



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

“La localización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en células del epitelio pigmentario de la retina depende de la expresión de la subunidad β_2 “

TESIS

Que presenta

M. en C. Jorge Alberto Lobato Álvarez

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad

FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directora de la Tesis

Dra. Liora Zrihen Nahon de Shoshani

Ciudad de México

Enero, 2017

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA TUTORIA DE LA DRA. LIORA ZRIHEN NAHON PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

LOS DOCTORES RUBEN GERARDO CONTRERAS PATIÑO Y LA LA DRA MONICA LAMAS GREGORI ASESORARON ESTE PROYECTO, Y LOS DOCTORES MARIA EUGENIA DEL CARMEN MENDOZA GARRIDO, FEBE ELENA CAZÁRES RAGA Y ABELARDO ANTONIO RODRÍGUEZ REYES REVISARÓN LA TESIS Y FUERON SINODALES DEL EXAMEN FINAL. UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A TODOS ELLOS POR SUS COMENTARIOS QUE ENRIQUECIERON EL TRABAJO A LO LARGO DE ESTOS AÑOS.

EL MAESTRO EN CIENCIAS JORGE ALBERTO LOBATO ALVAREZ RECIBIO EL APOYO ECONÓMICO DEL CONACyT DURANTE EL TIEMPO EN QUE SE REALIZÓ ESTE PROYECTO.

REGISTRO DE BECARIO NÚMERO: 219172

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO CON EL PROYECTO CONACyT (48798) OTORGADO A LA DRA. LIORA ZHRIEN NAHON.

DEDICATORIAS

A Dios por haberme dado la fortaleza, inteligencia, constancia, fé y demostrarme que sin él no se logra nada y por enseñarme a disfrutar de mi vida a pesar de las circunstancias.

A mi Madre[†] Maria Laura Alvarez Gutierrez que desde el cielo me ha abierto el camino y siempre ha estado a mi lado.

A mi Padre Julio Lobato Leal que siempre estuvo al pie del cañón, trabajando día y noche para que no me faltara casa, comida ni sustento. Por enseñarme a decir “yo puedo” ante las adversidades y mostrarme el ejemplo que hasta lo más difícil se puede llegar a realizar. Gracias por hacerme un hombre de trabajo, con herramientas para poder salir adelante en la vida.

A mis hermanos David y Christian por apoyarme y hacerme saber que siempre están ahí para escucharme y motivarme para seguir adelante.

A Sol Abigail Duarte Estrada y su familia por apoyarme, acompañarme, reír, llorar y siempre estar a mi lado. Por enseñarme a mirar lo hermoso de la vida y mostrarme que siempre existen personas en las que podemos confiar para apoyarnos, aun en las tormentas más fuertes. GRACIAS POR ENSEÑARME QUE UNA FAMILIA ESTA EN LAS BUENAS Y LAS MALAS.

A todos mis familiares y amigos por ser pilar de mi existencia y enseñarme a disfrutar la vida con su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Liora Zrihen Nahon de Shoshani** por creer en mi desde el principio y ver que en mi había una gran persona con muchas capacidades intelectuales. Por su confianza en llevar un proyecto tan importante en su laboratorio y no perder su fé. Por la entrega en cuerpo y alma a mi trabajo y su gran paciencia y dedicación a mi formación como investigador. Le refrendo mi profunda admiración y respeto y mi eterno agradecimiento.

A los **Doctores María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido y Rubén Gerardo Contreras Patiño, Mónica Lamas Gregori** por su apoyo y confianza que me han brindado, además quiero agradecerles por su amistad y su franqueza en cada uno de sus comentarios.

A la **M. en C. María Luisa Roldán Gutiérrez** por aportar sus grandes conocimientos para la realización de esta tesis, así como su amistad y apoyo en situaciones personales.

A la **Q.F.B. Lourdes Alarcón** por brindarme su amistad y apoyo en todo momento, por darme la paciencia requerida para llevar a cabo mi trabajo y por tener una amiga de gran corazón y consejera.

A la **Técnico Rosalía Aguirre Carrasco** por su lealtad, trabajo y dedicación incondicional en el mantenimiento del laboratorio. Además te doy las gracias por tu apoyo técnico en la realización de esta tesis así como el compañerismo dado.

A **Gabriel Sanchez y Ernesto Anell Solís** por su amistad, por su apoyo administrativo y por enseñarme que a pesar de las circunstancias siempre contare con ustedes. Los quiero un Buen!!!

A mis compañeros de **laboratorio Claudia, Tere y Omar** por compartir su vida académica conmigo durante tanto tiempo así como apoyarme en la realización de este trabajo. Les agradezco por todos los consejos dados y por calmarme en momentos claves de mi formación.

A **todos mis compañeros y amigos del CINVESTAV** que me hicieron ver lo bello que es estar en esta institución, así como recordarme que la ciencia también bien se disfruta con las personas que quiero.

A **JesúsAlberto Macias** por sus consejos y su amistad inamalgamable, además de enseñarme a ser una persona íntegra, cabal y amorosa. A **mis amigos de Espacio TuYo** les agradezco por revelarme el camino del desarrollo del integral, por las experiencias vividas a lo largo de estos años, así como su compañía y su amistad incondicional. Gracias a ustedes conocí una gran familia. Los quiero!!!

Y a ti por interesarte en conocer mi trabajo

¡GRACIAS!

INDICE

ABSTRACT	8
RESUMEN	9
PRÓLOGO	10
INTRODUCCIÓN	
• <i>Los epitelios</i>	13
• <i>La Unión Oclusora (OU)</i>	13
• <i>La polaridad celular</i>	14
• <i>La Na⁺,K⁺-ATPasa: estructura y función</i>	16
• <i>La polaridad de la Na⁺,K⁺-ATPasa</i>	19
• <i>La subunidad β participa en el mecanismo de polaridad de la de la Na⁺,K⁺-ATPasa</i>	20
• <i>La N-glicosilación de la subunidad β₂ funciona como señal de polarización</i>	24
• <i>El Epitelio pigmentario de la retina (EPR): Histología del ojo</i>	24
• <i>Características generales de las células EPR</i>	25
• <i>Funciones de las células EPR</i>	25
• <i>La polaridad de las proteínas en el epitelio pigmentario de la retina</i>	26
• <i>Mecanismos de polaridad en células EPR que podrían explicar el envío apical de la Na⁺,K⁺-ATPasa en células EPR</i>	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
MATERIALES Y METODOS	

• <i>Reactivos y anticuerpos</i>	32
• <i>Cultivo de células ARPE-19</i>	33
• <i>Cosecha de células (tripsinización)</i>	33
• <i>Siembra en Insertos</i>	33
• <i>Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET)</i>	34
• <i>Inmunoflorescencias (IF) e Inmunohistoquímica (IHQ)</i>	34
• <i>Procesamiento y análisis de las IF por microscopia</i>	35
• <i>Extracción de proteínas celulares</i>	35
• <i>Inmunodetección con Western Blot (WB)</i>	36
• <i>Ensayo de marcaje de proteínas de Superficie con biotina</i>	36
• <i>Silenciamiento de las isoforma β_1, β_2 y de Sp1</i>	37
• <i>RT-qPCR en tiempo real</i>	38
• <i>Análisis estadístico</i>	39

RESULTADOS

• <i>La subunidad β_2 de la Na^+, K^+-ATPasa se expresa en el dominio apical de las células EPR en el ojo humano</i>	40
• <i>Las células ARPE-19 son adecuadas para analizar el mecanismo de polaridad de la Na^+, K^+-ATPasa en el epitelio pigmentario de la retina (EPR)</i>	41
• <i>La sobre expresión de las isoformas α_2 y β_2 se lleva a cabo durante la re-morfogénesis</i>	44
• <i>El factor de transcripción Sp1 está involucrado en la regulación de la expresión de la subunidad β_2 en células ARPE-19 durante la re-morfogénesis</i>	47
• <i>La expresión apical de la Na^+, K^+-ATPasa en células ARPE-19 durante la re-morfogénesis está correlacionada con la expresión de las isoformas α_2 y β_2</i>	49

• <i>La Na⁺,K⁺-ATPasa no se estabiliza en el dominio apical de las células ARPE-19</i>	51
• <i>La co-localización de las subunidades α_2 y β_2 está presente en la membrana apical de células EPR de ojo humano adulto</i>	53
• <i>El silenciamiento de la expresión de la subunidad β_2 en células maduras de ARPE-19 disminuye la localización apical de la Na⁺,K⁺-ATPasa</i>	54
DISCUSIÓN	61
• <i>Las células ARPE-19 como modelo de estudio en el mecanismo de polarización de las células EPR</i>	62
• <i>El factor de transcripción Sp1 se expresa en las células ARPE-19 y está involucrado probablemente en la regulación de la expresión de la subunidad β_2</i>	64
• <i>La polarización apical aparente de los dímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$ en células ARPE-19</i>	65
• <i>Función fisiológica de los dímeros $\alpha_x\beta_x$ de Na⁺,K⁺-ATPasa en las células EPR</i>	67
• <i>El direccionamiento polarizado de las proteínas multiméricas de membrana es un mecanismo poco claro en las células EPR</i>	68
• <i>Enfermedades relacionadas con la subunidad β de la Na⁺,K⁺-ATPasa en los epitelios</i>	71
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS	73
LITERATURA CITADA	74
ANEXOS	89

