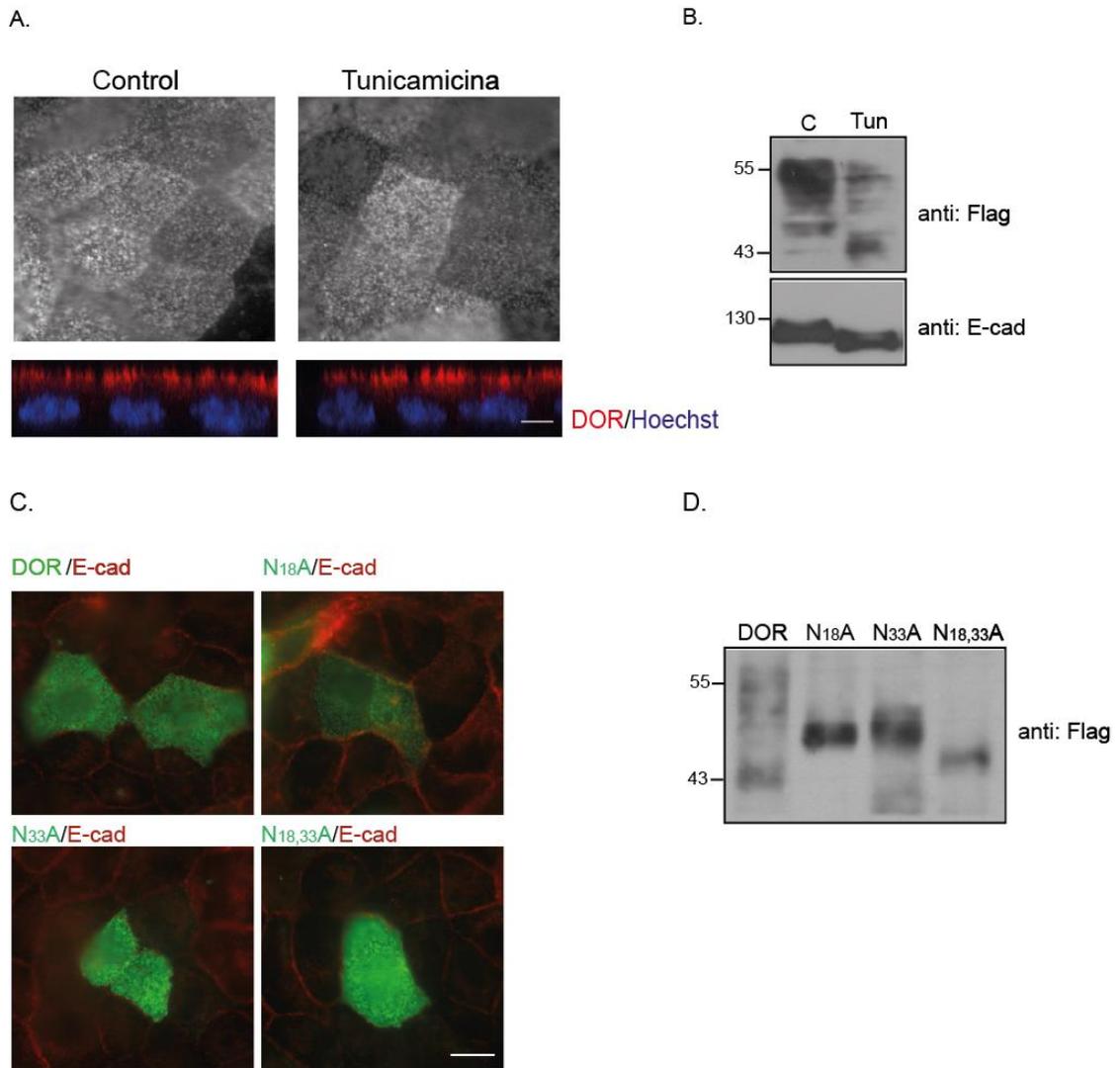


Figura 8. El DOR contiene una señal apical independiente de N-glicosilación. A) Inmunofluorescencia indirecta, contra el epítipo Flag, de células MDCK-DOR crecidas en filtro y tratadas con tunicamicina (Tun) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B) Inmunoblot, contra el epítipo Flag, de células MDCK-DOR tratadas con tunicamicina o medio completo (C). Como control de carga se utilizó anticuerpo anti:E-caderina. El tratamiento con tunicamicina produce un aumento en la migración electroforética del DOR y E-caderina producto de la disminución en su peso molecular dada la remoción de sus azúcares. C) Células MDCK transfectadas con las mutantes de N-glicosilación del DOR fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta contra el epítipo Flag (verde) y E-caderina (rojo). Barra corresponde a 10 μm . D) Inmunoblot de células Hek transfectadas con el DOR normal y las mutantes de N-glicosilación. Similar al efecto de la tunicamicina las mutantes, carentes de las ramificaciones de azúcares, disminuyen su peso molecular. Peso molecular en kDa.

6.5.2 Análisis de posibles señales basolaterales en la transcitosis apical-basolateral del DOR

Las señales basolaterales más comunes se basan en residuos tirosina en el contexto $Yxx\Phi$ (donde x es cualquier aminoácido y Φ es un residuo hidrofóbico) o residuos dileucina en el contexto de aminoácidos ácidos $[D/E]xxxL[L/I]$ (Bonifacino 2014). Al analizar secuencias comunes a los tres sub tipos de receptores que contuvieran residuos tirosina o dileucina encontramos motivos del tipo $Yxx\Phi$ en la primera y segunda asa de estos receptores (Fig. 9). En la primera asa, el DOR tiene un motivo $YTKL$ que en los otros dos receptores tiene un reemplazo por metionina en la tercera posición ($YTKM$), manteniendo la característica de ser hidrofóbico. La segunda asa contiene un motivo $YIAV$ conservado entre los tres miembros de la familia. Además, la tercera asa muestra un motivo dileucina compartido por el receptor DOR y k , mientras que en el receptor μ la primera leucina es reemplazada por una metionina, asemejándose a señales basolaterales basadas en una sola leucina (Deora et al 2004, Wehrle-Haller & Imhof 2001). Por lo tanto, mediante mutaciones sitio dirigidas analizamos si estos motivos son determinantes en la transcitosis hacia el polo basolateral del DOR.

La sola interrupción de la tirosina dentro del contexto $Yxx\Phi$ hace perder o invertir la polaridad de las proteínas basolaterales (Cohen et al 2001a). Por lo tanto, mutamos las tirosinas por alanina obteniendo los mutantes $DORY_{77A}$, $DORY_{147A}$ y el doble mutante $DORY_{77,147A}$, que fueron secuenciados y expresados por transfección transiente células MDCK. Todas estas mutantes se quedaron retenidas intracelularmente con un patrón típico del RE (Fig. 10A) y con una masa molecular

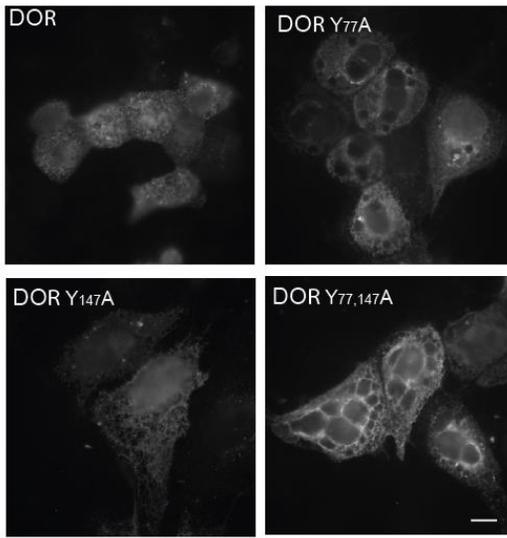
de 45 kDa correspondiente al precursor inmaduro del DOR que se encuentra en el RE (Petaja-Repo et al 2000) (Fig. 10B). Estos resultados indican que la interrupción de los motivos $Yxx\Phi$ en las asas intracelulares del DOR afectó su salida desde el RE, lo cual nos impidió evaluar su contribución en la transcitosis basolateral del DOR.

En la tercer asa existen dos leucina (LL_{243,244}) que también podrían actuar como señal basolateral. Si bien esta leucinas no se encuentran en contexto diacídico hay ejemplos de señales basolaterales basadas en leucina sin este contexto (Miranda et al 2001, Sheikh & Isacke 1996). Mediante mutagénesis sitio dirigida mutamos cada una de las leucinas por alanina (L_{243A} y L_{244A}) y las transfectamos de manera permanente en células MDCK. Estas mutantes se expresaron en la superficie del polo apical pero no se vio afectada la re-distribución basolateral al estimularlas con ligando (Fig. 10C). Estos resultados indican que estos motivos no constituyen una señal basolateral que operativa en la ruta de transcitosis del DOR.

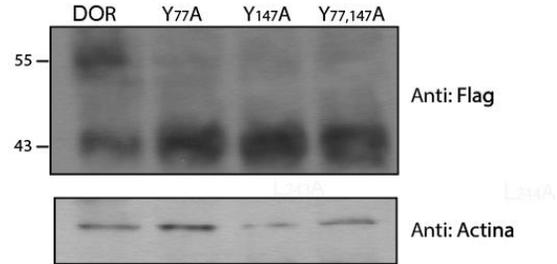
Primer loop	Segundo loop
μ: VIV RYTKM KTATN	μ: DRY YIAV CHPVKALDFRTPRN
δ: RY TKL KTATN	δ: DRY YIAV CHPVKALDFRTPA
κ: RY TKM KTATN	κ: DRY YIAV CHPVKALDFRTPL
Tercer loop	
μ: LMILRL L KSVRMLSGSKEKDRNLRRITRM	
δ: RLRSVR LL SGSKEKDRSLRRITR	
κ: LMILRLKSVR LL SGSREKDRNLRRITK	
Carboxilo terminal	
μ: AFLDENFKRCFR E FCIPTSSSTIEQQNSARIRQNTREHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP	
δ: DENFKRCFRQLCRTPCGRQEPGSLRRRPRQATTREERVACTPSDGPGGGAAA	
κ: DENFKRCFRDFCFPIKMRMERQSTNRVRNTVQDPASMRDVGGMNKPV	

Figura 9. Posibles motivos de destinación basolateral dentro de la secuencia del DOR.
 B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región intracelular de los receptores μ , δ y κ de ratón. Destacado están las posibles señales de destinación basolateral.

A.



B.



C.

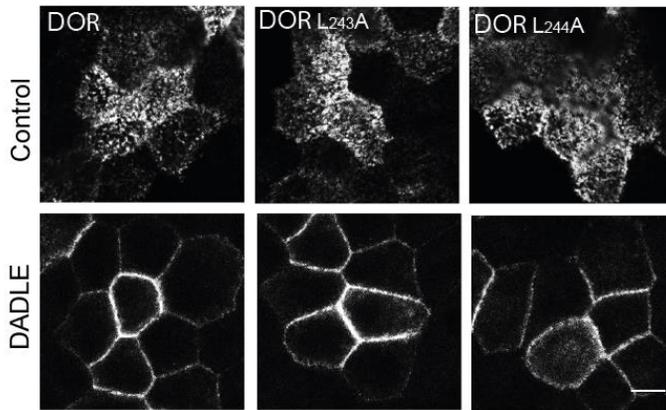


Figura 10. Mutantes de los posibles motivos de destinación basolateral en el DOR. A) Expresión del cDNA del receptor DOR normal y mutado en los posibles sitios de destinación basolateral del tipo YxxΦ. Se realizaron mutaciones puntuales cambiando la tirosina por alanina en los contextos: Y₇₇A, Y₁₄₇A y la mutación de ambas tirosinas juntas Y_{77,147}A. La disrupción de cada uno de estos motivos por separado afecta la salida del receptor DOR hacia la superficie dejándolo retenido en el retículo endoplasmático. B) Inmunoblot de células Hek transfectadas con el DOR normal y mutado. Para identificar el receptor se utilizó anticuerpo anti:Flag. El peso molecular de los mutantes es evidentemente menor indicativo de la no maduración de las mutantes. Como control de carga se utilizó anti:actina. C) Ensayo de transcitosis en células MDCK que expresan el receptor normal o mutado en el motivo LL localizado en la tercera asa intracelular. La mutación del motivo dileucina no afecta la localización apical del DOR, ni tampoco la localización basolateral al ser estimulado con DADLE 5 μM por 1h. Barra, 10 μm.

6.6 Análisis de la ruta intracelular del DOR en la vía de transcitosis basolateral

Las proteínas internalizadas desde el polo apical o basolateral pueden encontrarse colocalizando en un compartimento perinuclear que por esta razón se ha denominado endosomas de reciclaje común, CRE (Brown et al 2000). Incluso las rutas de transcitosis opuestas de los receptores de plgA y FcRn coincidirían en este compartimento (Jerdeva et al 2010). Por lo tanto, intentamos definir si el DOR ocuparía esta misma ruta a través de CRE para transitar desde el polo apical al basolateral.

La mayor dificultad en este tipo de experimentos es la carencia de un marcador del CRE en células MDCK. Estas células no incorporan bien la transferrina humana que generalmente se utiliza para marcar endosomas de reciclaje. Consideramos que el adaptador AP1B podría ser utilizado para informar sobre el paso de proteínas a través del CRE, tal como se ha descrito en la ruta biosintética (Cancino et al 2007, Gravotta et al 2007). Estudios recientes muestran que el adaptador AP1B y la forma ubicua AP1A participan en la destinación de proteínas basolaterales (Almomani et al 2012, Gravotta et al 2012, Guo et al 2013) y ambos estarían tanto en el TGN como en el CRE (Guo et al 2013). Como contamos con una línea de MDCK estables para la subunidad u1A acoplada a GFP (MDCK u1A-GFP) (Donada por Juan Bonifacino, NIH), decidimos intentar transfectarlas doblemente para expresar el DOR de manera permanente, utilizando otro sistema de selección. Logramos obtener una línea estable transfectando con el plasmidio

para DOR que provee resistencia a G418, en cambio la expresión de u1A-GFP utiliza puromicina como selector (Fig. 11A).

En estas células MDCK-u1A-GFP-DOR hicimos el ensayo de transcitosis marcando el DOR con anticuerpos anti-Flag en la superficie apical y luego adicionando DADLE 5 μ M por diferentes tiempos. Mediante inmunofluorescencia confocal cuantificamos el índice de colocalización (Índice de Manders) entre el DOR y la subunidad u1A-GFP a los diferentes tiempos considerando todos los planos de la célula. El DOR aumentó aproximadamente tres veces su colocalización con u1A-GFP alrededor de los 15 min de estimulación con DADLE, disminuyendo luego aumentando nuevamente hacia los 60 min (Fig. 11B). Estos resultados sugieren que el DOR utiliza la vía del CRE en su tránsito desde el polo apical al basolateral y luego de llegar a la superficie basolateral parece alcanzar nuevamente este compartimento.