ABSTRACT

Na^+, K^+ -ATPase, or the Na^+ pump, is a key component in the maintenance of the epithelial phenotype. In most epithelia, the pump is located in the basolateral domain. Studies from our laboratory have shown that the β_1 subunit of Na^+, K^+ -ATPase plays an important role in this mechanism because homotypic β_1 - β_1 interactions between neighboring cells stabilize the pump in the lateral membrane. However, in the retinal pigment epithelium (RPE), the Na^+ pump is located in the apical domain. The mechanism of polarization in this epithelium is unclear. We hypothesized that the apical polarization of the pump in RPE cells depends on the expression of its β_2 subunit. ARPE-19 cells cultured for up to 8 weeks on inserts did not polarize, and Na^+, K^+ -ATPase was expressed in the basolateral membrane. In the presence of insulin, transferrin and selenic acid (ITS), ARPE-19 cells cultured for 4 weeks acquired an RPE phenotype, and the Na^+ pump was visible in the apical domain. Under these conditions, Western blot analysis was employed to detect the β_2 isoform and immunofluorescence analysis revealed an apparent apical distribution of the β_2 subunit. qPCR results showed a time-dependent increase in the level of β_2 isoform mRNA, suggesting regulation at the transcriptional level. Moreover, the silencing of the expression of the β_2 isoform in ARPE-19 cells resulted in a decrease in the apical localization of the pump, as assessed by the mislocalization of the α_2 subunit in that domain. Our results demonstrate that the apical polarization of Na^+, K^+ -ATPase in RPE cells depends on the expression of the β_2 subunit.

RESUMEN

La Na^+, K^+ -ATPasa ó bomba de sodio, es un importante componente en el mantenimiento del fenotipo epitelial. En la mayoría de los epitelios, la bomba está localizada en el dominio basolateral. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la subunidad β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa juega un papel importante en este mecanismo, gracias a las interacciones homotípicas β_1 - β_1 entre las células vecinas que estabilizan a la bomba en la membrana lateral. Sin embargo, en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) la bomba de Na^+ está localizada en el dominio apical. Los mecanismos de polarización en estos epitelios no son claros. Nosotros proponemos que la polarización apical de la bomba en las células EPR depende de la expresión de la subunidad β_2 . Las células ARPE-19 cultivadas durante 8 semanas en insertos no se polarizan, y la Na^+, K^+ -ATPasa se expresa en la membrana basolateral. En presencia de insulina, transferrina y ácido selénico (ITS), las células ARPE-19 cultivadas durante 4 semanas adquirieron un fenotipo epitelial EPR y la bomba de Na^+ se observó en el dominio apical. Bajo estas condiciones, el ensayo de Western blot y el de inmunofluorescencia empleados para detectar a la isoforma β_2 revelan una aparente distribución apical de la subunidad β_2 . Los resultados obtenidos por RT qPCR muestran un incremento en las cantidades de ARNm de la isoforma β_2 a través del tiempo, sugiriendo una regulación transcripcional de esta isoforma. Además, el silenciamiento de la expresión de la isoforma β_2 en las células ARPE-19 resulta en la disminución de la localización apical de la bomba, así como la deslocalización de la subunidad α_2 en este dominio. Nuestros resultados demuestran que la polarización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en las células EPR depende de la expresión de la subunidad β_2 .

PRÓLOGO

La Na^+, K^+ -ATPasa ó bomba de Na^+ , es el principal intercambiador de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática en las células eucariotas.

La Na^+, K^+ -ATPasa es un heterodímero que está constituido principalmente por las subunidades α y β . Para que realice el transporte de iones a través de la membrana plasmática se requiere de ambas subunidades (Fambrough, 1988; Martin-Vasallo y col. 1989). La subunidad α es la responsable de las funciones catalíticas de la enzima (Ohtsubo y col. 1990). La subunidad β es una glicoproteína indispensable para la estabilización estructural y la maduración de la holoenzima (Geering y col. 1989; Ackermann y Geering 1990), y es la responsable del transporte de la subunidad α hacia la membrana plasmática (Noguchi y col. 1987; Martin-Vasallo y col. 1989). Finalmente, tiene una pequeña subunidad llamada γ que pertenece a la familia de proteínas FXYD y que modula la actividad catalítica de la Na^+, K^+ -ATPasa (Cortas y col. 1991).

En la mayoría de los epitelios, la Na^+, K^+ -ATPasa reside en la superficie basolateral (Cerejido y col. 1980; Ernst y Mills, 1980; Fambrough y Bayne 1983; Kashgarian, y col. 1985). La polarización de la Na^+, K^+ -ATPasa ha sido estudiada durante varios años tratando de contestar las siguientes preguntas ¿Cuál es el mecanismo de polarización de la bomba de sodio en los epitelios? y más específicamente ¿Cómo llega al dominio basolateral la proteína recién sintetizada? ¿Cuál es la maquinaria que la identifica como proteína basolateral y la dirige a ese dominio?

Varios estudios han demostrado que la enzima recién sintetizada es enviada de manera directa a la membrana plasmática lateral (Caplan col. 1986; Contreras y col. 1989 y 1995; Cerejido y col. 2001; Shoshani y col. 2005). Aunque está claro que la subunidad α tiene la información para enviar a la Na^+, K^+ -ATPasa a la membrana lateral en los epitelios (Mays y col, 1995), los esfuerzos para identificar esa secuencia amino acídica han sido infructuosos (Dunbar y col. 2000), por lo que se piensa que no existe una señal canónica como las que se conocen en otras proteínas basolaterales. Lo que sí queda claro es que una vez que llega a la

membrana lateral, la bomba de sodio se ancla al citoesqueleto de ankirina-fodrina (Hammerton y col. 1991; Muth y col. 1998).

En nuestro grupo de trabajo nos hemos interesado desde hace algunos años en el papel fisiológico de la Na^+, K^+ -ATPasa, en diferentes procesos celulares como la diferenciación, la adhesión celular y la polarización. Siendo eje fundamental de nuestros estudios el mecanismo de polaridad de la Na^+, K^+ -ATPasa, nos hemos enfocado en demostrar que la subunidad β de la bomba juega un papel importante en este mecanismo. Los trabajos del laboratorio demostraron que la subunidad β_1 funciona como molécula de adhesión homotípica en los epitelios. Una vez que llega a la membrana lateral ésta se asocia con la subunidad β_1 de la célula vecina y estabiliza a la bomba en este dominio (Shoshani y col. 2005). La retención específica de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana lateral se debe a la interacción directa entre las subunidades β_1 de las células vecinas (Padilla-Benavidez y col. 2010) y es parte esencial en el mecanismo de polarización de la bomba en los epitelios.

Sin embargo, existen casos excepcionales de algunos epitelios en los que la Na^+, K^+ -ATPasa se polariza en el dominio apical, como por ejemplo: el epitelio del plexo coroideo del cerebro y el Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR). Por lo que nos preguntamos ¿Cuáles son los mecanismos de polarización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en aquellos epitelios? Nosotros pensamos que la subunidad β juega un papel importante en la polarización apical también y planteamos que la polaridad de la bomba de sodio en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) está relacionada con la expresión de isoformas β específicas.

Se conocen tres isoformas de la subunidad β que se expresan en diferentes tejidos y se diferencian principalmente por su grado de N-glicosilación. Mientras que las isoformas β_1 y β_3 tienen tres sitios de N-glicosilación, la β_2 tiene 7. Se ha postulado que la N-glicosilación funciona como señal de polarización, debido a que las subunidades β_1 y β_3 se encuentran en el dominio basolateral y β_2 en el dominio apical. Con estos antecedentes nos dimos a la tarea de estudiar la participación de la subunidad β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa en el mecanismo de polaridad de la bomba, en el epitelio pigmentario de la retina. En el presente trabajo nos

enfocaremos en contestar la siguiente pregunta: **¿La subunidad β_2 es la responsable de la polaridad apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en células EPR?**

Además este trabajo es el primero en su tipo gracias a que resuelve una pregunta que tiene 40 años aproximadamente sin resolverse **¿Cómo se polariza la Na^+, K^+ -ATPasa en el dominio apical?** Base fundamental para entender los procesos formativos de los epitelios y explicar la asociación y mantenimiento de los fotoretores con las células EPR.

Al mismo tiempo nuestra investigación pretende relacionar los mecanismos de polaridad apical en las células EPR con los demás epitelios para su correcto funcionamiento y entender los procesos de desarrollo para enfermedades de la retina como Retinitis pigmentosa y Retinoblastomas en donde está alterado el fenotipo epitelial en varios niveles. Estas enfermedades afectan a una parte de la población mexicana, dejando a los pacientes invalidos visulamente y comprometiendo su vida laboral y física a corto y largo plazo.

INTRODUCCIÓN

Los epitelios

Los epitelios forman fronteras entre los organismos superiores y su medio que regulan el paso de iones y sustancias a la vez, evitan que dichas sustancias difundan libremente entre los compartimientos biológicos que los separan. Estos tejidos mantienen la homeostasis de los compartimientos que les permite, por ejemplo: la absorción de nutrientes en el intestino, la secreción de ácido clorhídrico hacia la luz del estomago, el transporte de las hormonas a la sangre y la recuperación de glucosa, aminoácidos y vitaminas en el intestino y el riñón (González-Mariscal y col. 2008 y Nejsun y Nelson 2009). Para dar una idea de la importancia de los epitelios, digamos que sin ellos no habría organismos multicelulares, pues la homeostasis depende de un intenso intercambio de sustancias que realizan los epitelios.

Las células epiteliales tienen dos características esenciales que les confieren su función: la formación de uniones ocluseras (UO) y la polaridad celular (Fig. 1).

La Unión Oclusera (OU)

La unión oclusera o unión estrecha (Tight Junction en Ingles) constituye una compuerta al tránsito paracelular y una cerca a la difusión intramembranal de lípidos y proteínas (Farquhar y col. 1963; Chalcroft y col. 1970; Cerejido y col. 2003 y 2004). La UO se forma de dos tipos de proteínas: transmembranales, que establecen contactos entre las células vecinas, tales como ocludina, claudinas y JAMs, y periféricas que forman un andamio que unen a las transmembranales con el citoesqueleto de actina (Farquhar y col. 1963; Chalcroft y col. 1970; Cerejido y col. 2008). Las proteínas de andamiaje, también llamadas adaptadoras tienen múltiples dominios de unión a proteínas, lo que las convierte en una plataforma de unión para diversas moléculas en un sitio específico de la membrana. Además las uniones estrechas, dividen a la célula epitelial en 2 dominios membranales: apical y basolateral, cada uno está constituido por diferentes lípidos y proteínas que confieren características particulares a las células que las expresan.

La polaridad celular

Los epitelios son asimétricos desde el punto de vista estructural, bioquímico y funcional. La membrana plasmática de las células epiteliales se dividen en dos dominios: Apical y Basolateral (Ussing y col. 1974; Cerejido y col. 1978; 1980). La composición proteica de los dominios apicales y basales varía entre las células epiteliales especializadas de acuerdo con la función que el epitelio realice. Así los epitelios de transporte especializados en la absorción de nutrientes, tienen una composición de los dominios de su membrana plasmática distinta de los que realizan la secreción de hormonas. Las proteínas de la membrana plasmática se seleccionan y clasifican en la red trans tubular de Golgi (TGN; Nejsun y Nelson 2009; Cerejido y col. 2003) gracias a que contienen secuencias específicas de aminoácidos llamadas señales de polaridad. Las señales de direccionamiento basolateral son: señales de Tirosina (YxxΦ.NPXY), Dileucina (D/ExxxLL) (Matter y col., 1992; Matter, 2000; Marmorstein, 2001; Jacob y col. 2000) y una sola Leucina, principalmente (Deora y col. 2004). Las señales apicales son N- u O- glicosilaciones (Scheiffele y col. 1995, Yeaman y col. 1997; Vagin y col. 2005); lípidos de anclaje como glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Lisanti y col. 1989; Scheiffele y col. 1997), dominios trans-membranales y por selección e interacción con los dominios colesterol-esfingolípidos llamados también balsas lipídicas (Simons y Ikonen 1997).

Las proteínas seleccionadas por su señal basolateral son reconocidas por los complejos protéicos epitelio-específicos de proteínas adaptadoras AP-1, ya sea del tipo A, B, ó 4 y clathrina, bajo la regulación de proteínas pequeñas que unen el GTP y tienen actividad de GTPasas (González y Rodríguez-Boulán, 2009; Weisz y Rodríguez-Boulán, 2009; Lehman y col. 2014) y luego se envían a endosomas de reciclamiento basolateral (Weisz y Rodríguez-Boulán, 2009; Lehmann y col. 2014). Las proteínas enviadas al dominio apical se seleccionan y clasifican en TGN, enriqueciendo la membrana con glicoesfingolípidos y colesterol durante la formación de balsas lipídicas (Simons y Ikonen 1997) y también mediante la asociación con lectinas como la galectina (Delacour y col. 2005; 2006; 2008; Stechly y col. 2009; Mishra y col. 2010). Las vesículas con proteínas apicales viajan a la membrana apical con ayuda de motores de dineina y microtubulos (Tai y col. 2001). Las

proteínas una vez reconocidas por estos mecanismos pueden ser enviadas por dos rutas diferentes:

- a) **Directa:** Los componentes se transportan directamente al dominio donde ejercen su función, por ejemplo las proteínas ancladas a glicosfingolípidos que suelen ser enviadas al dominio apical de las células epiteliales y las proteínas que contienen secuencias aminoacídicas NPXY ó LL que son llevadas al dominio basolateral (Marmorstein, 2001; Jacob y col. 2000).
- b) **Indirecta:** Los componentes se envían a un dominio y luego se endocitan para enviarlas al dominio opuesto. Esto sucede por ejemplo en enterocitos y hepatocitos en donde algunas proteínas se llevan al dominio basolateral del epitelio para luego endocitarse y redirigirse al dominio apical (Hu y col. 1994; Rodriguez-Boulan y col. 2005).

La localización correcta de las proteínas en el dominio de membrana es crucial para el transporte epitelial. La expresión despolarizada o mal polarizada de las proteínas de membrana puede producir desordenes metabólicos asociados a defectos en la homeostasis del agua y de la sal, tales como diabetes, falla renal crónica y obstrucciones uretrales (Nejsum y Nelson, 2009) y algunas variantes de cancer.

En el laboratorio queremos conocer y entender los mecanismos celulares y moleculares que controlan la polaridad de las proteínas de transporte y el papel que juegan en el mantenimiento homeostático. En especial nos interesamos en la Na^+, K^+ -ATPasa, también llamada bomba de sodio.

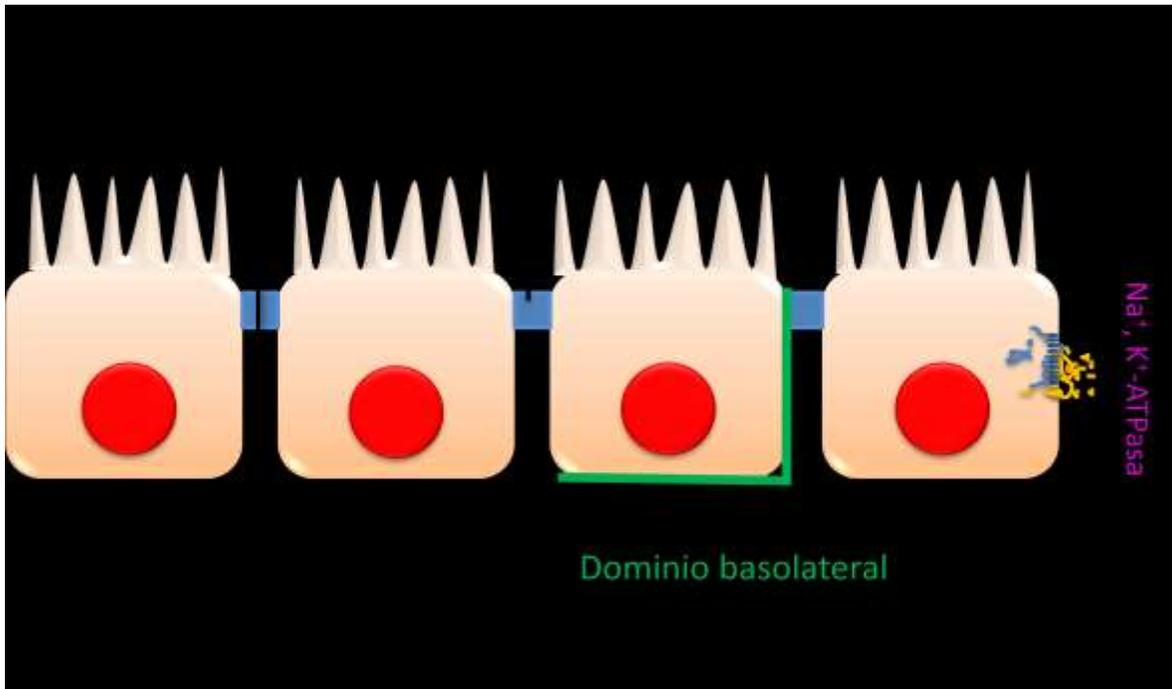


Figura 1. Ilustración de monocapa epitelial. Células epiteliales unidas por la unión estrecha (UE) que constituye una compuerta al tránsito paracelular y una cerca a la difusión intramembranal de lípidos y proteínas entre el dominio basolateral y apical. La Na^+, K^+ -ATPasa se ubica en el dominio lateral de las células epiteliales.

La Na^+, K^+ -ATPasa: estructura y función

La Na^+, K^+ -ATPasa fue descubierta en 1957 (Skou, 1957) y juega un papel importante en la generación de los gradientes iónicos, el mantenimiento de la osmolaridad (la regulación de la concentración de solutos dentro de la célula), así como la regulación del volumen celular y el potencial eléctrico de la membrana (Koefoed-Johnsen y Ussing 1953; Cereijido y col. 1978; Blanco y Mercer, 1998 y Jaitovich y Bertorello, 2006). La enzima toma 3 Na^+ del citoplasma y los intercambia por 2 K^+ extracelulares, en contra de sus respectivos gradientes electroquímicos y a expensas de la hidrólisis de una molécula de ATP. La Na^+, K^+ -ATPasa es inhibida específicamente por los esteroides cardiotónicos, que son un grupo de sustancias cuyo miembro más conocido es la ouabaina, que se considera una hormona que modula la presión arterial. Recientemente se publicó la estructura del cristal

de la Na^+, K^+ -ATPasa compuesta por sus tres subunidades (α , β y γ ; Morth y col. 2007 y Shinoda y col. 2009; Figura 2).