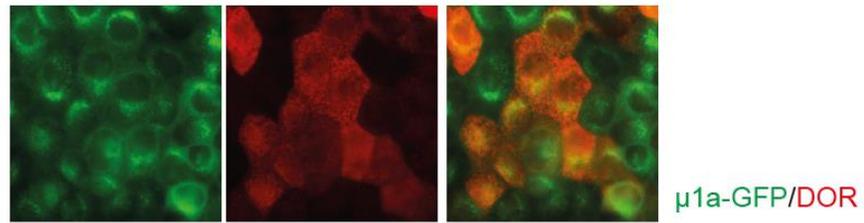
El plgR, en su ruta desde el polo basolateral al apical, luego del paso por el CRE pasa por un compartimento sub-apical, denominado ARE, antes de su arribo a la superficie apical (Brown et al 2000, Lencer & Blumberg 2005). Este compartimento, enriquecido en la GTPasa Rab11, fue inicialmente caracterizado por regular el tráfico biosintético y endocítico de proteínas apicales (Brown et al 2000). También se ha propuesto que la E-caderina pasaría por el ARE en su ruta biosintética hacia el polo basolateral (Desclozeaux et al 2008, Lock & Stow 2005). Por lo tanto, estudiamos si el DOR utiliza también este compartimento ARE en su ruta transcitótica apical-basolateral.

Para evaluar la contribución del compartimento ARE-Rab11 en la ruta basolateral del DOR transfectamos células MDCK-DOR con un dominante negativo

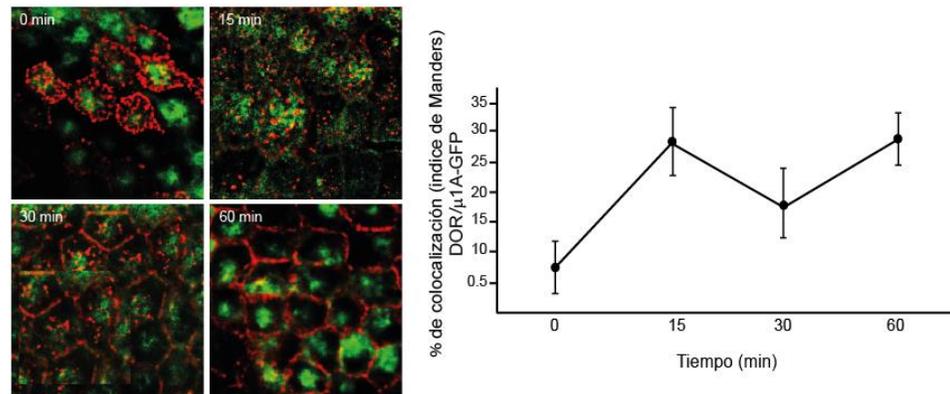
de Rab11 acoplado a GFP. Este dominante negativo Rab11-GFPS25N contiene una mutación puntual en el sitio de unión a GTP que lo deja permanentemente en su estado inactivo unido a GDP (Ren et al 1998). Se ha descrito que la expresión de esta mutante redistribuye la E-caderina al polo apical en células MDCK (Lock & Stow 2005).

Transfectamos transientemente las células MDCK-DOR con Rab11-GFPS25N en placas de cultivo y luego de 24 h se traspasaron a cámaras Transwell y se cultivaron por 4 días para lograr confluencia y realizar el ensayo de transcitosis. Aunque detectamos claramente expresión de Rab11-GFPS25N por la fluorescencia verde en alrededor de 30% de las células, no vimos un efecto sobre la transcitosis apical-basolateral del DOR en estas células (Fig. 11C). Estos resultados sugieren que la ruta del transcitosis del DOR no incluiría al compartimento ARE-Rab11. Sin embargo, no podemos descartar que los niveles de expresión del Rab11-GFPS25N no hayan sido suficientes para desplazar la función del Rab11 endógeno. Además, en ciertas células se visualiza un compartimento subapical con DOR que tiene las características del ARE-Rab11. Se necesitan más experimentos para definir este aspecto.

A.



B.



C.

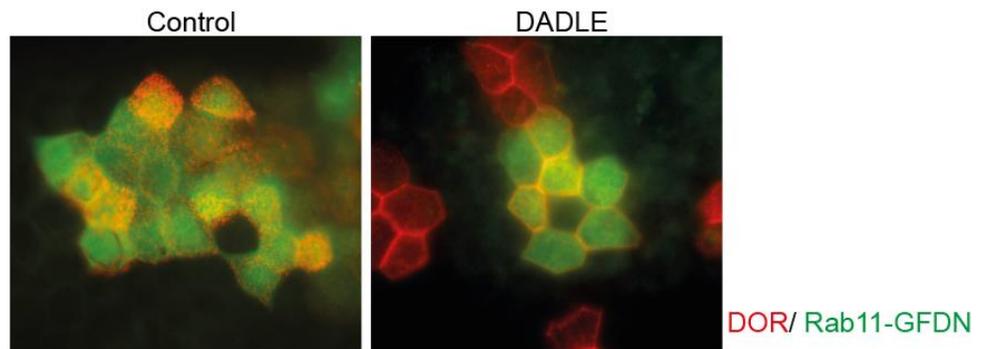


Figura 11. Compartimentos intracelulares de la ruta de transcitosis del DOR. A) Imagen de células MDCK estables para la subunidad u1a-GFP y el DOR. B) Gráfico del porcentaje de pixeles del DOR colocalizando con u1a-GFP a distintos tiempos de incubación con DADLE 5 μ M. Para cada punto se cuantificó un promedio de 20 células. Barras corresponden a la desviación estandar. C) Ensayo de transcitosis en células MDCK-DOR transfectadas con el dominante negativo Rab11-GFPS25N.

6.7 El complejo AP1B no se requiere en el tráfico apical-basolateral del DOR

Son varias las proteínas que contienen señales de destinación basolateral que no coinciden con los motivos basados en tirosina y leucina. El ejemplo más estudiado es el del receptor de transferrina que tiene una señal no clásica del tipo GDNS (Odorizzi & Trowbridge 1997). El tráfico basolateral de la transferrina, al igual que el de la VSVG que tiene una señal basolateral canónica tipo YxxF, es dependiente del adaptador AP1B, revisado en González y Rodriguez-Boulan, 2009. Por lo tanto, evaluamos la posibilidad de que la transcitosis del DOR dependa de AP1B.

En el laboratorio contamos con una línea de células MDCK establemente silenciada por shRNA para la subunidad u del complejo AP1B (MDCK-u1BKD), donada por Enrique Rodriguez-Boulan (Cornell University, USA). Para corroborar el silenciamiento de la subunidad u1B inmunoprecipitamos el complejo AP1 utilizando un anticuerpo comercial contra la subunidad γ (subunidad presente únicamente en el complejo AP1) y posteriormente realizamos un inmunoblot con un anticuerpo propio contra la subunidad u1B (Cancino et al 2007). En las células silenciadas observamos una disminución en la masa de la banda correspondiente a la subunidad u1b (Fig. 12A).

Estas células MDCK-u1BKD fueron transfectadas establemente con el plasmidio de expresión del DOR y por biotinylation dominio selectiva corroboramos la distribución preferencialmente apical de este receptor (Fig. 12B). Luego realizamos el experimento de estimulación con el ligando del DOR y observamos transcitosis apical-basolateral al igual que en las MDCK-DOR controles. Esto indica que el AP1B no está involucrado en la ruta de transcitosis apical-basolateral del DOR.

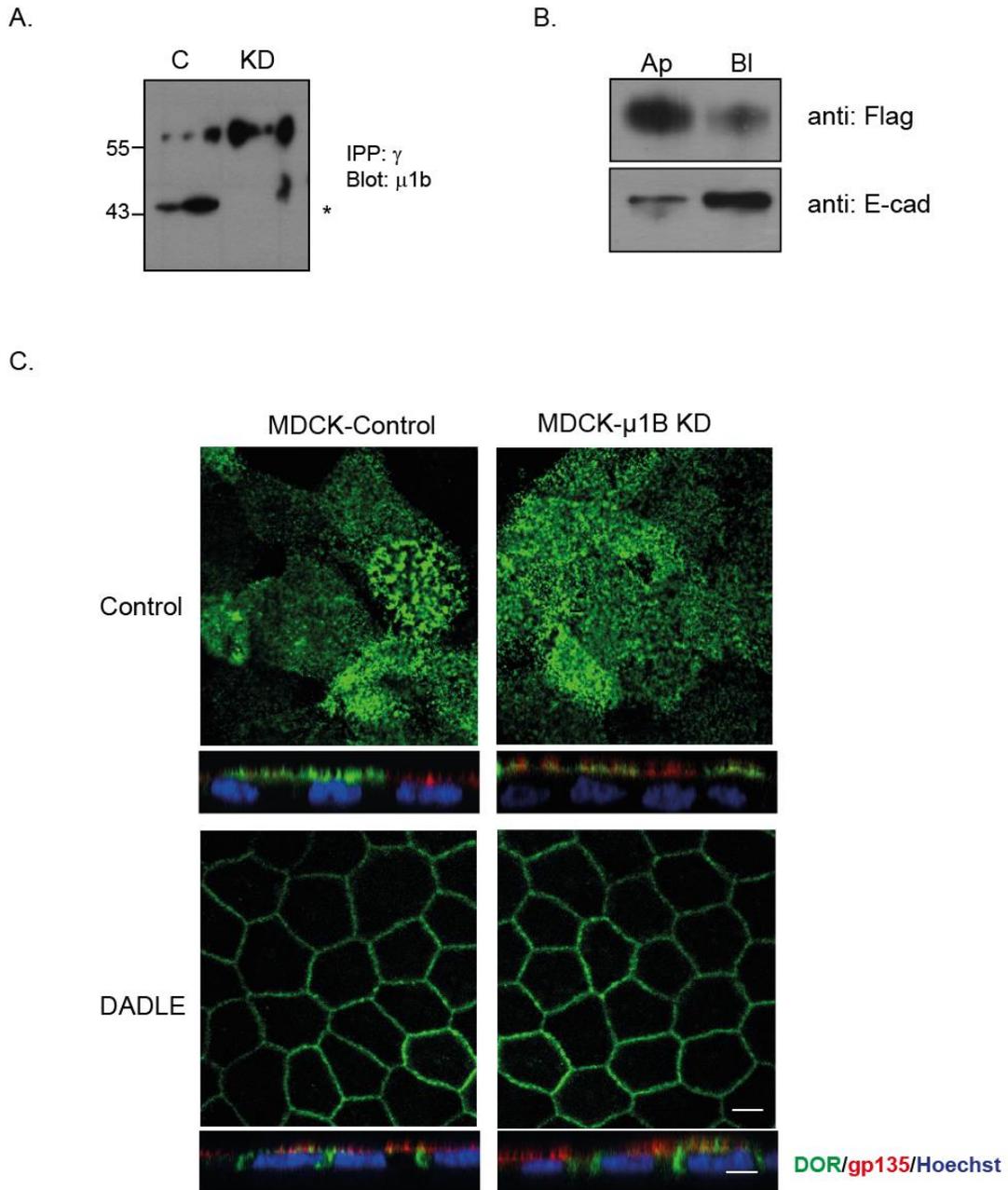


Figura 12. El complejo AP1B no participa en el tráfico apical-basolateral del receptor del DOR. A) Inmunoprecipitación del complejo AP1 con un anticuerpo contra la subunidad γ e inmunoblot contra la subunidad μ 1B. La banda correspondiente a la μ 1B se muestra con asterisco. B) Biotinilación dominio selectiva de células MDCK- μ 1B KD transfectadas permanentemente con el DOR. Inmunoblot contra el epítipo Flag y como control de selectividad usamos anticuerpo anti-E-caderina. C) Ensayo de transcitosis apical-basolateral en MDCK controles y μ 1B KD e inmunofluorescencia con la proteína apical endógena gp135, también se incluye la tinción nuclear de Hoechst. Barra de imagen de campo y corte ortogonal corresponden a 10 μ m y 5 μ m respectivamente.

6.8 Rol del citoesqueleto en la transcitosis apical-basolateral del DOR

Varios estudios muestran un requerimiento de microtúbulos en la transcitosis basolateral-apical de distintas proteínas (Breitfeld et al 1990, Burgos et al 2004, Hunziker et al 1990, Yui et al 2013). Nuestro laboratorio describió que el receptor SRBI de lipoproteínas HDL hace transcitosis basolateral-apical inducida por forskolin (FSK) en una ruta que depende de microtúbulos (Burgos et al 2004). En esta tesis utilizamos este receptor SRBI como control positivo para analizar la función de microtúbulos en la transcitosis apical-basolateral del DOR.

Transfectamos de manera permanente células MDCK con el plásmido del receptor SRBI acoplado a GFP en su extremo carboxilo (SRBI-GFP). Estas células MDCK-SRB1-GFP, cultivadas a confluencia sobre cubre objetos de vidrio, mostraron una distribución predominantemente basolateral del SRBI en condición control (Fig. 13). Al tratarlas con FSK 5 μ M por 1 h observamos redistribución hacia el polo apical, tal como se ha descrito (Burgos et al 2004). Esta redistribución se inhibió completamente al pretratar las células con nocodazol (Fig.13). El nocodazol se une a la β -tubulina previendo la formación del dímero con la α -tubulina de manera reversible (Grindstaff et al 1998). En estas mismas condiciones, pero con las células cultivadas en filtro, no vimos efecto del nocodazol sobre la transcitosis del DOR (no se muestra).

Para hacer más extrema las condiciones de despolimerización de microtúbulos mantuvimos las células MDCK-DOR por 2 h en agua-hielo en presencia de nocodazol (33 μ M) o de colchicina (10 μ M). La colchicina, a diferencia

del nocodazol, actúa uniéndose al heterodímero soluble de tubulina previniendo la polimerización de los microtúbulos, y es irreversible. Realizamos el marcaje del DOR en la superficie apical con anti:Flag y tratamos la células con DADLE en presencia o ausencia de los inhibidores. No vimos diferencias entre las células controles y las tratadas con las drogas depolimerizantes de microtúbulos sobre la transcitosis apical-basolateral del DOR (Fig. 14A). Los niveles de colocación del DOR cuantificados respecto de la marca con estreptavidina-Alexa 568 del polo basolateral previamente biotinilado fueron similares (Fig. 14B). Estos resultados sugieren que la ruta de transcitosis apical-basolateral es independiente de microtúbulos, contrastando con la ruta inversa basolateral-apical.