La subunidad α tiene aproximadamente 1000 aminoácidos y pesa alrededor de 110 kDa. Esta organizada en 10 dominios transmembranales y entre los dominios M4 y M5 se encuentran los sitios de unión e hidrólisis del ATP, así como el de unión al Na^+ (Sweadner 1989; Hammerton y Shrank, 1988; Pedemonte y Kaplan 1990; Mercer, 1993; Blanco y Mercer 1998; Dunbar y col. 1997 Cereijido y col. 2003). Entre M5 y M7 se localiza el sitio de unión del K^+ (Shinoda y col. 2009). Se han descrito 4 isoformas α en mamíferos: α_1 – α_4 (Shull, 1985; 1986; Sverdlov y col. 1987; Mercer y col. 1988; Shamraj y Lingrel 1994) que exhiben algunas diferencias en la afinidad por los cationes y la ouabaina. La subunidad α se expresa en distintos tejidos y en distintos momentos durante el desarrollo, por ejemplo: la isoforma α_1 se expresa en todos los tejidos (Jørgensen, 1990; Skou y Esmann, 1992; Glynn, 1993), α_2 solamente en el músculo esquelético (Hundal y col. 1992; Lavoie y col. 1997), adipositos (Lytton y col. 1985), corazón (Zahler y col. 1992), y cerebro (McGrail y col. 1991), α_3 en cerebro (Hieber y col. 1991; McGrail y col. 1991) y α_4 en los espermatozoides (Shamraj y Lingrel, 1994).

La subunidad β tiene 300 aminoácidos, un peso de 35 kDa y es esencial en el ensamble y maduración de la bomba (Geering y col. 1989; McDonough y col. 1990; Ackermann y Geering, 1990; Blanco y col. 1994; Chow y Forte 1995) además de tener una función de modulación por la afinidad del Na^+ y K^+ (Jaisser y col. 1992; Eakle y col. 1994; 1995; Blanco y col. 1995 a y b) El ensamble de la subunidad β con la α es necesaria para que la bomba tenga actividad catalítica (Noguchi y col. 1987; Fambrough, 1988; Takeyasu y Kawakami, 1989) y es indispensable para el envío de la bomba de sodio hacia la membrana plasmática sin esta asociación esto no sucedería (Noguchi y col. 1987; Martin-Vasallo y col. 1989). Se conocen tres isoformas β en mamíferos que varían en su grado de N-glicosilación: la β_1 tiene 3 sitios de N-glicosilación y β_3 2 sitios, mientras que la isoforma β_2 puede tener desde siete a nueve sitios de N-glicosilación dependiendo de la especie (Martin-Vasallo y col., 1989; Gloor y col. 1990; Chow y Forte, 1995; Besirli y col. 1997).

Además las isoformas β tienen una expresión tejida específica: La isoforma β_1 su expresión es ubicua, β_2 se encuentra en músculo esquelético (Lavoie y col. 1997), glándula pineal (Shyjan y col. 1990) y tejido nervioso (Peng y col. 1997) y β_3 está presente en testículos, retina, hígado y pulmón (Arystarkhova y Sweadner, 1997; Malik y col. 1996).

Las funciones principales de la isoforma β_1 son como molécula de adhesión celular en los epitelios (Shoshani y col. 2005; Vagin y col. 2006; Vagin y col. 2008), co-localiza con E-cadherina en el sitio de las uniones adherentes y esparte fundamental en la formación de dichos contactos (Geering, 2001) y tiene un papel importante en la polarización celular (Shoshani y col. 2005; Vagin y col. 2006; Rajasekaran y col. 2005). La isoforma β_2 además de ser un componente estructural de la Na^+, K^+ -ATPasa, actúa como molécula de reconocimiento en la superficie celular y participa en la adhesión entre astrocitos y neuronas del cerebro (Gloor y col. 1990), así como en la polarización de la bomba de Na^+ (Vagin y col. 2005).

La subunidad γ (FXYD2) está compuesta por 58 aminoácidos y pesa 6.5 kDa. Su función es modular la afinidad de la subunidad α por el Na^+ , el K^+ y el ATP (Cortas y col. 1991; Lopina, 2000). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas FXYD, caracterizada por tener un motivo extracelular invariante Phe-Xxx-Tyr-Asp. un solo dominio transmembranal y la capacidad de interactuar con la Na^+, K^+ -ATPasa y alterar sus propiedades cinéticas (Sweadner y col. 2000; Garty y Karlish, 2006; Geering 2006). En mamíferos existen siete miembros de la familia FXYD que regulan la función de la Na^+, K^+ -ATPasa en distintos tejidos. Un miembro de esta familia es FXYD5 (también se le conoce como “disadherina”) que además duplica la velocidad máxima (V_{max}) de la bomba (Lubarski y col. 2005 y 2007; Miller y col. 2008) también exhibe un dominio extracelular mucho más largo (Sweadner y col. 2000) poco conservado que se caracteriza por una abundancia de residuos S, P y T susceptibles de ser O-glicosilados (Lubarski y col. 2007; Tsuiji y col. 2003). Recientemente, Tokhtaeva y col. (2016) demostraron que el dominio O-glicosilado extracelular de FXYD5 interfiere con la unión intercelular β_1 - β_1 y disminuye la adhesión entre células vecinas, por lo que constituye un regulador de la adhesión intercelular.

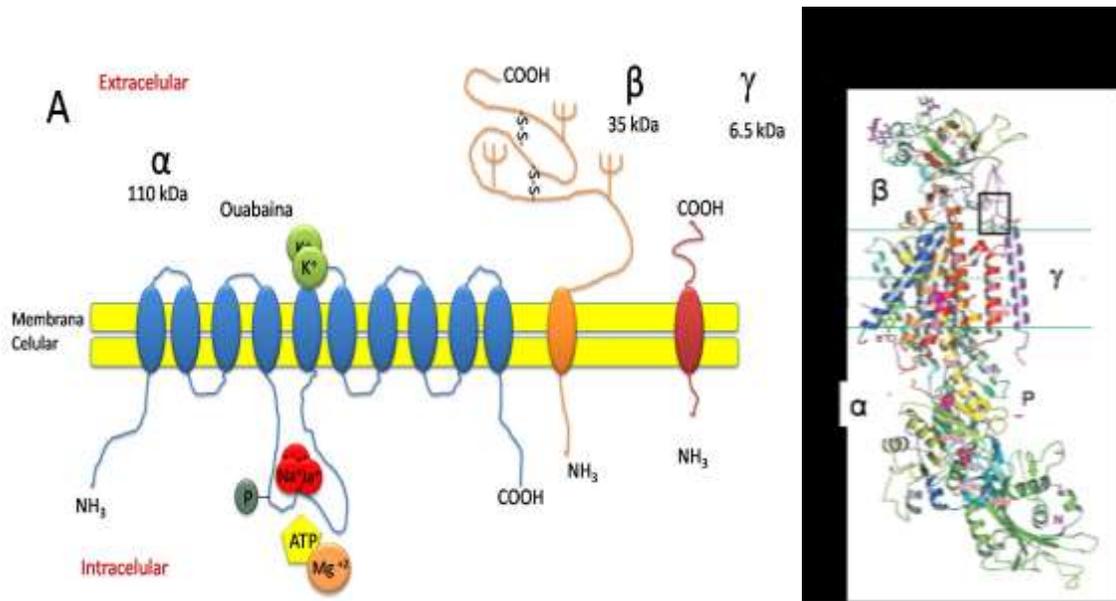


Figura 2. Estructura y cristal de la Na^+, K^+ -ATPasa. A) Ilustración de la bomba de sodio con las subunidades que la componen (α , β , y γ). La subunidad α es la que cumple la función catalítica de la holoenzima (con un sitio de unión al Na^+, K^+ , ATP y de fosforilación) existen cuatro isoformas α ; la subunidad β es la que permite la maduración e inserción de la bomba en la membrana plasmática y existen tres isoformas β ; y la subunidad γ es la que regula la actividad de la α . B) Estructura del cristal de la Na^+, K^+ -ATPasa (Shinoda y col. 2009), en donde se puede observar la distribución espacial y la unión de las diferentes subunidades que la conforman.

La polaridad de la Na^+, K^+ -ATPasa

Para explicar el transporte vectorial del Na^+ a través de los epitelios, Koefoed-Johnsen y Ussing (1958) propusieron que la bomba de Na^+ estaba en la porción de la membrana plasmática orientada hacia el interior del organismo, también llamado: dominio basolateral. Años más tarde se demostró que en efecto, la Na^+, K^+ -ATPasa reside en la superficie basolateral en la mayoría de los epitelios (Cerejido y col. 1980; Ernst y Mills, 1980; Fambrough y Bayne 1983; Kashgarian, y col. 1985). Para explicar esta localización asimétrica se propusieron 2 diferentes mecanismos que no se contraponen: 1) la bomba de Na^+ recién sintetizada pasa por la Red Transtubular de Golgi, donde es reconocida, seleccionada y enviada a la membrana lateral de manera directa (Caplan y col. 1986; Contreras y col. 1989; Dunbar y Caplan, 2000), y 2) es entregada indistintamente a todos

los dominios de la membrana plasmática, pero retenida selectivamente mediante el anclaje al citoesqueleto de ankyrina/fodrina (Hammerton y col. 1991). Hoy se sabe que la entrega de la bomba de sodio a su dominio lateral se produce a través de una vía directa aun no identificada, pero si por alguna razón está no se ancla o se expresa equivocadamente en el dominio apical, la célula la internaliza (Contreras y col. 1989). Recientemente Farr y col. (2009) mostraron que el mecanismo de entrega directa de la Na^+, K^+ -ATPasa es independiente del complejo AP-1, (Folsch y col. 1999) y tan pronto llega la enzima a la membrana basolateral se ancla al citoesqueleto de Fodrina (Espectrina) a través de la proteína Ankyrina, adquiriendo así una estabilidad funcional (Nelson y Veshnock, 1987; Nelson y col. 1991). La espectrina consiste de un tetrámero de $\alpha_2\beta_2$ espectrina que están entrecruzados con los filamentos de actina formando una doble cadena. La Ankyrina es un adaptador entre la subunidad β de spectrina y el dominio citoplasmático de diversas proteínas integrales incluida la subunidad α de la Na^+, K^+ -ATPasa (Platt y col. 1993; Bennett, 1990; Liu y col. 2008). La actina y/o espectrina se asocian también con el complejo cadherina/catenina. Por otro lado se ha demostrado que la subunidad α_1 tiene la información para enviar a la Na^+, K^+ -ATPasa a la membrana lateral en los epitelios (Mays y col, 1995), sin embargo los esfuerzos para identificar una secuencia aminoacídica que funciona como señal lateral en la subunidad α_1 no han sido concluyentes (Dunbar y Caplan, 2000). Por lo tanto hasta la fecha no se conoce por completo el mecanismo por el cual la bomba de sodio se dirige a la membrana basolateral.