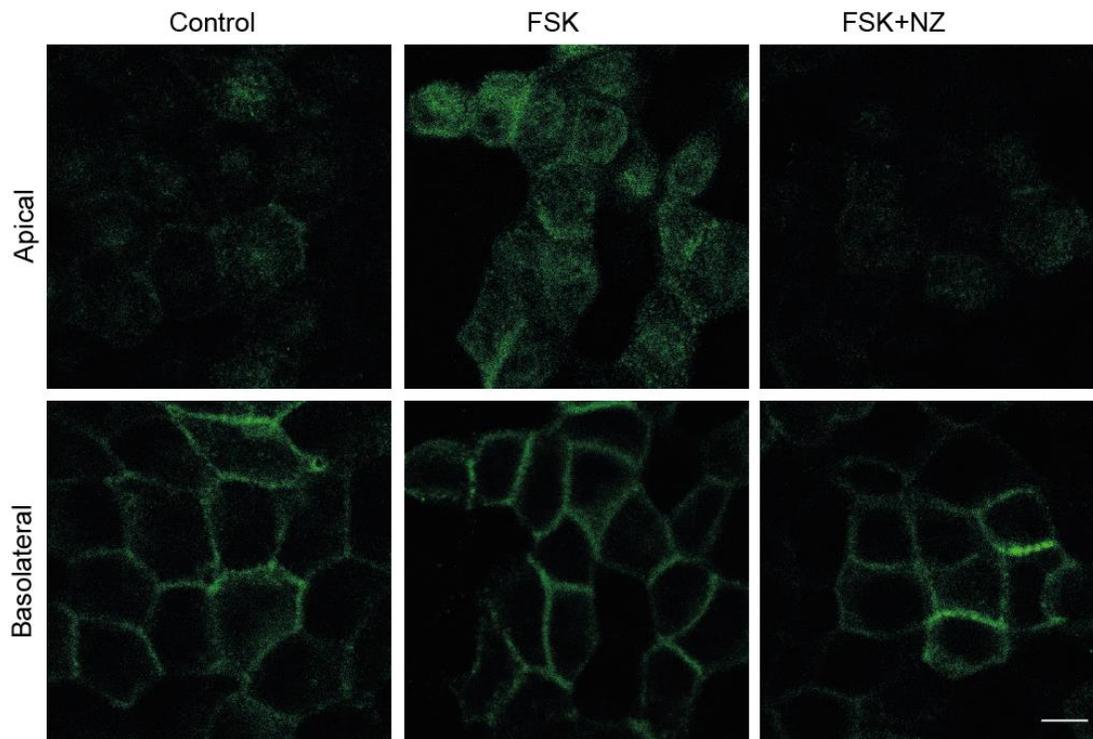


Figura 13. Transcitosis basolateral-apical del receptor SRB1 es dependiente de microtúbulos. Células MDCK transfectadas establemente con el cDNA del receptor SRI-GFP fueron sembradas en filtro y mantenidas en cultivo hasta su completa polarización. Previo a la inducción de la transcitosis con forskolin (FSK) las células fueron tratadas con nocodazo (NZ) a 4°C durante 2 h. Luego las células fueron tratadas con FSK 5µM en presencia de cicloheximida por 1 h. Barra corresponde a 5 µm.

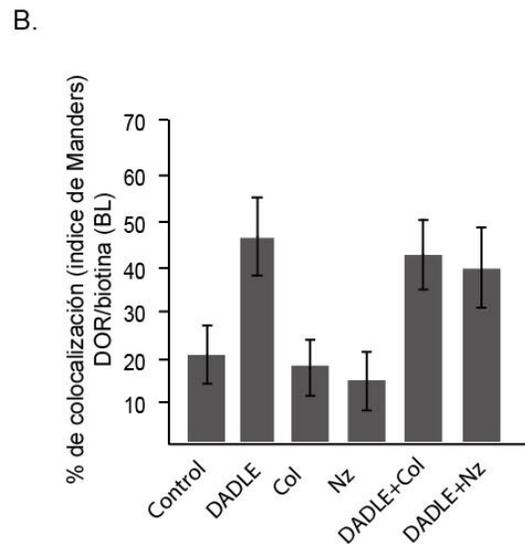
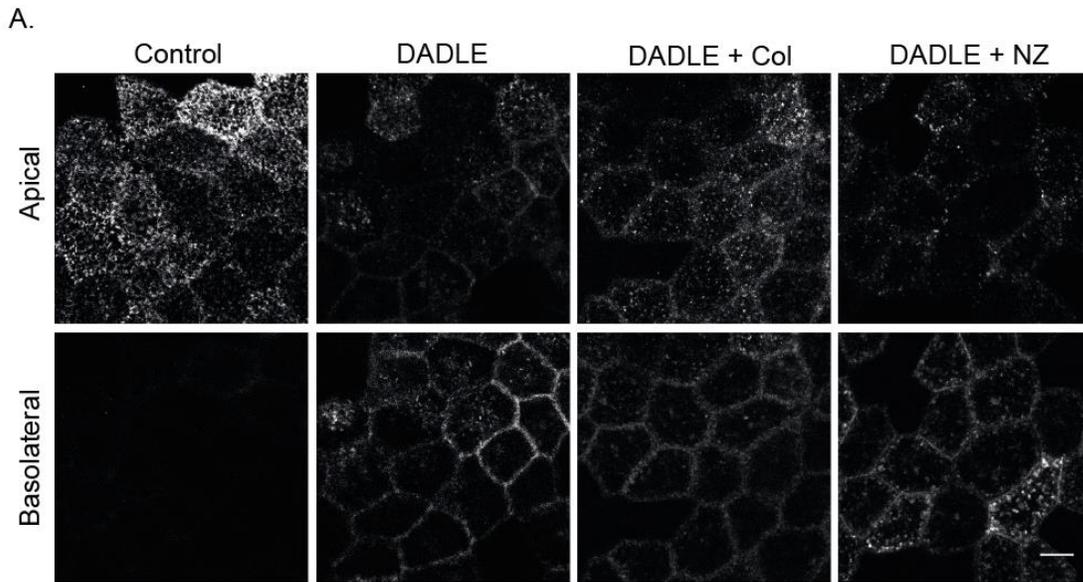


Figura 14. Contribución del citoesqueleto de microtúbulos en la transcitosis apical-basolateral del DOR. MDCK-DOR fueron sembradas en filtro y mantenidas en cultivo por cuatro días permitiendo que polaricen. Previo al ensayo de transcitosis la placa de células MDCK-DOR fue suspendida por 2 h en agua-hielo en presencia de nocodazol (Nz) 33 μ M y colchicina (Col) 10 μ M para permitir la completa depolimerización de los microtúbulos. Terminado el tratamiento las células fueron biotiniladas por apical o basolateral, fijadas y marcadas con anit:Flag y estreptavidina Alexa 568. Barra corresponde a 10 μ m. B) Gráfico que representa el porcentaje de colocación del DOR con la biotina/estreptavidina basolateral (BL). Las barras representan la desviación estándar. Por cada condición se cuantificó un promedio de 15 células.

En sistemas polarizados algunos autores han descrito que la endocitosis apical es sensible a la disrupción del citoesqueleto de actina (Gottlieb et al 1993, Jackman et al 1994, Maples et al 1997, Shurety et al 1996). Por lo tanto, probamos el efecto de dos drogas que afectan la estructura del citoesqueleto de actina, la latrunculina A, molécula permeable que secuestra los monómeros de actina y en consecuencia depolimeriza los microfilamentos (Gronewold et al 1999) y la citocalasina D, que se une al filamento de actina bloqueando la incorporación de nuevos monómeros (Cooper 1987).

Sin embargo, al cotratar con latrunculina A (0.17 μ g/mL) vimos que el DOR se endocita desde el polo apical pero no llega a la superficie basolateral, quedando retenido en vesículas intracelulares (Fig. 15A). Inesperadamente, al co-tratar las células MDCK-DOR con agonista DADLE y más citocalasina D (1 μ g/mL) hubo transcitosis tal como en las células controles. El análisis por microscopía confocal, luego de biotinilar la superficie apical y marcarla con estraptavidina-Alexa-558, mostró que estas vesículas se localizan bajo la superficie apical (Fig. 15C). La cuantificación mostró que el cotratamiento con latrunculina A no afectó la endocitosis. Observamos una disminución de la colocalización del DOR con la estraptavidina-Alexa-568, desde un 55% a un 30%, similar al de las células tratadas solo con DADLE (Fig.15B). En cambio, en presencia de latrunculina A observamos sólo un 20% de colocalización con la marca de estraptavidina-Alexa-568 basolateral, contrastando con el 55% de localización en la condición control solo con DADLE (Fig. 15B).

El efecto de los inhibidores sobre la arquitectura del citoesqueleto de actina lo corroboramos utilizando falloidina acoplada a Alexa 594 (Fig. 15D). Una hora de

tratamiento con latrunculina A a 37°C hace desaparecer los bordes laterales de actina, así como también los delgados filamentos que se alinean paralelos a la membrana basal. El efecto de la citocalasina D aparentemente es menos dramático aunque igual se aprecia una pérdida en los filamentos basales y un aumento de la actina en los bordes basolaterales, similar a lo descrito por otros autores (Sheff et al 2002)

Estos resultados indican que la actina no sería requerida para la endocitosis apical del DOR, contrastando con otras proteínas (Gottlieb et al 1993, Jackman et al 1994, Maples et al 1997, Shurety et al 1996), pero sí se necesitaría para una etapa posterior de transporte hacia el polo basolateral.

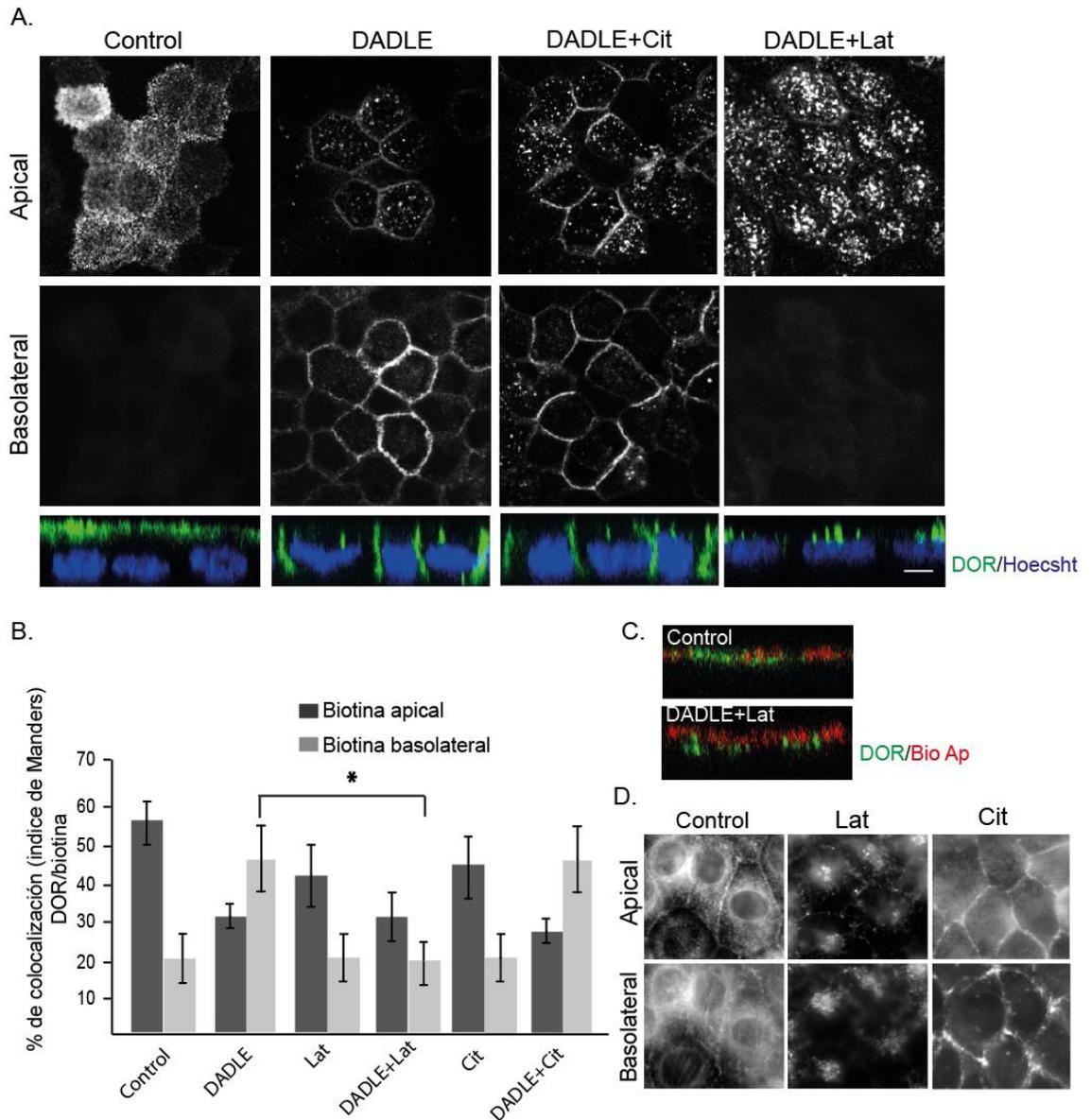


Figura 15. Efecto de los inhibidores de la dinámica del citoesqueleto de actina sobre la transcitosi apical-basolateral del DOR. MDCK-DOR fueron sembradas en filtro y mantenidas en cultivo por cuatro días permitiendo que polaricen. La superficie apical de las células fue marcada con anti:Flag y luego se trataron con agonista DADLE en presencia de latrunculina A (Lat) 0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o citocalacina D (Cit) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Terminado el tratamiento las células fueron biotiniladas por apical o basolateral y luego fueron fijadas y marcadas con estreptavidina Alexa 568 junto con el anticuerpo secundario. A) Imagen confocal de un plano apical y otro basolateral en cada una de las condiciones. Barra corresponde a 10 μm . El panel inferior muestra un corte ortogonal donde se incluye la tinción nuclear de Hoechst. Barra corresponde a 5 μm . B) Cuantificación de A, el asterisco corresponde a un valor de $p < 0.01$. C) Sección confocal de las células biotiniladas por apical donde se muestra el plano subapical de las vesículas en la condición DADLE más Lat. D) Tinción con falloidina Alexa 568 en las células MDCK-DOR en situación control o tratadas con Lat o Cit en un plano apical y basolateral.

Los receptores de opioides interactúan con proteína G inhibitorias sensibles al bloqueo por la toxina pertussis (Chakrabarti et al 1995, Laugwitz et al 1993, Prather et al 1994). Esta toxina ADP-ribosila la subunidad α de la proteína G, permaneciendo en su estado inactivo unida a GDP impidiendo la inhibición de la adenilato ciclasa (Burns et al 1988).

Para evaluar la contribución de la proteína G inhibitoria a la ruta de transcitosis del DOR tratamos células MDCK-DOR por 24 h con la toxina pertussis 0.1 ng/mL y luego realizamos el experimento de transcitosis por inmunofluorescencia (Fig 16). En las células tratadas con el agonista DADLE más la toxina pertussis observamos borde basolateral reflejo de transcitosis apical-basolateral, sin embargo hay marca del DOR en el polo apical producto del bloqueo de la endocitosis.