La subunidad β participa en el mecanismo de polaridad de la de la Na^+, K^+ -ATPasa

Las observaciones y hallazgos hechos en nuestro laboratorio muestran que la subunidad β de la bomba funciona como molécula de adhesión y gracias a esta propiedad participa también en la polarización de la bomba, hecho que no se había considerado anteriormente. A continuación mencionaré las evidencias y observaciones hechas por nosotros, así como por otros laboratorios que en conjunto apuntan a que la subunidad β juega un papel crucial en la polaridad de la bomba de sodio en los epitelios:

- a) La subunidad β es una glicoproteína tipo II que tiene un dominio intracelular corto (N-terminal), un solo dominio trans-membranal y uno extracelular largo altamente glicosilado con tres puentes disulfuro (ectodominio). Gloor y col. (1990) encontraron que la molécula de adhesión de la glia (AMOG) es en realidad la isoforma β_2 de la bomba. En *Drosophila* esta subunidad es componente de las uniones septadas, importante en la función de barrera paracelular y en la diferenciación del epitelio traqueal. La eliminación de la porción extracelular de la subunidad β produce la pérdida del direccionamiento y de la adhesión celular en *Drosophila* (Paul y col. 2007). Por lo tanto la subunidad β podría estar implicada en la adhesión celular y también en la polaridad de la bomba de sodio.
- b) Las células epiteliales de diferentes especies forman uniones estrechas entre sí (González-Mariscal y col. 1989 y Contreras y col. 2002), sin embargo al mezclar células Ma104 (epiteliales de riñón de mono) con células MDCK (epiteliales de riñón de perro), se observó que en los contactos heterotípicos (de diferentes especies) las células MDCK no expresan a la subunidad β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana lateral, a pesar de que sí forman uniones ocluseras con estas células (Contreras y col. 1995; Shoshani y Contreras, 2001; Shoshani y col. 2005; Fig. 3A). Esto sugiere que la distribución polarizada de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana lateral depende del tipo de Na^+, K^+ -ATPasa que exprese la célula vecina (Contreras y col. 1995; Padilla-Benavides y col. 2010), además se ha observado que la bomba de sodio de una célula epitelial se polariza siempre que la célula vecina exprese la misma subunidad β (Shoshani y col. 2005).
- c) Los fibroblastos CHO, provenientes del ovario de hámster chino, no forman contactos celulares además de no tener polarizadas las proteínas como en los epitelios. Si a estas células se les transfecta la subunidad β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa de perro (CHO- β), las células se vuelven más adhesivas formando agregados celulares con forma epitelioide (Shoshani y col. 2005; Fig. 3B y C).
- d) Al co-cultivar las CHO- β con células MDCK se observa que éstas expresan a la bomba tanto en los contactos heterotípicos como en los homotípicos (de la misma especie) (Fig. 3D y E), sugiriendo que se requiere de la misma subunidad β_1 en la

célula vecina para que estas estabilicen a la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana del contacto (Shoshani y col. 2005) comportamiento similar al de las moléculas de adhesión.

- e) Padilla-Benavides y col. (2010) demostraron que las subunidades β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa interactúan directamente, en el espacio extracelular, con otras β_1 idénticas de la célula vecina (Fig. 3F).
- f) Estudios *in silico* y de cristalización revelan que el lóbulo C-terminal del ectodominio de la subunidad β tiene un plegamiento parecido a una Ig-like (Bad-Dinitz y col. 2009) sugiriendo fuertemente que ésta proteína tiene función de molécula de adhesión (Beggah y col. 1997; Shoshani y col. 2005) que puede estar involucrada en la homodimerización con otra subunidad β . Bab-Dinitz y colaboradores también habían propuesto que la subunidad β_1 se podía heterodimerizar con otras moléculas de adhesión como las nectinas. En particular las nectinas y la Na^+, K^+ -ATPasa se encuentran en los sitios de contacto célula-célula de las células epiteliales (Rajasekaran y col. 2001; Sakisaka y col. 2007). Sin embargo, nuestros intentos de detectar interacciones heterotípicas de la subunidad β_1 epitelial con basigina, proteína de adhesión de la súperfamilia de Ig-like, no fueron exitosos (Tesis de Maestría de Teresa del Carmen López Murillo).

En conjunto, la retención específica de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana lateral de las células epiteliales, mediada por la interacción directa entre subunidades β_1 de células vecinas es parte esencial del mecanismo de polarización de la bomba.

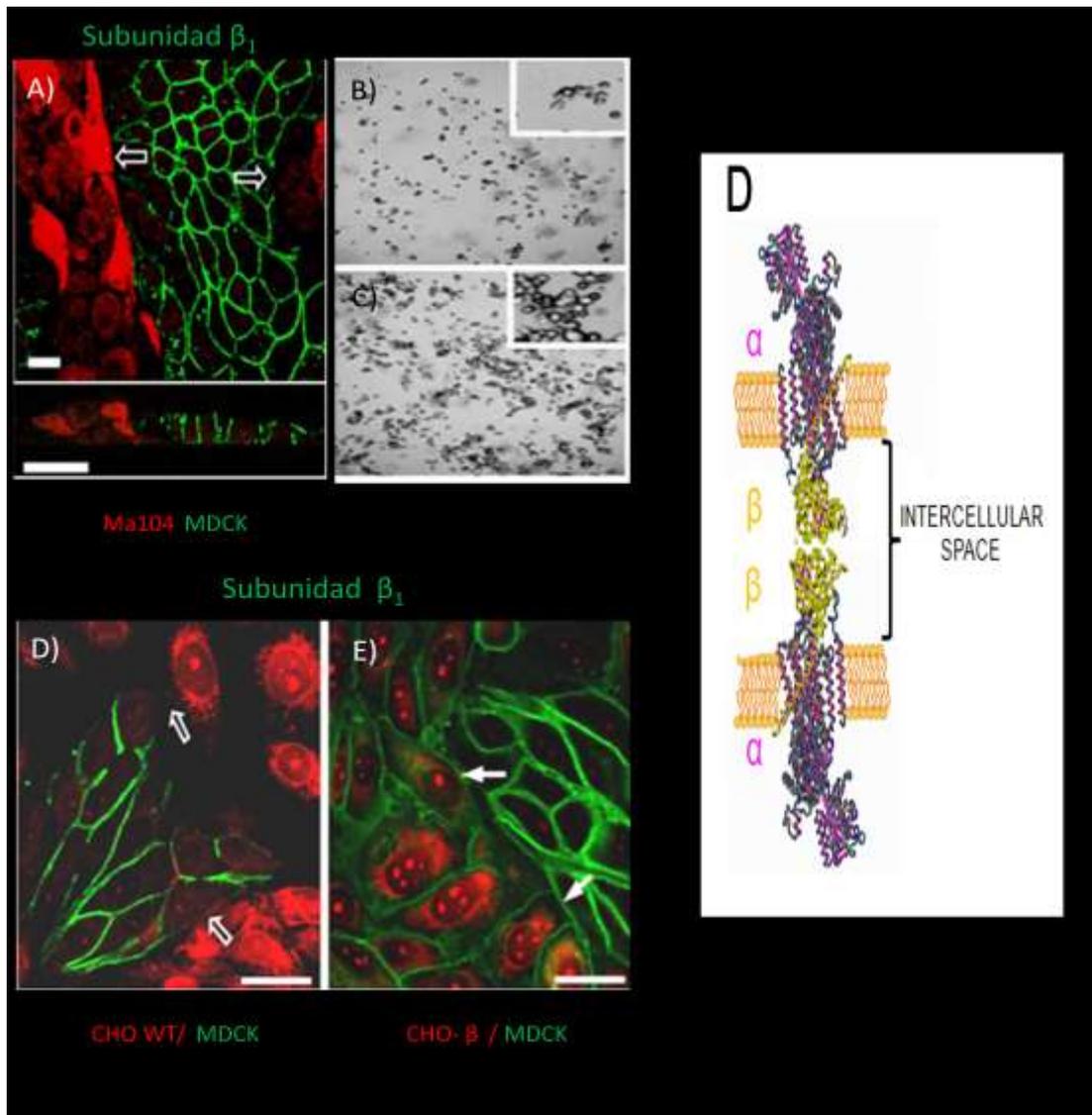


Figura 3. La subunidad β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa es una molécula de adhesión en epitelios y es crucial para la polaridad lateral de la bomba. A) Co-cultivos de células MA-104 (riñón de mono) y MDCK (riñón de perro) teñidas con el anticuerpo contra la subunidad β_1 de perro. Las flechas muestran las uniones heterotípicas de las células MDCK y MA-104 en donde no se coloca la bomba de sodio. B) Células CHO wild type (Ovario de hámster chino) en suspensión. Se puede observar pocos agregados celulares. C) Células CHO transfectadas con la subunidad β_1 de perro en donde se puede apreciar los agregados celulares. D y E) Co-cultivos CHO wt y CHO- β_1 con MDCK respectivamente, utilizando un anticuerpo contra la subunidad β_1 canina. Las flechas indican las uniones heterotípicas de los cultivos. F) se representa la unión directa en el espacio intracelular de las subunidades β_1 en el cristal de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana lateral de cada célula.