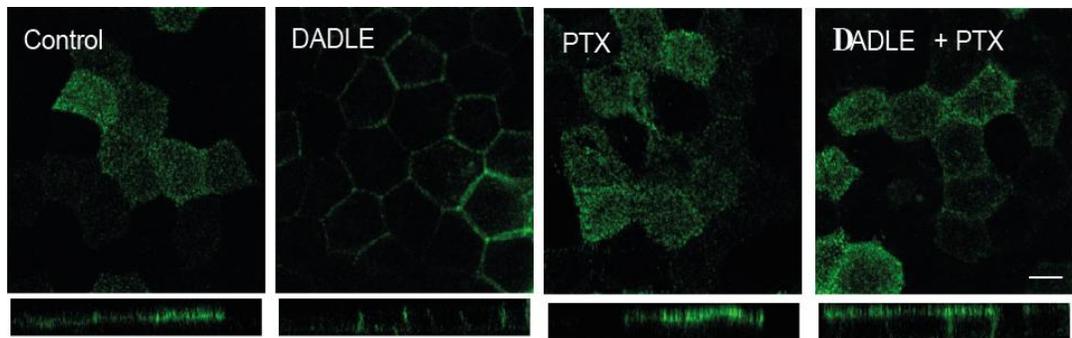


Figura 16. La toxina pertussi bloquea parcialmente la endocitosis apical del DOR. MDCK-DOR fueron pre-tratadas con la toxina pertussis (0.1 ng/mL) por 24 h. Luego las células fueron tratadas con agonista DADLE por 1h en presencia ausencia de la toxina y procesadas para inmunofluorescencia. Imagen representativa, n=4. Barra 10 μ m.

7. Discusión

En esta tesis utilizamos el DOR como modelo de proteína para estudiar una ruta de tráfico desde el polo apical hacia el polo basolateral que sería regulada en células epiteliales MDCK polarizadas. Primero realizamos experimentos que lograron determinar que el DOR destinado inicialmente al polo apical hace realmente transcitosis, insertándose en la membrana plasmática basolateral cuando es estimulado por su agonista. Luego analizamos la ruta de transcitosis enfocándonos en la posibilidad que el DOR entrara transitoriamente al CRE. Los resultados nos llevaron a plantear la existencia de señales de destinación apical y basolateral en el DOR, que intentamos dilucidar mediante experimentos de mutación sitio dirigida basándonos en señales conocidas. Finalmente analizamos la función del citoesqueleto en la ruta de transcitosis del DOR, tomando en cuenta la primera etapa endocítica y luego su transporte hacia el polo basolateral. La discusión termina con una proyección hacia las rutas utilizadas en neuronas y una comparación de la ruta de transcitosis del DOR con las de otras proteínas, concluyendo que nuestros resultados contrastan con reportes previos y por lo tanto evidencian la existencia de una ruta no descrita previamente.

7.1 Evidencias de transcitosis apical-basolateral del DOR

Esta tesis se basó en una observación previa realizada en el laboratorio, donde se vio un cambio de distribución de los receptores opioides desde el polo apical hacia el polo basolateral de las células MDCK al ser estimulados con ligando (tesis doctoral de Fabiola Sánchez). Esto sugería la existencia de una ruta de transcitosis apical-basolateral regulada que no se había descrito hasta el momento.

Sin embargo, las técnicas disponibles no habían logrado demostrar que estos receptores provenientes del polo apical se insertaran en la superficie basolateral, como se requiere en un proceso de transcitosis.

Al igual que en la tesis de FS, con la estrategia de la biotinylación dominio selectiva no logramos detectar aparición del DOR en la superficie basolateral. Descartamos que esto se debiera a degradación del DOR. Como una nueva estrategia adecuamos la inmunofluorescencia indirecta para detectar al DOR en la superficie apical y basolateral. Primero marcamos las células vivas con anti:Flag que reconoce este epítipo en el DOR apical, y luego de fijar las células, adicionamos el anticuerpo secundario por el basolateral. Con esta técnica observamos que aparece marca del complejo DOR-anti:Flag en la superficie basolateral al ser estimulado con su agonista. Este resultado constituyó la primera evidencia de una inserción del DOR proveniente del polo apical en la membrana plasmática basolateral. Luego obtuvimos evidencia adicional con un protocolo de biotinylación eliminable por reducción por glutatión. El DOR biotinylado en la superficie apical perdió biotina al reducirse desde el polo basolateral indicando su aparición en este polo al estimularlo con agonista. Estos dos ensayos dieron clara evidencia de transcitosis apical-basolateral del DOR inducida por agonista.

Además, implementamos una técnica para cuantificar mediante inmunofluorescencia la transcitosis del DOR, incorporando una marca fluorescente de estreptavidina-Alexa568 a la superficie basolateral previa biotinylación de esta superficie. Esta técnica junto con el ensayo de marcaje anti:Flag del DOR en la superficie apical de células vivas nos permitió cuantificar, mediante análisis de

colocalización con Alexa568, la cantidad relativa del DOR que aparece en el polo basolateral, a la vez que desaparece del polo apical.

Estos experimentos demostraron que el DOR aparece en la superficie basolateral dentro de 30 min después de estimular con ligando por el polo apical. Además, utilizamos este tipo de análisis de colocalización para estudiar la transcitosis del DOR en distintas condiciones experimentales.

7.2 Ruta intracelular de la transcitosis apical-basolateral del DOR

7.2.1 La transcitosis apical-basolateral del DOR involucra un tránsito por el CRE.

Uno de los problemas que enfrentamos al realizar los experimentos de transcitosis mediante inmunofluorescencia era que no observábamos vesículas intracelulares que dieran cuenta del transporte del DOR desde el polo apical hacia el basolateral. Lo primero que hicimos fue descartar que la redistribución del DOR se debiera a un fenómeno de difusión lateral debido a la apertura de las uniones estrechas como consecuencia del tratamiento con agonista opioide. Realizamos un ensayo de permeabilidad a inulina desde el compartimento apical al basolateral, donde se descartó que la activación del DOR en células MDCK perturbara la integridad de las uniones estrechas.

La no detección de vesículas intracelulares nos obligó a cambiar el protocolo de permeabilización de membrana que inicialmente incluía permeabilizar con Tritón X100 0.2% a usar saponina 0.05% que extrae el colesterol de las membranas haciendo hoyos en la misma (Goldenthal et al 1985). Este cambio nos permitió por

primera vez visualizar vesículas transcitóticas positivas para el DOR para así poder evaluar la ruta intracelular que sigue este receptor mediante inmunofluorescencia

El CRE es un compartimento donde se encuentran proteínas que son endocitadas desde el polo apical o basolateral (Brown et al 2000). Incluso las rutas de transcitosis opuestas de los receptores de plgA y FcRn coinciden en este compartimento (Jerdeva et al 2010). Por lo tanto, estudiamos si el DOR ocupa el CRE durante su tráfico intracelular desde el polo apical al basolateral. Para esto utilizamos AP1A-GFP como marcador del CRE, que además marca TGN según una publicación reciente (Guo et al 2013).

En células MDCK estables para la subunidad u1A acoplada a GFP (MDCK u1A-GFP) transfectamos establemente el DOR. Los ensayos de transcitosis por inmunofluorescencia y el análisis confocal indicaron que el DOR utiliza el compartimento CRE para transitar desde el polo apical hacia el basolateral después de estimulación con agonista.

Este resultado coincide con lo descrito para la ruta apical-basolateral del FcRn. Este receptor expresado en células MDCK pasaría por el CRE, identificado por su contenido de transferina y TfR, en su ruta de transcitosis constitutiva bidireccional (Tzaban et al 2009). También el plgR en su transcitosis basolateral-apical (Brown et al 2000, Jerdeva et al 2010). En células derivadas de placenta que expresan endógenamente el FcRn y endocitan IgG desde el polo apical se ha observado que esta proteína pasa por un compartimento intracelular positivo para el receptor de transferrina, que presumiblemente correspondería al CRE, durante su transcitosis (Leitner et al 2006). La diferencia es que el DOR entra a una ruta de transcitosis apical-basolateral regulada, que sin embargo también utilizaría el CRE

como compartimento intermediario, desde donde podría ser finalmente destinado al polo basolateral, tal como lo hace el TfR (Brown et al 2000).

Además, como generalmente detectamos vesículas que contienen DOR en la región subapical analizamos si el DOR utilizaría también el compartimento subapical ARE-Rab11 en su ruta de transcitosis. El ARE-Rab11, es otro compartimento que participa en la ruta de transcitosis apical-basolateral del pIgR y que además ha sido involucrado en la destinación basolateral al menos de E-caderina (Casanova et al 1999, Desclozeaux et al 2008, Lock & Stow 2005, Wang et al 2000a).

Utilizamos un dominante negativo de Rab11-GFP expresado por transfección transciente pero no logramos ver diferencias de transcitosis del DOR entre las células que expresaban o no el dominante negativo. Esto concuerda con los resultados de Tzaban y cols. que describieron que la transcitosis bidireccional del FcRn es indiferente al silenciamiento de Rab 11.

Nuestros resultados y los antecedentes descritos respaldan la idea de que el CRE es una estación común para proteínas que siguen una ruta de transcitosis apical-basolateral como el DOR, mientras que el compartimento ARE-Rab-11 parece no estar involucrado en esta ruta, aun cuando participa de la ruta basolateral-apical del pIgR (Brown et al 2000).

7.2.2 La transcitosis apical-basolateral del DOR es independiente del complejo AP1B

En células MDCK que tienen silenciada la subunidad u1B del complejo AP1B vimos que la estimulación del DOR con su agonista induce su transcitosis desde el

polo apical al basolateral similar a las células MDCK nativas. Hay varios ejemplos de proteínas que son destinadas basolateralmente de manera independiente de AP1B, incluyendo al receptor FcRII-B2 (Roush et al 1998), E-caderina (Miranda et al 2001), CD147 (Deora et al 2004) y anfiregulina (Gephart et al 2011), todas ellas con señales de destinación basolateral basadas en leucina. Otras proteínas, tales como la VSVG, LDLR, y el intercambiador anionico de riñón (Almomani et al 2012, Gravotta et al 2012), parecen depender tanto de AP1A como de AP1B para su correcta destinación basolateral, puesto su pérdida de polaridad es mayor cuando se silencian estas dos isoformas de AP1.

Otro adaptador que podrían reconocer las señales basolaterales del DOR y acoplarlo a la maquinaria de transporte vesicular con destinación basolateral es el complejo adaptador AP4, que se diferencia de los otros miembros por carecer de un dominio de interacción con clatrina (Hirst et al 1999). Experimentos de doble híbrido describen que la subunidad u4 de este adaptador interactuaría con la señal basolateral del LDLR y su silenciamiento lleva a deslocalizar al LDLR hacia el polo apical (Simmen et al 2002). Sin embargo, el papel de AP4 en la destinación basolateral es tema de controversia (Gonzalez & Rodriguez-Boulan 2009). La sortinexina-17, es un adaptador monomérico que reconoce señales basadas en tirosina del receptor LRP1 y es determinante en el reciclaje basolateral en células MDCK y somatodendrítico en neuronas hipocampales (Donoso et al 2009).

7.3. Búsqueda de las señales de tráfico apical y basolateral del DOR

La distribución apical del DOR y su transcitosis al polo basolateral indican que esta proteína contiene señales de destinación polarizada. La señal apical sería decodificada durante el tráfico biosintético del DOR, puesto que no observamos transcitosis desde el polo basolateral al apical. En cambio, la destinación basolateral probablemente se exprese durante su tráfico en la ruta de transcitosis, ya que obtuvimos evidencias de su paso por el CRE, desde donde emergen rutas hacia el polo apical (Gonzalez & Rodriguez-Boulán 2009).

7.3.1 Destinación apical del DOR: Posibles señales

La distribución apical del DOR en células MDCK es coherente con la distribución de los receptores opioides μ y κ que se expresan endógenamente en ciertas células epiteliales, tales como las células Caco-2 (Neudeck et al 2003, Neudeck & Loeb 2002).

La N-glicosilación se ha propuesto como una señal apical común a muchas glicoproteínas (Rodriguez-Boulán & Gonzalez 1999). También se ha propuesto que esta señal sería decodificada por un sistema dependiente de las llamadas balsas lipídicas (Helms & Zurzolo 2004, Simons & Ikonen 1997) o por galectinas tales como Gal-4 (Delacour et al 2005) y Gal-9 (Mishra et al 2010)

Para determinar si la distribución apical de DOR está determinada por N-glicosilación realizamos mutaciones sitio dirigidas para reemplazar las asparraginas N₁₈ y N₃₃ por alanina. Estos son los dos únicos sitios de N-glicosilación de DOR.

Como se ha descrito para numerosos mutantes de glicoproteínas (Fiedler & Simons 1995), estos mutantes N₁₈A y N₃₃A y también la doble mutante fueron en su mayor parte retenidos en el RE. Sin embargo, en algunas células logramos detectar DOR en la superficie apical, indicando que ésta no depende de N-glicosilación.

Si bien la N-glicosilación es esencial para la destinación apical de una variedad de proteínas de membrana y de secreción, como por ejemplo la endolina y la eritropoyetina respectivamente (Kitagawa et al 1994, Potter et al 2004). También hay varios ejemplos de proteínas de membrana apicales cuya destinación es independiente de los N-glicanes, tal es el caso de canal de potasio Maxi K (Bravo-Zehnder et al., 2000), el transportador de nucleósido selectivo de purinas dependiente de sodio (SPNT) (Mangravite & Giacomini 2003). Proteínas de secreción como la proteína de envoltura del virus de la B y la globulina de unión a cortisoesteroides no pierden su polaridad apical al impedirse la N-glicosilación (Larsen et al 1999, Marzolo et al 1997, Trischler et al 2001) . Hay proteínas apicales que normalmente no son glicosiladas, como CD3-epsilo y la cromagranina (Alonso, Fan, & Alarcón, 1997; Kühn, Cohn, & Gorr, 2000).

Por otro lado, se han descrito glicoproteínas que se secretan sin polaridad en células epiteliales, tales como la proteína CD7 (Haller y Alper 1993) y versiones mutadas de la hemaglutinina del virus influenza y la VSVG (Gonzalez et al 1987). Por lo tanto, el mecanismo de destinación apical y su dependencia de glicosilación todavía no ha sido aclarado. Una hipótesis que reúne varios de los elementos descritos es que la agregación de proteínas en el TGN, promovida ya sea por glicanos o por interacciones proteína-proteína o por regiones enriquecidas en colesterol, determine la entrada hacia rutas de destinación apical (Imjeti et al 2011).