La N-glicosilación de la subunidad β_2 funciona como señal de polarización

Aun cuando en la mayoría de las células epiteliales la bomba se expresa en la cara lateral de la membrana, existen casos excepcionales en donde la bomba se encuentra en el dominio apical como son las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR; Miller y col. 1978; Steinberg y Miller, 1979; Bok, 1982; Gundersen y col. 1991), las del plexo coroideo en el cerebro (Wright, 1972), las células renales e intestinales en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Ernst y Mills, 1980) y en la glándula salival de la cucaracha (Just y Walz, 1994). Además se ha reportado que en algunos casos patológicos, los epitelios revierten la polaridad de la Na^+, K^+ -ATPasa como es el caso del riñón poliquístico (PCKD) y células gástricas cancerígenas humanas (HGT-1). En este sentido, Vagin y col. (2005) demostraron que la polarización apical invertida de la Na^+, K^+ -ATPasa en células de HGT-1 está asociada con la expresión de la isoforma β_2 . Al parecer la cantidad de N-glicosilaciones que tiene la isoforma β_2 comprada con la isoforma β_1 constituye una señal de polarización apical. Si se agregan N-glicosilaciones a la subunidad β_1 en los sitios correspondientes a la isoforma β_2 , la isoforma β_1 se expresa en el dominio apical, como lo haría la subunidad β_2 nativa (Vagin y col. 2005). Por otro lado, si se inhibe la glicosilación de la subunidad β_2 , ésta no se ensambla con la subunidad α e impide que llegue a la membrana plasmática (Vagin y col. 2004). Por lo tanto, el cambio en la expresión de las isoformas provoca un cambio en la polaridad de la bomba. Con esto en mente nosotros especulamos que la polaridad apical de la bomba de sodio en las células EPR está relacionada con la expresión de la isoforma β_2 .

El Epitelio pigmentario de la retina (EPR): Histología del ojo

El globo ocular en los mamíferos está compuesto por tres capas epiteliales principales: la 1^a y la más externa es la esclerótica, de color blanco, sólida y resistente; la 2^{da} es la capa intermedia ó coroides, contiene abundantes vasos sanguíneos; y por último la 3^{ra} capa la retina, que contiene a las células sensibles a la luz (los conos y bastones; Newell, 1993) y al epitelio pigmentario de la retina en su base (fig. 4).

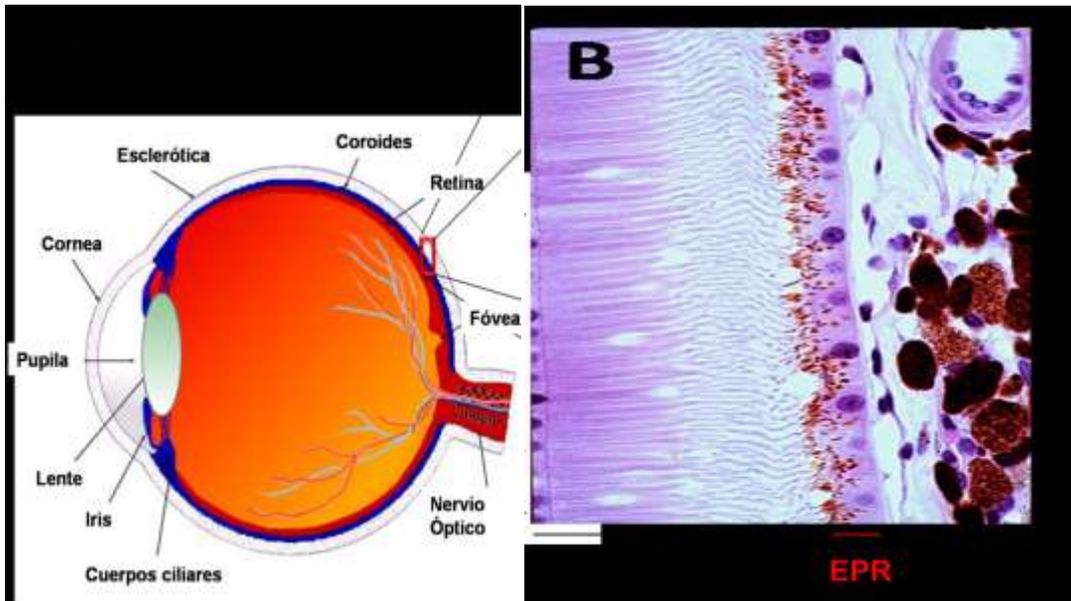


Figura 4. Ubicación del epitelio pigmentario en el ojo. a) Corte transversal del ojo humano en donde se pueden apreciar las distintas capas que lo conforman; b) Corte histológico de la retina en donde se puede apreciar el EPR entre los fotorreceptores y la coroides.

Características generales de las células EPR

Las células del EPR se caracterizan por formar un epitelio simple, hermético, cuboidal, con microvellos apicales y con una matriz extracelular compuesta principalmente con laminina. Vistas desde la superficie muestran una notable organización poligonal y con numerosos gránulos citoplasmáticos de pigmento que le dan el nombre al epitelio (Marmorstein, 2001; Burke, 2008). Una exploración más cuidadosa muestra que las células EPR difieren en tamaño, forma (fusiforme ó epiteloide), densidad y contenido de gránulos de melanina formando un mosaico celular (Burke y Hjelmeland, 2005). En el ojo el EPR expresa diferencialmente E, P y N-cadherina en sus uniones adherentes, siendo N-cadherina la más abundante, a diferencia con los epitelios clásicos en donde la E-cadherina es la principal (Philp y col. 1998).

Funciones de las células EPR

Las células EPR se encuentran en íntimo contacto con la coroides y los fotorreceptores. Las células EPR regulan el transporte vectorial de moléculas e iones entre ellos, y se consideran

una barrera hemato-retiniana. Además secretan componentes de la matriz extracelular que sella los espacios intercelulares entre las células EPR y los fotorreceptores (Burke y Hjelmeland, 2005). Las células del EPR proveen de nutrientes a los fotorreceptores y eliminan sus desechos, permitiendo que mantengan una tasa metabólica elevada (Marmorstein, 2001), y fagociten activamente los fragmentos celulares que diariamente pierden las células fotosensibles, a razón de un 10% de su longitud por día, como resultado de su funcionamiento (Burke, 2008; Fig. 5).

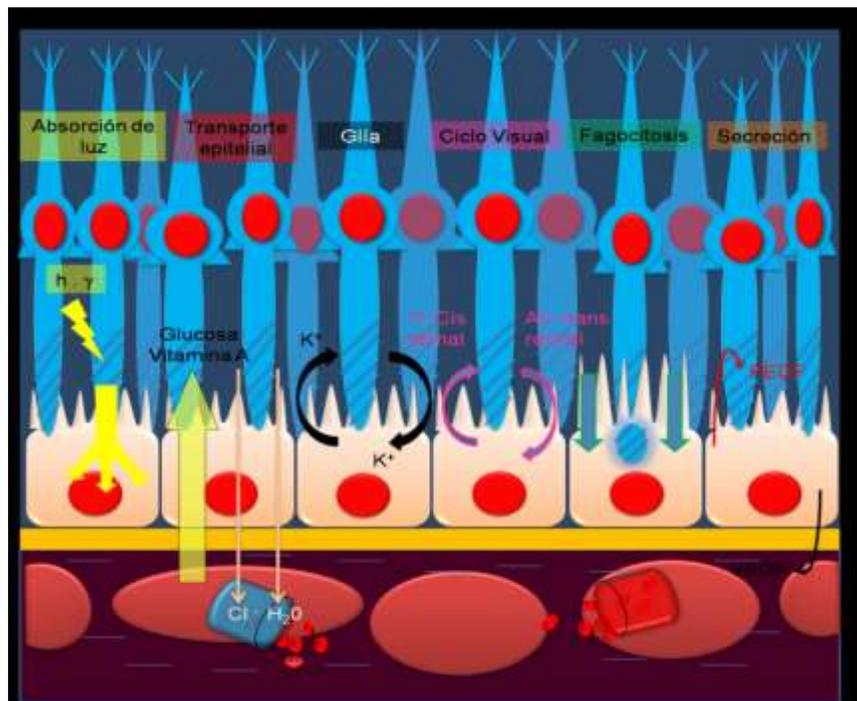


Figura 5. Imagen ilustrativa donde se representan las funciones del epitelio pigmentario de la retina (EPR). En azul están representados los fotorreceptores, en rosa las células EPR y debajo de ellas la coroides con sus vasos sanguíneos.