Los GPCR que son apicales y cuya señal de destinación ha sido estudiada, incluye la rodopsina (Chuang & Sung, 1998), el receptor de serotonina 5-HT (Jolimay et al 2000) y el receptor metabotrópico de glutamato 1b (Francesconi & Duvoisin 2002) contienen señales peptídicas localizadas en el extremo carboxilo terminal pierden su polaridad apical al mutarse estas señales, aún cuando tengan sitios de N-glicosilación, como es el caso de la rodopsina (Chuang & Sung, 1998). Por lo tanto, hay antecedentes de la existencia de señales apicales en GPCR independientes de la N-glicosilación, que podrían ser determinantes en la polaridad apical del DOR.

Al contrario de los otros GPCR mencionados, el DOR no parece contener su señal apical en el extremo carboxilo terminal. Esto se demostró en la tesis doctoral de FS construyendo un DOR truncado en su extremo carboxilo terminal, que sin embargo fue destinado al polo apical.

Las O-glicosilaciones también se han propuesto como una señal para el transporte apical de proteínas, como es el caso del receptor de neurotrofinas p75, la sucrosa isomaltasa intestinal y la dipeptidil peptidasa IV (Alfalah et al., 1999; Yeaman et al., 1997). El DOR está entre los pocos miembros de la familia de los GPCR descritos que contienen esta modificación (Petaja-Repo et al 2000), junto con el receptor de vasopresina y la rodopsina (Sadeghi & Birnbaumer 1999), pero se desconoce el sitio de O-glicosilación en esta proteína.

Sería interesante de evaluar en el futuro, con nuestras mutantes, cuál es la función de la N-glicosilación en la ruta de transcitosis. Mutaciones que eliminan artificialmente el motivo principal de N-glicosilación del pIgR dificulta su transporte basolateral-apical (Luton, Hexham, Zhang, & Mostov, 2009). El receptor FcRn

humano contiene en su dominio extracelular solo un motivo de N-glicosilación, mientras que su homólogo murino contiene cuatro sitios. Esta diferencia hace que el receptor FcRn murino se exprese mayormente en la superficie apical y favorece el transporte apical-basolateral de la IgG. Estas diferencias son traspasadas al receptor humano al adicionarle motivos de N-glicosilación en su secuencia (Kuo et al., 2009). Otro ejemplo del papel regulatorio de la N-glicosilación en la ruta de transcitosis es la proteína transmembrana NPP3. Esta proteína se expresa en el dominio apical de células MDCK y Caco-2 pero un 50 % de la proteína llega al polo apical por una ruta de transcitosis basolateral-apical. La remoción de los residuos glicosilados con tunicamicina no afecta su distribución apical pero si reduce el transporte vía transcitosis (Meerson et al., 2000). Finalmente, la transcitosis basolateral-apical que ocurre en el receptor de transferrina cuando se sobreexpresa en células que carecen de AP1B depende de Gal-4, sugiriendo que requiere de glicosilación (Perez Bay et al 2013).

7.3.2 Análisis de las señales basolaterales en el DOR

El descubrimiento del paso del DOR por el compartimento CRE, lugar donde se segregan proteínas con destino apical y basolateral, implica que el DOR para salir del CRE con destinación basolateral requiere de la decodificación de una señal. (Brown et al 2000). En esta tesis nos concentramos en el análisis de motivos basolaterales basados en tirosina, del tipo YxxΦ y dileucinas que están presente en las asas intracelulares del DOR

Al mutar cualquiera de las Y se retiene el DOR en el RE. La salida de proteínas del RE depende de señales específicas y de un correcto plegamiento,

sino las proteínas pueden ser retenidas y degradadas por los sistemas de control de calidad (Fiedler & Simons 1995).

Las señales clásicas de salida del RE descritas en receptores no GPCR se dividen en dos grupos, los de naturaleza di-acídica y los basados en un motivo de dos fenilalanina (FF) (Nishimura & Balch 1997). Respecto de las señales de salida desde el RE para receptores GPCR se han encontrado principalmente en la región carboxilo terminal, particularmente en la región más próxima a la membrana plasmática. Las señales identificadas se agrupan en cuatro tipos. Del tipo E(X)₃LL para el receptor de vasopresina V2 (Oksche et al 1998); F(X)₃F(X)₃F para el receptor de dopamina D1 (Bermak et al 2001); FN(X)₂LL(X)₃L para el receptor de vasopresina V1b/V3 (Robert et al 2005); F(X)₆LL para el receptor adrenérgico α₂B y angiotensina II tipo I (Duvernay et al 2004). Ninguna de estas señales contiene tirosina. Aun así no podemos descartar que las tirosinas que mutamos en el DOR no constituyan señales de salida del RE.

Los motivos basados en tirosina del DOR podrían participar como señal de salida del RE y además como señal basolateral. La señal de salida del RE del virus de la estomatitis (VSVG) compuesto por un grupo di-acídico inserto en un motivo YxxΦ (YTDIEM) (Sevier et al 2000) también controla la salida desde el TGN hacia la membrana basolateral en células MDCK (Soza et al 2004). Se podría estudiar esta posibilidad mediante péptidos célula permeables, tal como se hizo para la VSVG (Soza et al 2004).

Por otro lado, el correcto plegamiento de los GPCR es complejo e involucra múltiples interacciones moleculares que hacen que su tasa de plegamiento sea lenta y muy susceptible a alteraciones (revisado en Matthew 2005). Para el DOR, el

proceso de maduración y exporte hacia la superficie es bastante ineficiente, ya que sólo un 40% de su precursor madura y llega a la superficie (Petaja-Repo et al 2000). Este no sería un problema de sobreexpresión. En neuronas también se ha encontrado gran cantidad de GPCR inmaduro retenido al interior de la célula (Vannier et al 1996, VuHai-LuuThi et al 1992). La ruta de exporte de los GPCR desde el RE hacia la superficie es un evento altamente regulado e incluye interacción con proteínas chaperonas, dimerización y reconocimiento de señales de salida desde el RE (revisado en Duvernay 2005).

Algunos GPCR, no los miembros de la familia opioide, contienen secuencias del tipo Yxx Φ y dileucina en la región carboxilo terminal (Marchese et al 2008). Estos motivos regularían la endocitosis no mediada por arrestina ya que estos motivos serían directamente reconocidos por AP2. El receptor de trombina, PAR1 en su carboxilo terminal contiene un motivo YKKL que al interrumpirlo mediante mutagenesis retrasa la endocitosis constitutiva pero no la mediada por ligando que es independiente de fosforilación y arrestina, mientras que la constitutiva sería dependiente de la directa interacción con AP2 (Paing et al 2004).

Respecto de la contribución del motivo dileucina en el tráfico del DOR está el antecedente que mutantes del receptor en el motivo dileucina retrasan su llegada a lisosomas al ser activado por su agonista (Wang et al 2003). Si bien las señales lisosomales son semejantes a las basolaterales (Traub & Bonifacino 2013), en nuestro modelo de transcitosis no observamos diferencias al mutar el motivo dileucina en el DOR en la llegada del receptor a la membrana basolateral. Para otros GPCR, motivos dileucina son necesarios para la endocitosis como para el

receptores β adrenérgico tipo 2 (B2AR) y los receptores de quimiokinas CXCR4/CXCR2 (Gabilondo et al 1997, Orsini & Benovic 1998).

7.4. Endocitosis del DOR en el polo apical es independiente de actina y lleva a transcitosis más que a degradación lisosomal

La endocitosis del DOR es dependiente de clatrina, aunque también se han descrito mecanismos independientes de clatrina en algunas células (Chu et al 1997, Gaudriault et al 1997, Keith et al 1996, Law & Loh 1999). Los receptores de opioides, al igual que otros GPCR, al ser activados son fosforilados en su región carboxilo terminal (Afify et al 1998). Esto promueve su interacción con β -arrestina que los desacopla de su interacción con proteína G como parte del mecanismo de desensibilización de GPCR (Moore et al 2007). La interacción con β -arrestina también acopla los GPCRs a la endocitosis mediada por clatrina a través de la interacción de β -arrestina con el adaptador AP2 (Srivastava et al 2015). El DOR endocitado es preferencialmente llevado a degradación (Oakley et al 2000).

Es interesante resaltar que nuestros resultados muestran una ruta de tráfico del DOR endocitado desde la membrana plasmática apical no lleva a degradación sino más bien a reinserción del receptor en la membrana plasmática, aunque en el dominio basolateral. Los GPCR que reciclan hacia la membrana plasmática son defosforilados por fosfatasas localizadas en endosomas, caracterizadas principalmente para el B2AR (Pitcher et al 1995, Poll et al 2011). Las fosfatasas para los receptores de opioides se desconocen.

Otro elemento interesante de la endocitosis del DOR es su independencia del citoesqueleto de actina. En células MDCK polarizadas se ha descrito que la endocitosis desde el polo apical sería dependiente de actina, ya que es sensible a su disrupción farmacológica, contrastando con la endocitosis basolateral que es insensible (Gottlieb et al 1993, Jackman et al 1994, Maples et al 1997, Shurety et al 1996). La actina puede operar como proteína andamio y actuar permisivamente reclutando proteínas de la maquinaria endocítica (Qualmann et al 2000) o también, en conjunto con los motores de miosina, puede actuar en la etapa constricción y posterior escisión de las vesículas a través de la formación de un anillo contráctil (Coudrier et al 1992). Los ejemplos de endocitosis apical dependiente de actina son principalmente endocitosis constitutiva de fluidos y la endocitosis de la IgA que es mediada por el pIgR. Estos trabajos han utilizado para desorganizar el citoesqueleto de actina citocalasina D que se une al filamento de actina bloqueando la incorporación de nuevos monómeros (Cooper 1987). Con citocalasina D las moléculas presentes en los fluidos quedan retenidas en la superficie apical de la célula (Gottlieb et al 1993, Shurety et al 1996). En nuestros experimentos con el DOR encontramos que latrunculina A inhibe la transcitosis del DOR hacia el polo basolateral, pero acumulándose vesículas intracelulares con DOR que indican que su endocitosis no se inhibió.

Sin embargo, el rol de la actina en endocitosis puede ser variable según las particularidades de la membrana plasmática donde se produce y la maquinaria endocítica involucrada. Por ejemplo, en el polo basolateral, se ha postulado que la actina podría actuar como un cerco molecular, como un regulador negativo de la endocitosis. La disrupción del citoesqueleto de actina aumenta la tasa de

endocitosis de algunas proteínas (Gottlieb et al 1993, Shurety et al 1996, Verrey et al 1995) y favorece los eventos de fusión de vesículas con la membrana plasmática (Valentijn et al 1999). Esto podría ocurrir en el caso de la endocitosis de ciertas proteínas en la membrana plasmática apical, como el DOR.

Respecto de la sensibilidad del transporte post-endocítico desde el polo apical al basolateral, que resultó ser sensible a latrunculina pero no a citocalasina, lo que sugiere posiblemente un mecanismo dependiente de la incorporación de nuevos monómero al polímero de actina. La actina en su forma polimerizada ayuda al transporte de vesículas desde la membrana plasmática hacia el citosol a través de estructuras denominadas cometas de actina (Merrifield et al 1999, Taunton et al 2000). Estos cometas dependen de una maquinaria de polimerización de actina desde una membrana endocítica promovida por el complejo Arp2/3 y N-Wasp (Taunton et al 2000). El complejo Arp2/3 está compuesto de siete subunidades (Blanchoin et al 2000, Svitkina & Borisy 1999), Arp2 y Arp3 son altamente homólogos a la actina G y funcionan como sitios de nucleación de los nuevos filamentos de actina (Machesky et al 1994, Welch et al 1997). El complejo se une a un costado del filamento antiguo o materno y se inicia el crecimiento del filamento nuevo. En la activación del complejo Arp2/3 participa N-Wasp, una proteína multidominio que al autoplegarse permanece en un estado inactivo. Cdc42 activa N-Wasp exponiendo su dominio VCA que interactúa con el complejo Arp2/3 produciendo un cambio conformacional en el complejo que le permite interactuar con el filamento de actina y promover la nucleación de nuevos monómeros de actina (Rohatgi et al 2000, Rohatgi et al 1999).

Una posible vía de señalización gatillada por la activación de DOR que regula la dinámica del citoesqueleto de actina incluye a la GTPasa Rho, Rho quinasa (ROCK), Lim quinasa (LIMK) y el efector cofilina (Mittal et al 2013). La activación de ROCK activa la actividad serina/treonina quinasa de LIMK, que a su vez fosforila a cofilina inactivándola. La actividad de cofilina también es regulada por fosfatasas que la reactivan (Niwa et al 2002). Cofilina es una proteína ubicua que se une al extremo negativo de la actina liberando monómeros de actina monomérica, que a su vez son reutilizados en la polimerización del extremo positivo del filamento de actina. La actividad de la cofilina regula así la longitud de los filamentos de actina (Carlier et al 1997). β -arrestina es un regulador de la actividad de cofilina a través de la formación de un complejo con una fosfatasa de cofilina y la inhibición de LIMK (Zoudilova et al 2010). En células derivadas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) se mostró que la activación del DOR endógeno activa a cofilina, lo que a su vez regularía la disponibilidad del DOR en la superficie de las neuronas (Mittal et al 2013). Así, la activación del DOR en células MDCK también podría regular la polimerización del citoesqueleto de actina permitiendo su transporte desde el polo apical hacia el basolateral.

7.5. La ruta de transcitosis del DOR es dependiente de actina

Los microtúbulos son el eje del transporte vesicular para grandes distancias (Ross et al 2008). Las vesículas transcitóticas que viajan desde un polo de la célula hacia otro deben viajar entre 5-10 μm de distancia en una célula epitelial como la MDCK. La ruta de transcitosis basolateral-apical está descrita como dependiente de microtúbulos (Burgos et al 2004, Hunziker et al 1990, Pous et al 1998, Yui et al

2013). Los datos respecto del requerimiento de microtúbulos en la ruta apical-basolateral del FcRn son contradictorios y al parecer dependen del tipo celular que se analice. En células MDCK el transporte de la IgG ha sido reportado como insensible al tratamiento con nocodazol (Hunziker et al 1990), al igual que en células derivadas de placenta que expresan endógenamente el FcRn (Ellinger et al 2001). En células MDCK, el análisis de la ruta intracelular del FcRn utilizando ligandos fluorescentes muestra un patrón de movimiento sensible al tratamiento con nocodazol (Jerdeva et al 2010). Sin embargo, este trabajo no evaluó la llegada de la IgG a la membrana basolateral. En células derivadas del túbulo colector medular interno se ha mostrado que la ruta apical-basolateral del FcRn, expresado de manera exógena requiere de microtúbulos intactos (McCarthy et al 2000). Esto es consistente con los datos provenientes de topografía crioeléctrica del intestino de ratas neonatas donde se describió que las IgG acopladas a oro son endocitadas hacia compartimentos tubulares y vesículas adyacentes a microtúbulos (He et al 2008). Esto antecedentes indican que existiría más de una vía de transcitosis apical-basolateral, que incluirían vías dependientes e independientes de microtúbulos. Nuestros resultados con dos inhibidores de la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos sugieren que la transcitosis apical-basolateral del DOR es independiente de microtúbulos.