La polaridad de las proteínas en el epitelio pigmentario de la retina

Para que se lleve a cabo la foto-transducción, es indispensable el mantenimiento de altas concentraciones de Na^+ extracelular en el espacio sub retinal. Para que esto ocurra es necesaria una polaridad invertida de los canales y bombas en células del EPR. La Na^+, K^+ -ATPasa normalmente está polarizada en el dominio basolateral de las células epiteliales,

manteniendo el bombeo de Na^+ que ayuda a la reabsorción de fluidos en el riñón, gracias a que forma gradientes de concentración que impulsa el movimiento de otras bombas y canales (Jørgensen, 1990). Las células EPR se localiza a ala bomba de Na^+ en la membrana apical y concentra el Na^+ en el compartimento sub retinal, necesario para llevar a cabo el ciclo visual.

La polaridad invertida en las células EPR no está solamente restringida a la Na^+, K^+ -ATPasa (Hu y Bok, 2001; Maminishkis y col. 2006; Sonoda y col. 2009), sino también a otras proteínas, por ejemplo: N-CAM (Okami y col. 1990; Gundersen y col. 1993), EMMPRIN/CD 147 (Marmorstein y col. 1996; Deora y col. 2004 y 2005), el transportador de Lactato MCT1 (Philp y col. 1998), JAM-C (Daniele y col. 2007) y posiblemente CFTR (Gallemore y col. 1998), **lo que es fundamental para que estas células cumplan con su función específica: el mantenimiento de los fotorreceptores.** La incorrecta dsitrbución de las proteínas conllevaría a la muerte de los fotorreceptores o su desprendimiento causando ceguera o algún tipo de desorden metabólico y celular. Con estos agrumentos destacamos la importancia de entender el mecanismo de polarización de la bomba de Na^+ que es importante en el mantenimiento del ciclo visual.

Mecanismos de polaridad en células EPR que podrían explicar el envío apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en células EPR

Las primeras observaciones de que la Na^+, K^+ -ATPasa está polarizada en el dominio apical, en células EPR fueron realizadas por Miller y colaboradores en 1973, usando la unión de ouabaina maracada radiactivamente. Existen tres modelos que podrían explicar la polaridad invertida de la bomba de Na^+ : I) la selectiva estabilización por interacción con el citoesqueleto apical. II) el seleccionamiento basado en la red trans-tubular de Golgi que la envía de manera directa o indirecta a la superficie apical de las células. III) en la ausencia de un seleccionamiento activo de la polaridad apical que podría simplemente reflejar la inherente asimetría de las células EPR (Marmorstein, 2001). Sin embargo ninguno de ellos han podido explicar satisfactoriamente la polaridad de la bomba.

Experimentos realizados en células MDCK demuestran que la Na^+, K^+ -ATPasa se retiene en el dominio basolateral mediante la unión al citoesqueleto de ankirina/fodrina (Hammerton y col. 1991). Esos datos sugirieron que el citoesqueleto puede participar en la polaridad apical de la bomba de Na^+ en células EPR. Gundersen y col., (1991), encontraron que el citoesqueleto de ankirina/fodrina es ensamblado por debajo de la superficie apical del EPR de ratas y propusieron que esto podría explicar la polarización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa. Sin embargo Rizzolo y Zhou (1995) demostraron que en el EPR de pollo esto no sucede pues la α -espectrina proteína análoga a la fodrina está presente a lo largo de la membrana plasmática basolateral y termina por debajo de la superficie apical (microvellos) en estructuras parecidas a telarañas, por lo que concluyendo que no puede polarizar a la bomba en el dominio apical.

Con estas evidencias surge la siguiente pregunta: **¿Cuáles son los mecanismos involucrados en la polaridad “invertida” de las proteínas de transporte y en específico de la Na^+, K^+ -ATPasa, en el EPR?**

Nosotros pensamos que las isoformas de la subunidad β juegan un papel crucial en este mecanismo y planteamos que la polaridad de la bomba de sodio en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) está relacionada con la expresión diferencial de sus isoformas β (β_1 , β_2 y β_3). Estas isoformas se diferencian por su grado de N-glicosilación, mientras que β_1 y β_3 tienen tres sitios de N-glicosilación, β_2 tiene de 7 a 9 sitios según la especie (por ejemplo la subunidad β_2 de rata tiene 5 N-glicosilaciones mientras que la de humano tiene 8); y se postula que la N-glicosilación funciona como señal de polarización, debido a que las subunidades β_1 y β_3 se encuentran en el dominio basolateral y β_2 en el dominio apical. Sin embargo, esto no se había demostrado en las células EPR y fue durante mi tesis de maestría donde demostré que existe una expresión diferencial de las isoformas β en ARPE-19 (línea celular inmortalizada del Epitelio Pigmentario de la Retina de origen Humano). En el presente trabajo nos enfocamos en tratar de contestar las siguientes preguntas: **¿Cómo se polariza la Na^+, K^+ -ATPasa en el dominio apical de las células EPR? ¿Tiene algún componente regulatorio para su expresión?**

y ¿La subunidad β_2 tiene un papel importante en dicho mecanismo?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El modelo experimental que elegimos para estudiar los mecanismos de polaridad de la Na^+, K^+ -ATPasa en el EPR es la línea celular ARPE-19 proveniente del ojo de un donador humano y se generó a partir de la necesidad de tener un modelo experimental que asemeje las características de dicho tejido (Dunn y col. 1996). La línea celular ARPE-19 tarda de 8 a 10 semanas, desde el momento en que es sembrada en adquirir el fenotipo EPR. Ese proceso denominado **re-morfogénesis** implica la adquisición del fenotipo epitelial que consiste en la expresión de N-cadherina en las uniones adherentes, la expresión de la Na^+, K^+ -ATPasa en el dominio apical y de marcadores moleculares tejido específicos como RPE-65 (proteína constitutiva de los melanocitos) y CD147 (Subunidad accesoria de los transportadores de monocarboxilato), así como la formación de los pigmentos característicos de este epitelio (Burke, 2008).

Durante la maestría investigué, la expresión diferencial de las isoformas de la subunidad β en ARPE-19 durante la re-morfogénesis. Encontré que la subunidad β_1 se expresa constantemente a lo largo del tiempo y está ubicada en la membrana basolateral al igual que la subunidad β_3 , sin embargo ésta se expresa a partir de la 8a semana. Por otro lado la subunidad β_2 la observamos a partir de la 6a semana en el dominio apical (Fig. 6).

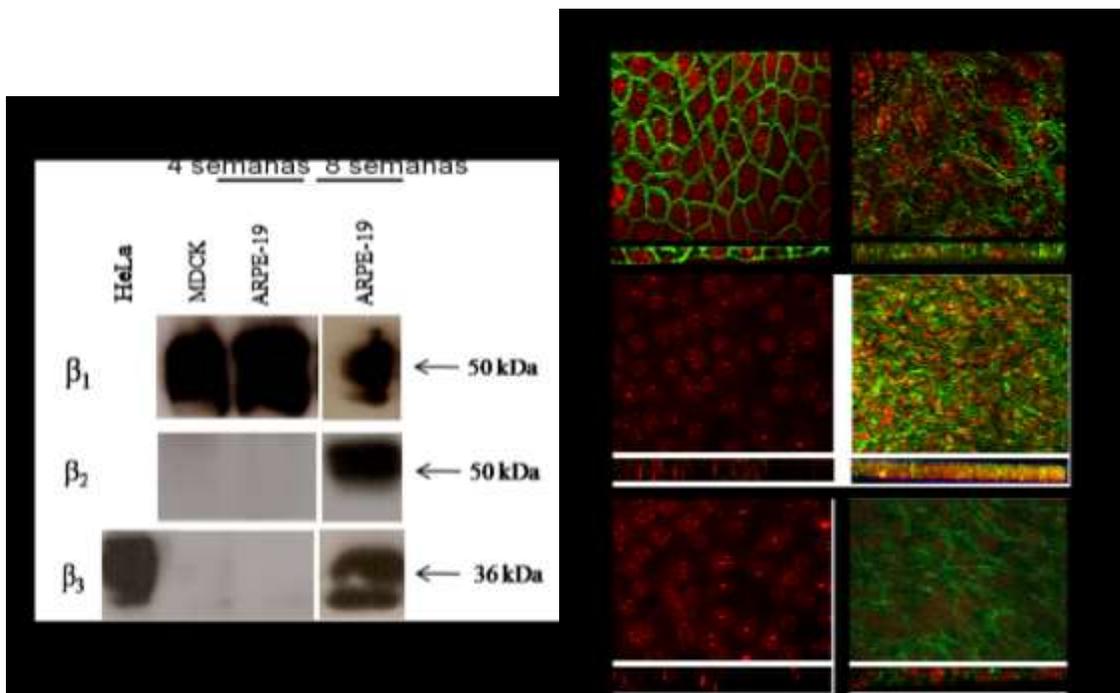


Figura 6. Western Blot (WB) e Inmunoflorescencias (IF) de las isoformas β de la Na^+, K^+ ATPasa en ARPE-19. Lado izquierdo, WB de las distintas isoformas de la subunidad β a las 4 y 8 semanas de cultivo, como controles se utilizaron a las células MDCK y HeLa. Lado derecho IF de las isoformas β en MDCK y ARPE-19 de 8 semanas de cultivo.