El citoesqueleto de actina se ha involucrado en eventos de endocitosis y de transporte vesicular a nivel local y a corta distancia. Un ejemplo de esto se observa a nivel de la corteza y en estructura especializadas como las espinas dendríticas (Apodaca 2001, Wang et al 2008). También se ha descrito un mecanismo de transporte vesicular en ovocitos basado en actina que transporta vesículas hasta 30

μm (Schuh 2011). Además, en células MDCK se ha descrito que proteínas que se endocitan por el polo basolateral en presencia de latrunculina pierden su polaridad y son destinadas erróneamente al polo apical (Durrbach et al 2000, Sheff et al 2002).

Respecto de la transcitosis, la ruta del FcRn desde el polo apical al polo basolateral parece ser insensible al tratamiento con citocalasina en células derivadas de placenta (Ellinger et al 2001). Otros estudios han mostrado que el tráfico del FcRn en ambos sentidos de las MDCK polarizadas se inhibe con un dominante negativo de miosina Vb, una proteína motora asociada a actina (Tzaban et al 2009). Estos datos indican que no hay claridad respecto a la contribución del citoesqueleto de actina en la transcitosis apical-basolateral. Nuestros resultados mostraron que latrunculina inhibe la ruta de transcitosis apical-basolateral del DOR actuando a un nivel post-endocítico. Las vesículas con DOR endocitado se acumulan en el citosol en la región apical de las células MDCK.

Para el receptor u opioide se ha descrito interacción con F-actina indirectamente a través de filamina A y espinofilina, que poseen un dominio de unión tanto a F-actina como a al extremo carboxilo del receptor, y regulan su tráfico dependiente de activación por ligando (Onoprishvili et al 2003). También se ha encontrado por doble híbrido interacción del MOR con la periplaquina que une F-actina (Charlton et al 2008, Feng et al 2003). Sin embargo, para el DOR no se han descrito proteínas mediadoras de una interacción con el citoesqueleto de actina.

7.6 Rutas de transcitosis en neuronas

En neuronas donde los receptores opioides se expresan endógenamente se han descrito varios ejemplos de transcitosis desde un polo a otro. El plgR hace transcitosis desde el dominio somatodendrítico al axonal en neuronas (de Hoop et al 1995, Ikonen et al 1993), ruta que también siguen varias proteínas endógenas que alcanzan su localización axonal de manera indirecta, tales como VAMP2, sinaptoficina, TrKA y NgCAM (Ascano et al 2009, Sampo et al 2003, Yap et al 2008).

NgCAM es un ejemplo de una proteína que hace transcitosis en células MDCK y en neuronas. En células epiteliales, esta proteína NgCAM primero es transportada al polo basolateral por una señal del tipo Yxx Φ , que se inactiva en este dominio mientras se activa una señal apical (Anderson et al 2005). En neuronas, este mismo motivo controla la endocitosis desde la región somatodendrítica (Wisco 2003).

Del grupo de los GPCRs, el receptor de cannabinoides CBR1 en neuronas hipocampales se expresa tanto en axones como en dendritas. El pool dendrítico está constantemente reciclando y si estos ciclos se interrumpen con un antagonista, la marca de axón desaparece, sugiriendo que la localización axonal del receptor es por transcitosis (Leterrier et al 2006).

El DOR ha sido descrito en axones en varios tipos neuronales (Bausch et al 1995, Drake et al 1996, Svingos et al 1999), distribución que podría equipararse a la localización apical que vemos en células MDCK. Sin embargo no se sabe si existe transcitosis en neuronas para esta familia de receptores, ya que la mayoría de los estudios se han realizado en líneas celulares (Bernard et al 2006, Pradhan et al

2009). Sin embargo, el hallazgo de una ruta de transcitosis apical-basolateral del DOR en células epiteliales sugiere que esta ruta también podría existir en neuronas donde estos receptores se expresan endógenamente.

7.7 La ruta de transcitosis apical-basolateral del DOR tiene elementos que la distinguen como una nueva ruta de tráfico

Hasta la fecha, la única proteína descrita que entra en una ruta apical-basolateral es el receptor neonatal de IgG, FcRn. Nuestros resultados indican que la ruta de transcitosis apical-basolateral del DOR sería la más inducible de las rutas de transcitosis descritas hasta el momento. La ruta de transcitosis del FcRn es constitutiva, no inducida (Praetor et al 1999, Stefaner et al 1999). La ruta inversa basolateral-apical del pIgR que se define como inducible, aumenta sólo un 20% al ser expuesto a su ligando (Apodaca et al 1994, Giffroy et al 1998). La ruta del SRBI cambia la distribución de este receptor sólo en un 50% bajo el efecto del Forskolina (Burgos et al 2004), como también corroboramos en esta tesis. En cambio, el 90% del DOR es transportado por la ruta apical-basolateral después de una hora de tratamiento con su agonista.

Una diferencia importante con las otras proteínas que hacen transcitosis es que el DOR es una proteína de señalización, de la familia de los GPCR. El DOR señala a través de una Gi que regula negativamente a la adenilato ciclasa y por lo tanto haría disminuir los niveles de AMPc y la actividad de la PKA. En esta tesis mostramos que el tratamiento con toxina pertussis, que inhibe a Gi, bloquea parcialmente la endocitosis. No podemos descartar la participación de otros

elementos señalizantes, pero al menos la Gi parece estar involucrada en la etapa de endocitosis.

La transcitosis de DOR tiene requerimientos diferentes del citoesqueleto que las descritas para otras rutas. Diferencias con la transcitosis basolateral-apical respecto de tubulina y actina.

En el caso del FcRn, la ruta de transcitosis apical-basolateral que sigue en células BeWo que lo expresan endógenamente se describió como insensible a la disrupción del citoesqueleto de actina, pero utilizando sólo citocalasina D (Ellinger et al 2001). Nuestros resultados mostraron que la citocalasina D no inhibe la transcitosis apical-basolateral del DOR, en cambio sí lo hace la latrunculina. La citocalasina D a diferencia de la latrunculina se une a la actina polimerizada (actina F) impidiendo la incorporación de actina monomérica (actina G) hacia el polímero (Flanagan & Lin 1980). Es posible que la ruta del FcRn y del DOR sean similares respecto al requerimiento de actina, sólo que para el tráfico de FcRn no se ha estudiado el efecto de latrunculina. En células MDCK transfectadas con el FcRn se mostró que su transcitosis apical-basolateral se interrumpe al sobreexpresar un dominante negativo del motor asociado a actina miosina Vb, sugiriendo un requerimiento del citoesqueleto de actina (Lencer 2009).

El FcRn hace transcitosis bidireccional hacia ambos polos de la célula (McCarthy et al 2000). Nuestros resultados de colocalización del DOR-esp-GFP con estreptavidina-Alexa 568 indicaron endocitosis apical pero no basolateral. Esto podría deberse a diferentes requerimientos de la endocitosis apical y basolateral (Gottlieb et al 1993). La maquinaria endocítica podría ser distinta en cada polo. Otra posibilidad, es que el DOR en la superficie basolateral señalice de manera distinta

que en el apical, sin llevar a transcitosis basolateral-apical. Por ejemplo, el receptor activado por proteasa tipo 2 (PAR2) es un GPCR que se expresa en ambos polos del epitelio intestinal pero su activación en cada uno ellos lleva a respuestas transcripcionales distintas (Lau et al 2011). Otro ejemplo es el receptor de EGF (EGFR), que normalmente se expresa en el dominio basolateral pero en condiciones de sobreexpresión se puede encontrar en ambos polos de la célula. Su activación por apical o basolateral no se traduce en diferencias en la respuesta mitogénica del EGF, pero sí en la función de proteínas involucradas en adhesión celular, que son fosforilados principalmente cuando el receptor se activa por el basolateral (Kuwada et al 1998).

Los antecedentes de rutas de transcitosis de otras proteínas sugieren que el DOR entra en una ruta de transcitosis apical-basolateral inducida por ligando no descrita previamente, tanto su regulación por un estímulo externo, tratándose de un receptor señalizante, como por su requerimiento de actina.

8. Conclusiones

1. El DOR es destinado al polo apical, donde al ser estimulado por agonista entra a una ruta de transcitosis que lo inserta en la membrana plasmática basolateral.
2. La ruta intracelular del DOR desde el polo apical al basolateral incluye un tránsito por el CRE y, sin embargo, es independiente del complejo AP1B.
3. La endocitosis apical del DOR es independiente del citoesqueleto de actina, no así su transporte intracelular hacia el dominio de membrana basolateral que es sensible a latrunculina.
4. El tráfico vesicular regulado del DOR revela la existencia de una ruta de transcitosis apical-basolateral nueva en cuanto a que es totalmente inducible y dependiente de actina.

9. Bibliografía

- Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* 35: 74-82
- Afify EA, Law PY, Riedl M, Elde R, Loh HH. 1998. Role of carboxyl terminus of mu-and delta-opioid receptor in agonist-induced down-regulation. *Brain Res Mol Brain Res* 54: 24-34
- Alfalah M, Jacob R, Preuss U, Zimmer KP, Naim H, Naim HY. 1999. O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol* 9: 593-6
- Almomani EY, King JC, Netsawang J, Yenchitsomanus PT, Malasit P, et al. 2012. Adaptor protein 1 complexes regulate intracellular trafficking of the kidney anion exchanger 1 in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C554-66
- Ameen NA, Figueroa Y, Salas PJ. 2001. Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J Cell Sci* 114: 563-75
- Anderson E, Maday S, Sfakianos J, Hull M, Winckler B, et al. 2005. Transcytosis of NgCAM in epithelial cells reflects differential signal recognition on the endocytic and secretory pathways. *J Cell Biol* 170: 595-605
- Apodaca G. 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2: 149-59
- Apodaca G, Katz LA, Mostov KE. 1994. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J Cell Biol* 125: 67-86
- Aroeti B, Kosen PA, Kuntz ID, Cohen FE, Mostov KE. 1993. Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J Cell Biol* 123: 1149-60
- Ascano M, Richmond A, Borden P, Kuruvilla R. 2009. Axonal targeting of Trk receptors via transcytosis regulates sensitivity to neurotrophin responses. *J Neurosci* 29: 11674-85
- Bacallao R, Antony C, Dotti C, Karsenti E, Stelzer EH, Simons K. 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol* 109: 2817-32
- Bausch SB, Patterson TA, Appleyard SM, Chavkin C. 1995. Immunocytochemical localization of delta opioid receptors in mouse brain. *Journal of chemical neuroanatomy* 8: 175-89
- Beau I, Misrahi M, Gross B, Vannier B, Loosfelt H, et al. 1997. Basolateral localization and transcytosis of gonadotropin and thyrotropin receptors expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 272: 5241-8
- Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY. 2001. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol* 3: 492-8
- Bernard V, Decossas M, Liste I, Bloch B. 2006. Intraneuronal trafficking of G-protein-coupled receptors in vivo. *Trends in neurosciences* 29: 140-7
- Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD. 2000. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404: 1007-11
- Blobel G. 2000. Protein targeting (Nobel lecture). *ChemBiochem* 1: 86-102
- Boehm M, Bonifacino JS. 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* 12: 2907-20

- Bolte S, Cordelieres FP. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-32
- Bomsel M, Mostov KE. 1993. Possible role of both the alpha and beta gamma subunits of the heterotrimeric G protein, Gs, in transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *J Biol Chem* 268: 25824-35
- Bonifacino JS. 2014. Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Biol* 204: 7-17
- Bossard C, Bresson D, Polishchuk RS, Malhotra V. 2007. Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN. *J Cell Biol* 179: 1123-31
- Bravo-Zehnder M, Orio P, Norambuena A, Wallner M, Meera P, et al. 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: 13114-9
- Bre MH, Kreis TE, Karsenti E. 1987. Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: the occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J Cell Biol* 105: 1283-96
- Breitfeld PP, McKinnon WC, Mostov KE. 1990. Effect of nocodazole on vesicular traffic to the apical and basolateral surfaces of polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 111: 2365-73
- Brown DA, Rose JK. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-44
- Brown PS, Wang E, Aroeti B, Chapin SJ, Mostov KE, Dunn KW. 2000. Definition of distinct compartments in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for membrane-volume sorting, polarized sorting and apical recycling. *Traffic* 1: 124-40
- Burgos PV, Klattenhoff C, de la Fuente E, Rigotti A, Gonzalez A. 2004. Cholesterol depletion induces PKA-mediated basolateral-to-apical transcytosis of the scavenger receptor class B type I in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3845-50
- Burns DL, Hausman SZ, Witvliet MH, Brennan MJ, Poolman JT, Manclark CR. 1988. Biochemical properties of pertussis toxin. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* 13 Suppl: 181-5
- Cancino J, Torrealba C, Soza A, Yuseff MI, Gravotta D, et al. 2007. Antibody to AP1B adaptor blocks biosynthetic and recycling routes of basolateral proteins at recycling endosomes. *Mol Biol Cell* 18: 4872-84
- Cardone MH, Smith BL, Mennitt PA, Mochly-Rosen D, Silver RB, Mostov KE. 1996. Signal transduction by the polymeric immunoglobulin receptor suggests a role in regulation of receptor transcytosis. *J Cell Biol* 133: 997-1005
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, et al. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 136: 1307-22
- Casanova JE, Apodaca G, Mostov KE. 1991. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66: 65-75
- Casanova JE, Wang X, Kumar R, Bhartur SG, Navarre J, et al. 1999. Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 10: 47-61
- Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 60: 161-77
- Cohen CJ, Gaetz J, Ohman T, Bergelson JM. 2001a. Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J Biol Chem* 276: 25392-8
- Cohen D, Musch A, Rodriguez-Boulan E. 2001b. Selective control of basolateral membrane protein polarity by cdc42. *Traffic* 2: 556-64

- Compton T, Ivanov IE, Gottlieb T, Rindler M, Adesnik M, Sabatini DD. 1989. A sorting signal for the basolateral delivery of the vesicular stomatitis virus (VSV) G protein lies in its luminal domain: analysis of the targeting of VSV G-influenza hemagglutinin chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4112-6
- Conner SD, Schmid SL. 2002. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 156: 921-9
- Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44
- Cooper JA. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105: 1473-8
- Coudrier E, Durrbach A, Louvard D. 1992. Do unconventional myosins exert functions in dynamics of membrane compartments? *FEBS Lett* 307: 87-92
- Cvejic S, Devi LA. 1997. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272: 26959-64
- Chakrabarti S, Prather PL, Yu L, Law PY, Loh HH. 1995. Expression of the mu-opioid receptor in CHO cells: ability of mu-opioid ligands to promote alpha-azidoanilido[32P]GTP labeling of multiple G protein alpha subunits. *J Neurochem* 64: 2534-43
- Charlton JJ, Allen PB, Psifogeorgou K, Chakravarty S, Gomes I, et al. 2008. Multiple actions of spinophilin regulate mu opioid receptor function. *Neuron* 58: 238-47
- Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, et al. 2003. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med* 197: 315-22
- Chen YA, Scheller RH. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 98-106
- Chu P, Murray S, Lissin D, von Zastrow M. 1997. Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *J Biol Chem* 272: 27124-30
- de Hoop M, von Poser C, Lange C, Ikonen E, Hunziker W, Dotti CG. 1995. Intracellular routing of wild-type and mutated polymeric immunoglobulin receptor in hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 130: 1447-59
- Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol* 16: 408-14
- Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, et al. 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* 169: 491-501
- Delacour D, Jacob R. 2006. Apical protein transport. *Cell Mol Life Sci* 63: 2491-505
- Deora AA, 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: 4148-65
- Desclozeaux M, Venturato J, Wylie FG, Kay JG, Joseph SR, et al. 2008. Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C545-56
- Donoso M, Cancino J, Lee J, van Kerkhof P, Retamal C, et al. 2009. Polarized traffic of LRP1 involves AP1B and SNX17 operating on Y-dependent sorting motifs in different pathways. *Mol Biol Cell* 20: 481-97
- Drake CT, Patterson TA, Simmons ML, Chavkin C, Milner TA. 1996. Kappa opioid receptor-like immunoreactivity in guinea pig brain: ultrastructural localization in presynaptic terminals in hippocampal formation. *The Journal of comparative neurology* 370: 377-95
- Durrbach A, Raposo G, Tenza D, Louvard D, Coudrier E. 2000. Truncated brush border myosin I affects membrane traffic in polarized epithelial cells. *Traffic* 1: 411-24
- Duvernay MT, Filipeanu CM, Wu G. 2005. The regulatory mechanisms of export trafficking of G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 17: 1457-65

- Duvernay MT, Zhou F, Wu G. 2004. A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 279: 30741-50
- Ellgaard L, Helenius A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 181-91
- Ellinger I, Rothe A, Grill M, Fuchs R. 2001. Apical to basolateral transcytosis and apical recycling of immunoglobulin G in trophoblast-derived BeWo cells: effects of low temperature, nocodazole, and cytochalasin D. *Exp Cell Res* 269: 322-31
- Fath KR, Trimbur GM, Burgess DR. 1997. Molecular motors and a spectrin matrix associate with Golgi membranes in vitro. *J Cell Biol* 139: 1169-81
- Feng GJ, Kellett E, Scorer CA, Wilde J, White JH, Milligan G. 2003. Selective interactions between helix VIII of the human mu-opioid receptors and the C terminus of periplakin disrupt G protein activation. *J Biol Chem* 278: 33400-7
- Fiedler K, Parton RG, Kellner R, Etzold T, Simons K. 1994. VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells. *EMBO J* 13: 1729-40
- Fiedler K, Simons K. 1995. The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81: 309-12
- Firan M, Bawdon R, Radu C, Ober RJ, Eaken D, et al. 2001. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *International immunology* 13: 993-1002
- Flanagan MD, Lin S. 1980. Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J Biol Chem* 255: 835-8
- Folsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99: 189-98
- Francesconi A, Duvoisin RM. 2002. Alternative splicing unmasking dendritic and axonal targeting signals in metabotropic glutamate receptor 1. *J Neurosci* 22: 2196-205
- Fullekrug J, Nilsson T. 1998. Protein sorting in the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1404: 77-84
- Gabilondo AM, Hegler J, Krasel C, Boivin-Jahns V, Hein L, Lohse MJ. 1997. A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12285-90
- Gao Y, Sztul E. 2001. A novel interaction of the Golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton. *J Cell Biol* 152: 877-94
- Gaudriault G, Nouel D, Dal Farra C, Beaudet A, Vincent JP. 1997. Receptor-induced internalization of selective peptidic mu and delta opioid ligands. *J Biol Chem* 272: 2880-8
- Gephart JD, Singh B, Higginbotham JN, Franklin JL, Gonzalez A, et al. 2011. Identification of a novel mono-leucine basolateral sorting motif within the cytoplasmic domain of amphiregulin. *Traffic* 12: 1793-804
- Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen MF, Lee Y, Ward ES. 1996. Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *European journal of immunology* 26: 690-6
- Ghetie V, Ward ES. 2000. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol* 18: 739-66
- Giffroy D, Langendries A, Maurice M, Daniel F, Lardeux B, et al. 1998. In vivo stimulation of polymeric Ig receptor transcytosis by circulating polymeric IgA in rat liver. *International immunology* 10: 347-54
- Goldenthal KL, Hedman K, Chen JW, August JT, Willingham MC. 1985. Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *J Histochem Cytochem* 33: 813-20
- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778: 729-56

- Gonzalez A, Rizzolo L, Rindler M, Adesnik M, Sabatini DD, Gottlieb T. 1987. Nonpolarized secretion of truncated forms of the influenza hemagglutinin and the vesicular stomatitis virus G protein from MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 3738-42
- Gonzalez A, Rodriguez-Boulan E. 2009. Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett* 583: 3784-95
- Gottlieb TA, Ivanov IE, Adesnik M, Sabatini DD. 1993. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 120: 695-710
- Gravotta D, Carvajal-Gonzalez JM, Mattera R, Deborde S, Banfelder JR, et al. 2012. The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity. *Dev Cell* 22: 811-23
- Gravotta D, Deora A, Perret E, Oyanadel C, Soza A, et al. 2007. AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1564-9
- Grindstaff KK, Bacallao RL, Nelson WJ. 1998. Apiconuclear organization of microtubules does not specify protein delivery from the trans-Golgi network to different membrane domains in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9: 685-99
- Gronewold TM, Sasse F, Lunsdorf H, Reichenbach H. 1999. Effects of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells. *Cell Tissue Res* 295: 121-9
- Guo X, Mattera R, Ren X, Chen Y, Retamal C, et al. 2013. The adaptor protein-1 mu1B subunit expands the repertoire of basolateral sorting signal recognition in epithelial cells. *Dev Cell* 27: 353-66
- Gut A, Kappeler F, Hyka N, Balda MS, Hauri HP, Matter K. 1998. Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J* 17: 1919-29
- Hansen SH, Casanova JE. 1994. Gs alpha stimulates transcytosis and apical secretion in MDCK cells through cAMP and protein kinase A. *J Cell Biol* 126: 677-87
- Hansen SH, Olsson A, Casanova JE. 1995. Wortmannin, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase, inhibits transcytosis in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 270: 28425-32
- Hanyaloglu AC, von Zastrow M. 2008. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 537-68
- Hara-Kuge S, Ohkura T, Ideo H, Shimada O, Atsumi S, Yamashita K. 2002. Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem* 277: 16332-9
- Haymann JP, Levraud JP, Bouet S, Kappes V, Hagege J, et al. 2000. Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney. *J Am Soc Nephrol* 11: 632-9
- He W, Ladinsky MS, Huey-Tubman KE, Jensen GJ, McIntosh JR, Bjorkman PJ. 2008. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography. *Nature* 455: 542-6
- Helms JB, Zurzolo C. 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5: 247-54
- Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS. 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* 10: 2787-802
- Hunziker W, Male P, Mellman I. 1990. Differential microtubule requirements for transcytosis in MDCK cells. *EMBO J* 9: 3515-25
- Ikonen E, Parton RG, Hunziker W, Simons K, Dotti CG. 1993. Transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor in cultured hippocampal neurons. *Curr Biol* 3: 635-44
- Imjeti NS, Lebreton S, Paladino S, de la Fuente E, Gonzalez A, Zurzolo C. 2011. N-Glycosylation instead of cholesterol mediates oligomerization and apical sorting of GPI-APs in FRT cells. *Mol Biol Cell* 22: 4621-34

- Jackman MR, Shurety W, Ellis JA, Luzio JP. 1994. Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in Caco-2 cells by cytochalasin D. *J Cell Sci* 107 (Pt 9): 2547-56
- Jerdeva GV, Tesar DB, Huey-Tubman KE, Ladinsky MS, Fraser SE, Bjorkman PJ. 2010. Comparison of FcRn- and plgR-mediated transport in MDCK cells by fluorescence confocal microscopy. *Traffic* 11: 1205-20
- Jolimay N, Franck L, Langlois X, Hamon M, Darmon M. 2000. Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT1B receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci* 20: 9111-8
- Jones EA, Waldmann TA. 1972. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *The Journal of clinical investigation* 51: 2916-27
- Jou TS, Leung SM, Fung LM, Ruiz WG, Nelson WJ, Apodaca G. 2000. Selective alterations in biosynthetic and endocytic protein traffic in Madin-Darby canine kidney epithelial cells expressing mutants of the small GTPase Rac1. *Mol Biol Cell* 11: 287-304
- Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, et al. 1996. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* 271: 19021-4
- Kennedy MJ, Ehlers MD. 2011. Mechanisms and function of dendritic exocytosis. *Neuron* 69: 856-75
- Kirchhausen T. 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 705-32
- Kitagawa Y, Sano Y, Ueda M, Higashio K, Narita H, et al. 1994. N-glycosylation of erythropoietin is critical for apical secretion by Madin-Darby canine kidney cells. *Exp Cell Res* 213: 449-57
- Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. 2002. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F358-65
- Kraemer J, Schmitz F, Drenckhahn D. 1999. Cytoplasmic dynein and dynactin as likely candidates for microtubule-dependent apical targeting of pancreatic zymogen granules. *Eur J Cell Biol* 78: 265-77
- Kristoffersen EK. 1996. Human placental Fc gamma-binding proteins in the maternofetal transfer of IgG. *APMIS. Supplementum* 64: 5-36
- Kroschewski R, Hall A, Mellman I. 1999. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* 1: 8-13
- Kural C, Serpinskaya AS, Chou YH, Goldman RD, Gelfand VI, Selvin PR. 2007. Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5378-82
- Kuwada SK, Lund KA, Li XF, Cliften P, Amsler K, et al. 1998. Differential signaling and regulation of apical vs. basolateral EGFR in polarized epithelial cells. *Am J Physiol* 275: C1419-28
- Ladinsky MS, Huey-Tubman KE, Bjorkman PJ. 2012. Electron tomography of late stages of FcRn-mediated antibody transcytosis in neonatal rat small intestine. *Mol Biol Cell* 23: 2537-45
- Larsen JE, Avvakumov GV, Hammond GL, Vogel LK. 1999. N-glycans are not the signal for apical sorting of corticosteroid binding globulin in MDCK cells. *FEBS Lett* 451: 19-22
- Lau C, Lytle C, Straus DS, DeFea KA. 2011. Apical and basolateral pools of proteinase-activated receptor-2 direct distinct signaling events in the intestinal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C113-23
- Laugwitz KL, Offermanns S, Spicher K, Schultz G. 1993. mu and delta opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuron* 10: 233-42
- Law PY, Loh HH. 1999. Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 607-24
- Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. 1996. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol* 157: 3317-22

- Leitner K, Ellinger I, Grill M, Brabec M, Fuchs R. 2006. Efficient apical IgG recycling and apical-to-basolateral transcytosis in polarized BeWo cells overexpressing hFcRn. *Placenta* 27: 799-811
- Lencer WI, Blumberg RS. 2005. A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends Cell Biol* 15: 5-9
- Leterrier C, Laine J, Darmon M, Boudin H, Rossier J, Lenkei Z. 2006. Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci* 26: 3141-53
- Leung SM, Rojas R, Maples C, Flynn C, Ruiz WG, et al. 1999. Modulation of endocytic traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells by the small GTPase RhoA. *Mol Biol Cell* 10: 4369-84
- Leung SM, Ruiz WG, Apodaca G. 2000. Sorting of membrane and fluid at the apical pole of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11: 2131-50
- Lin H, Xu H, Zhang X, de Groot K. 1998. Tensile tests of interface between bone and plasma-sprayed HA coating-titanium implant. *J Biomed Mater Res* 43: 113-22
- Lock JG, Stow JL. 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 16: 1744-55
- Luton F, Cardone MH, Zhang M, Mostov KE. 1998. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-induced regulation of transcytosis of the polymeric Ig receptor. *Mol Biol Cell* 9: 1787-802
- Luton F, Hexham MJ, Zhang M, Mostov KE. 2009. Identification of a cytoplasmic signal for apical transcytosis. *Traffic* 10: 1128-42
- Luton F, Verges M, Vaerman JP, Sudol M, Mostov KE. 1999. The SRC family protein tyrosine kinase p62yes controls polymeric IgA transcytosis in vivo. *Molecular cell* 4: 627-32
- Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 127: 107-15
- Mangravite LM, Giacomini KM. 2003. Sorting of rat SPNT in renal epithelium is independent of N-glycosylation. *Pharm Res* 20: 319-23
- Maples CJ, Ruiz WG, Apodaca G. 1997. Both Microtubules and Actin Filaments Are Required for Efficient Postendocytotic Traffic of the Polymeric Immunoglobulin Receptor in Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272: 6741-51
- Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J. 2008. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 601-29
- Marino M, Andrews D, Brown D, McCluskey RT. 2001a. Transcytosis of retinol-binding protein across renal proximal tubule cells after megalin (gp 330)-mediated endocytosis. *J Am Soc Nephrol* 12: 637-48
- Marino M, Chiovato L, Lisi S, Pinchera A, McCluskey RT. 2001b. Phosphoinositide 3-kinase inhibits megalin-mediated transcytosis of thyroglobulin across thyroid epithelial cells at a post-sorting level. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 145: 477-83
- Markkanen PM, Petaja-Repo UE. 2008. N-glycan-mediated quality control in the endoplasmic reticulum is required for the expression of correctly folded delta-opioid receptors at the cell surface. *J Biol Chem* 283: 29086-98
- Martin-Belmonte F, Arvan P, Alonso MA. 2001. MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 276: 49337-42
- Martinez-Maza R, Poyatos I, Lopez-Corcuera B, E Nu, Gimenez C, et al. 2001. The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* 276: 2168-73

- Marzolo MP, Bull P, Gonzalez A. 1997. Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1834-9
- Marzolo MP, Yuseff MI, Retamal C, Donoso M, Ezquer F, et al. 2003. Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic* 4: 273-88
- Matter K, Mellman I. 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 6: 545-54
- Matter K, Whitney JA, Yamamoto EM, Mellman I. 1993. Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* 74: 1053-64
- Matus S, Burgos PV, Bravo-Zehnder M, Kraft R, Porras OH, et al. 2007. Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exp Med* 204: 3221-34
- Maxfield FR, McGraw TE. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 121-32
- McCarthy KM, Lam M, Subramanian L, Shakya R, Wu Z, et al. 2001. Effects of mutations in potential phosphorylation sites on transcytosis of FcRn. *J Cell Sci* 114: 1591-8
- McCarthy KM, Yoong Y, Simister NE. 2000. Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia. *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1277-85
- Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625
- Mellman I, Nelson WJ. 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 833-45
- Mellman I, Warren G. 2000. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100: 99-112
- Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G, et al. 1999. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* 1: 72-4
- Miranda KC, Khromykh T, Christy P, Le TL, Gottardi CJ, et al. 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: 22565-72
- Mishra R, Grzybek M, Niki T, Hirashima M, Simons K. 2010. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17633-8
- Mittal N, Roberts K, Pal K, Bentolila LA, Fultz E, et al. 2013. Select G-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and beta-arrestin 1 pathway. *Cell Rep* 5: 1010-21
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, et al. 1994. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341: 33-8
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL. 2007. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69: 451-82
- Mostov K, Su T, ter Beest M. 2003. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* 5: 287-93
- Musch A. 2004. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic* 5: 1-9
- Neudeck BL, Loeb J, Buck J. 2003. Activation of the κ -opioid receptor in Caco-2 cells decreases interleukin-8 secretion. *European Journal of Pharmacology* 467: 81-84
- Neudeck BL, Loeb JM. 2002. Endomorphin-1 alters interleukin-8 secretion in Caco-2 cells via a receptor mediated process. *Immunol Lett* 84: 217-21

- Nishimura N, Balch WE. 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277: 556-8
- Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T. 2002. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108: 233-46
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275: 17201-10
- Odorizzi G, Pearse A, Domingo D, Trowbridge IS, Hopkins CR. 1996. Apical and basolateral endosomes of MDCK cells are interconnected and contain a polarized sorting mechanism. *J Cell Biol* 135: 139-52
- Odorizzi G, Trowbridge IS. 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: 1255-64
- Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, et al. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269: 1872-5
- Ohno H, Tomemori T, Nakatsu F, Okazaki Y, Aguilar RC, et al. 1999. Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* 449: 215-20
- Okamoto CT, Shia SP, Bird C, Mostov KE, Roth MG. 1992. The cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor contains two internalization signals that are distinct from its basolateral sorting signal. *J Biol Chem* 267: 9925-32
- Okamoto CT, Song W, Bomsel M, Mostov KE. 1994. Rapid internalization of the polymeric immunoglobulin receptor requires phosphorylated serine 726. *J Biol Chem* 269: 15676-82
- Oksche A, Dehe M, Schulein R, Wiesner B, Rosenthal W. 1998. Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett* 424: 57-62
- Onoprishvili I, Andria ML, Kramer HK, Ancevska-Taneva N, Hiller JM, Simon EJ. 2003. Interaction between the mu opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking. *Mol Pharmacol* 64: 1092-100
- Orsini MJ, Benovic JL. 1998. Characterization of dominant negative arrestins that inhibit beta2-adrenergic receptor internalization by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 273: 34616-22
- Paing MM, Temple BR, Trejo J. 2004. A tyrosine-based sorting signal regulates intracellular trafficking of protease-activated receptor-1: multiple regulatory mechanisms for agonist-induced G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 279: 21938-47
- Paladino S, Sarnataro D, Pillich R, Tivodar S, Nitsch L, Zurzolo C. 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 167: 699-709
- Perez Bay AE, Schreiner R, Mazzoni F, Carvajal-Gonzalez JM, Gravotta D, et al. 2013. The kinesin KIF16B mediates apical transcytosis of transferrin receptor in AP-1B-deficient epithelia. *EMBO J* 32: 2125-39
- Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E. 2005. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol* 17: 423-34
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M. 2000. Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem* 275: 13727-36
- Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ. 1995. The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8343-7

- Polishchuk R, Di Pentima A, Lippincott-Schwartz J. 2004. Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat Cell Biol* 6: 297-307
- Poll F, Doll C, Schulz S. 2011. Rapid dephosphorylation of G protein-coupled receptors by protein phosphatase 1beta is required for termination of beta-arrestin-dependent signaling. *J Biol Chem* 286: 32931-6
- Potter BA, Hughey RP, Weisz OA. 2006. Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1-C10
- Potter BA, Ihrke G, Bruns JR, Weixel KM, Weisz OA. 2004. Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 15: 1407-16
- Pous C, Chabin K, Drechou A, Barbot L, Phung-Koskas T, et al. 1998. Functional specialization of stable and dynamic microtubules in protein traffic in WIF-B cells. *J Cell Biol* 142: 153-65
- Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, et al. 2009. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS One* 4: e5425
- Praetor A, Ellinger I, Hunziker W. 1999. Intracellular traffic of the MHC class I-like IgG Fc receptor, FcRn, expressed in epithelial MDCK cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2291-9
- Prather PL, Tsai AW, Law PY. 1994. Mu and delta opioid receptor desensitization in undifferentiated human neuroblastoma SHSY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 177-84
- Predescu SA, Predescu DN, Malik AB. 2007. Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293: L823-42
- Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB. 2000. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 150: F111-6
- Ren M, Xu G, Zeng J, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD. 1998. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6187-92
- Rindler MJ, Ivanov IE, Plesken H, Sabatini DD. 1985. Polarized delivery of viral glycoproteins to the apical and basolateral plasma membranes of Madin-Darby canine kidney cells infected with temperature-sensitive viruses. *J Cell Biol* 100: 136-51
- Robert J, Clauser E, Petit PX, Ventura MA. 2005. A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 2300-8
- Rodewald R. 1976. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *The Journal of cell biology* 71: 666-9
- Rodriguez-Boulan E, Gonzalez A. 1999. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol* 9: 291-4
- Rodriguez-Boulan E, Macara IG. 2014. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 225-42
- Rodriguez-Boulan E, Powell SK. 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol* 8: 395-427
- Rohatgi R, Ho HY, Kirschner MW. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150: 1299-310
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, et al. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97: 221-31
- Rojas R, Apodaca G. 2002. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 944-55

- Rojas R, Ruiz WG, Leung SM, Jou TS, Apodaca G. 2001. Cdc42-dependent modulation of tight junctions and membrane protein traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 12: 2257-74
- Roopenian DC, Akilesh S. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7: 715-25
- Ross JL, Ali MY, Warshaw DM. 2008. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 20: 41-7
- Roth MG. 2004. Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* 84: 699-730
- Roush DL, Gottardi CJ, Naim HY, Roth MG, Caplan MJ. 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: 26862-9
- Royer C, Lu X. 2011. Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? *Cell death and differentiation* 18: 1470-7
- Sabatini DD. 2005. In awe of subcellular complexity: 50 years of trespassing boundaries within the cell. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 1-33
- Sadeghi H, Birnbaumer M. 1999. O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology* 9: 731-7
- Salazar G, Gonzalez A. 2002. Novel mechanism for regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis revealed by protein kinase A inhibition. *Mol Biol Cell* 13: 1677-93
- Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G. 2003. Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37: 611-24
- Scheiffele P, Peranen J, Simons K. 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378: 96-8
- Schuh M. 2011. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol* 13: 1431-6
- Seabra MC, Mules EH, Hume AN. 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* 8: 23-30
- Sevier CS, Weisz OA, Davis M, Machamer CE. 2000. Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Mol Biol Cell* 11: 13-22
- Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I. 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol* 145: 123-39
- Sheff DR, Kroschewski R, Mellman I. 2002. Actin dependence of polarized receptor recycling in Madin-Darby canine kidney cell endosomes. *Mol Biol Cell* 13: 262-75
- Sheikh H, Isacke CM. 1996. A di-hydrophobic Leu-Val motif regulates the basolateral localization of CD44 in polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 271: 12185-90
- Shurety W, Bright NA, Luzio JP. 1996. The effects of cytochalasin D and phorbol myristate acetate on the apical endocytosis of ricin in polarised Caco-2 cells. *J Cell Sci* 109 (Pt 12): 2927-35
- Simister NE, Story CM, Chen HL, Hunt JS. 1996. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *European journal of immunology* 26: 1527-31
- Simmen T, Honing S, Icking A, Tikkanen R, Hunziker W. 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* 4: 154-9
- Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72
- Song W, Apodaca G, Mostov K. 1994. Transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor is regulated in multiple intracellular compartments. *The Journal of biological chemistry* 269: 29474-80
- Sorkin A, Von Zastrow M. 2002. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 600-14

- Soza A, Norambuena A, Cancino J, de la Fuente E, Henklein P, Gonzalez A. 2004. Sorting competition with membrane-permeable peptides in intact epithelial cells revealed discrimination of transmembrane proteins not only at the trans-Golgi network but also at pre-Golgi stages. *J Biol Chem* 279: 17376-83
- Srivastava A, Gupta B, Gupta C, Shukla AK. 2015. Emerging Functional Divergence of beta-Arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26: 628-42
- Stefaner I, Praetor A, Hunziker W. 1999. Nonvectorial surface transport, endocytosis via a Di-leucine-based motif, and bidirectional transcytosis of chimera encoding the cytosolic tail of rat FcRn expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 274: 8998-9005
- Stow JL, Fath KR, Burgess DR. 1998. Budding roles for myosin II on the Golgi. *Trends Cell Biol* 8: 138-41
- Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25: 243-51
- Styers ML, Kowalczyk AP, Faundez V. 2005. Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic* 6: 359-65
- Su T, Bryant DM, Luton F, Verges M, Ulrich SM, et al. 2010. A kinase cascade leading to Rab11-FIP5 controls transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *Nat Cell Biol* 12: 1143-53
- Svingos AL, Clarke CL, Pickel VM. 1999. Localization of the delta-opioid receptor and dopamine transporter in the nucleus accumbens shell: implications for opiate and psychostimulant cross-sensitization. *Synapse* 34: 1-10
- Svitkina TM, Borisy GG. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* 145: 1009-26
- Tanowitz M, von Zastrow M. 2003. A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. *The Journal of biological chemistry* 278: 45978-86
- Taunton J, Rowning BA, Coughlin ML, Wu M, Moon RT, et al. 2000. Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol* 148: 519-30
- Thomas DC, Brewer CB, Roth MG. 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J Biol Chem* 268: 3313-20
- Thompson A, Nessler R, Wisco D, Anderson E, Winckler B, Sheff D. 2007. Recycling endosomes of polarized epithelial cells actively sort apical and basolateral cargos into separate subdomains. *Mol Biol Cell* 18: 2687-97
- Toivola DM, Ku NO, Resurreccion EZ, Nelson DR, Wright TL, Omary MB. 2004. Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* 40: 459-66
- Tomasi TB, Jr., Zigelbaum S. 1963. The Selective Occurrence of Gamma-1a Globulins in Certain Body Fluids. *J Clin Invest* 42: 1552-60
- Traub LM, Bonifacino JS. 2013. Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a016790
- Trischler M, Koch-Brandt C, Ullrich O. 2001. Apical transport of osteopontin is independent of N-glycosylation and sialylation. *Mol Membr Biol* 18: 275-81
- Tsao PI, von Zastrow M. 2000. Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem* 275: 11130-40
- Tuma P, Hubbard AL. 2003. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83: 871-932
- Tuma PL, Nyasae LK, Backer JM, Hubbard AL. 2001. Vps34p differentially regulates endocytosis from the apical and basolateral domains in polarized hepatic cells. *J Cell Biol* 154: 1197-208

- Tzaban S, Massol RH, Yen E, Hamman W, Frank SR, et al. 2009. The recycling and transcytotic pathways for IgG transport by FcRn are distinct and display an inherent polarity. *J Cell Biol* 185: 673-84
- Urban J, Parczyk K, Leutz A, Kayne M, Kondor-Koch C. 1987. Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J Cell Biol* 105: 2735-43
- Valentijn K, Valentijn JA, Jamieson JD. 1999. Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval: insights from an old acquaintance. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 652-61
- Van der Sluijs P, Bennett MK, Antony C, Simons K, Kreis TE. 1990. Binding of exocytic vesicles from MDCK cells to microtubules in vitro. *J Cell Sci* 95 (Pt 4): 545-53
- Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Pichon C, Milgrom E. 1996. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry* 35: 1358-66
- Verrey F, Groscurth P, Bolliger U. 1995. Cytoskeletal disruption in A6 kidney cells: impact on endo/exocytosis and NaCl transport regulation by antidiuretic hormone. *J Membr Biol* 145: 193-204
- VuHai-LuuThi MT, Misrahi M, Houllier A, Jolivet A, Milgrom E. 1992. Variant forms of the pig lutropin/choriogonadotropin receptor. *Biochemistry* 31: 8377-83
- Wang E, Brown PS, Aroeti B, Chapin SJ, Mostov KE, Dunn KW. 2000a. Apical and basolateral endocytic pathways of MDCK cells meet in acidic common endosomes distinct from a nearly-neutral apical recycling endosome. *Traffic* 1: 480-93
- Wang W, Loh HH, Law PY. 2003. The intracellular trafficking of opioid receptors directed by carboxyl tail and a di-leucine motif in Neuro2A cells. *J Biol Chem* 278: 36848-58
- Wang X, Kumar R, Navarre J, Casanova JE, Goldenring JR. 2000b. Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J Biol Chem* 275: 29138-46
- Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, et al. 2008. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135: 535-48
- Wehrle-Haller B, Imhof BA. 2001. Stem cell factor presentation to c-Kit. Identification of a basolateral targeting domain. *J Biol Chem* 276: 12667-74
- Weisz OA, Rodriguez-Boulan E. 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* 122: 4253-66
- Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ. 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385: 265-9
- Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, et al. 2002. Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297: 615-20
- Wisco D. 2003. Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *The Journal of Cell Biology* 162: 1317-28
- Xue X, Jaulin F, Espenel C, Kreitzer G. 2010. PH-domain-dependent selective transport of p75 by kinesin-3 family motors in non-polarized MDCK cells. *J Cell Sci* 123: 1732-41
- Yap CC, Wisco D, Kujala P, Lasiecka ZM, Cannon JT, et al. 2008. The somatodendritic endosomal regulator NEEP21 facilitates axonal targeting of L1/NgCAM. *J Cell Biol* 180: 827-42
- Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic 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: 929-40
- Yui N, Lu HA, Chen Y, Nomura N, Bouley R, Brown D. 2013. Basolateral targeting and microtubule-dependent transcytosis of the aquaporin-2 water channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C38-48

- Zerial M, McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-17
- Zhao H. 2012. Membrane trafficking in osteoblasts and osteoclasts: new avenues for understanding and treating skeletal diseases. *Traffic* 13: 1307-14
- Zoudilova M, Min J, Richards HL, Carter D, Huang T, DeFea KA. 2010. beta-Arrestins scaffold cofilin with chronophin to direct localized actin filament severing and membrane protrusions downstream of protease-activated receptor-2. *J Biol Chem* 285: 14318-29