Las células ARPE-19, presentan mosaicismo celular es decir, que en un mismo cultivo de la misma edad, se expresan células de distintos tipos, lo que da origen a los “parches” observados en el microscopio. Así, los cultivos de células del EPR muestran parches de células fusiformes alternados con otros de células poligonales que expresan N- o E-Cadherinas (Burke y Hjelmeland, 2005). Las células ARPE-19 no siempre expresan a la Na^+, K^+ -ATPasa en el dominio apical. Todo eso indica que el proceso de re-morfogénesis es heterogéneo bajo las condiciones de cultivo usadas, y que falta algún factor más que produzca la polarización apical de la bomba. Cabe recordar que durante el cultivo de este epitelio, las células no interactúan con los segmentos externos de los fotorreceptores como lo harían en su medio natural.

Durante el proceso de re-morfogénesis observamos que las isoformas β se expresan diferencialmente en distintos tiempos (pudiendo tener un componente de regulación a nivel

transcripcional o traduccional), según se desarrolla la polarización dominio específica, siendo la isoforma β_2 la que se expresa exclusivamente en el dominio apical. Por lo tanto, la pregunta central que nos hacemos en esta tesis es:

¿Cómo se regula la expresión de la isoforma β_2 , y si es esencial en la polaridad apical de la Na^+, K^+ -ATPasa durante el proceso de re-morfogénesis en las células ARPE-19?

Para tratar de contestar dicha pregunta hemos planteado la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La expresión de la isoforma β_2 es esencial para la polarización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en las células ARPE-19.

OBJETIVO GENERAL

-Demostrar que la subunidad β_2 juega un papel importante en la regulación de la polaridad apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en células ARPE-19.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Analizar a que nivel está regulada la subunidad β_2 (transcripcional o traduccional).*
- 2. Investigar si el factor de transcripción Sp1 está relacionado con la regulación transcripcional de la subunidad β_2 .*
- 3. Estudiar la expresión polarizada de la subunidad β_2 en las células del EPR.*
- 4. Silenciar la subunidad β_2 y analizar si está involucrada en la polaridad apical de la Na^+, K^+ -ATPasa.*

MATERIALES Y METODOS

Reactivos y anticuerpos

Los siguientes reactivos fueron usados: DMEM, F12, PBS and FBS (GIBCO Cat. 12100-061, Cat 21700-026, Cat. 21300-058 and Cat. A15-751), penicilina y estreptomina (10,000 U/ μ g/ml, In Vitro, A-01), tripsina-verseno (In Vitro Cat. EN-005), laminina (SIGMA-ALDRICH Cat. L2020), ITS (mezcla de insulina, transferrina humana y ácido selénico, BD Biosciences Cat. 354352), CaCl_2 (GIBCO, In vitro, Cat. 87-5155), Suero de Albúmina Bovina (BSA) (Research Organics, Cat. 1331-a), Tween (GE Healthcare, Cat. 17-1316-01), Kit de inhibidores de proteasas (GE Healthcare, Cat. 80-6501-23), sistema de detección de quimio luminiscencia (ECL Plus; Amersham Biosciences Cat. RPN2132), EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo scientific, 21331), esferas de estreptavidina-agarosa. (Gibco, 5942SA), Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat.11668-019), Kit-Cy3 de marcaje de siRNA (Ambion by Life Technologies Cat. AM1632), Sp1 siRNA (Sta. Cruz Cat. sc-29488), siRNA β_1 and β_2 (FlexiTube siRNA QIAGEN: SI04284966, SI04249098, SI04173134, SI03149909, SI04273003, SI04138162, SI04274543, SI04284014), the Light Cycler-Fast Start DNAMaster SYBR Green I Kit (Roche, (Applied Biosystems, 4309159), y reactivo de ensayo de BCA protein (Thermo Scientific, 23224 y 23223).

Los siguientes anticuerpos fueron usados: anti- α_1 Na^+ , K^+ -ATPasa hecho en ratón (IF: Novus NB300-146), anti- α_2 Na^+ , K^+ -ATPasa hecho en conejo (Thermo Scientific, PA5-25725), anti- β_1 Na^+ , K^+ -ATPasa hecho en ratón (IF: Bio Reagents No. Cat MA3-93; WB Novus 464.8), anti- β_2 Na^+ , K^+ -ATPasa hecho en conejo (WB Transduction Laboratories No. Cat. BD610915 and IF Biorbit orb10952), anti- β_3 Na^+ , K^+ -ATPasa hecho en ratón (Transduction Laboratories No. Cat. BD610992), anti-Ezrina hecho en conejo (Sigma E1281), anti- β -catenina hecho en ratón (Invitrogen 13-8400), anti-N-cadherina hecho en ratón (IF: ZYMED No. Cat. 333900), anti-CD147 hecho en ratón (Bioscience No. Cat. 555961), Alexa 488 o 594 hecho en burro contra ratón o conejo IgG (Invitrogen, A11094, A21207, A21203 and A21202), Ioduro de Propidio (Sigma-Aldrich, No. Cat. P4170), TO-PRO (Invitrogen, T3605), Hoechst (Invitrogen H21491), anticuerpos anti-ratón y anti-

conejo peroxidados (Zymed California, Cat. 62-6520 y 62-6120), and FITC-phalloidina (Sigma Chemical).

Cultivo de células ARPE-19

Se utilizó la línea celular ARPE-19, obtenida del epitelio pigmentario de la retina de un donador adulto masculino de 19 años (ATCC, Cat. CRL-2302). Las células fueron sembradas a una densidad de 3×10^5 células/cm² en cajas petri de 78.54 cm² y fueron mantenidas en una incubadora Stericult 200 (Forma Scientific) a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5 % de CO₂. Solo se utilizaron células del 5° al 20° pasaje. El medio de cultivo utilizado fue Medio Dulbeco Modificado con alta glucosa (DMEM) con suero bovino fetal al 10% (SBF) y 1% mezcla de penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml para mantenimiento, con cambios de medio cada 3er día.

Cosecha de células (tripsinización)

Las monocapas confluentes se lavaron 3 veces con amortiguador salino de fosfato (PBS) sin Ca⁺² y se incubaron a 37°C en una solución de tripsina-verseno aproximadamente por 2 min. Una vez disgregada la monocapa, se sembraron los insertos como se describe a continuación:

Siembra en Insertos

Se utilizaron insertos de poliéster claro, tamaño de poro 0.4 µm, diámetro 6.5 mm ó 25 mm (Costar® Corning Incorporated, Cat. 3470 y 3450).

Se tomaron 100 ó 700 µl de la suspensión celular de ARPE-19 (dependiendo del inserto que se utilice 6.5 o 25 mm de diámetro) y se sembraron dentro del filtro (previamente tratado con laminina a una concentración de 10 µg/ml), a una densidad de 2.5×10^5 células/cm². Las células se incubaron en medio de cultivo CDMEM (completado con antibióticos y 10% de suero fetal bobino) a 37 °C, 5% de CO₂ con cambio de medio cada tercer día. A la semana de cultivo se les cambio el medio de cultivo por una mezcla 1:1 de

DMEM y F12, 1% de suero de bovino fetal e ITS y antibióticos. Las células se mantuvieron en cultivo durante 6 semanas.

Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET)

La formación de uniones oclusoras (OU) en el epitelio fue analizada por medio de la RET a lo largo de las 6 semanas de cultivo. La RET fue medida en las células ARPE-19 con un voltímetro epitelial/End Ohm (World Precision Instruments inc., Modelo EVOM), y los datos fueron adquiridos a temperatura ambiente. Los valores finales fueron evaluados restando el valor de resistencia del medio en un inserto sin células con respecto a los medidos en los insertos con células. Los valores presentados son el promedio \pm el error estándar en $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Inmunoflorescencias (IF) e Inmunohistoquímica (IHQ)

Se procesaron insertos con células ARPE-19 cultivadas durante distintos tiempos (2 a 6 semanas). Las muestras se fijaron con metanol absoluto a -20°C por 10 minutos y se incubaron con solución de bloqueo que contenía PBS con Ca^{+2} y 3% de albúmina de suero bovino (BSA) durante una hora a 37°C ó a 4°C toda la noche. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido (10 a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dependiendo del anticuerpo utilizado) en solución de bloqueo a 37°C por 1 hr., se hicieron 6 lavados rápidos con Tween al 0.05% en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado diluido en solución de bloqueo (10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 45 minutos a 37°C (utilizando Alexa 488 ó 594 contra ratón o conejo). Se lavaron nuevamente con PBS-Tween y 2 veces con PBS frío. Se tiñeron los núcleos con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ioduro de Propidio o TO-PRO 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 10 min. a temperatura ambiente y finalmente se lavaron 3 veces con agua desionizada. Para la detección de filamentos de actina, las células fueron fijadas con paraformaldehído y marcadas con FITC-phalloidina.

Las muestras de ojos humanos fueron proporcionadas por el servicio de patología del hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes” APEC de la Ciudad de México. Las muestras de ojos seleccionadas para este estudio fueron las que no tuvieran lesiones en la retina. Estas

muestras fueron parafinadas para cortarlas en laminas de 5 μm de espesor y posteriormente montadas en laminillas. Para el marcaje de la subunidad β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas usando una serie de incubaciones con xileno (2-5 min y 1:1 xileno/etanol) y etanol (2 min. Cada uno al 100, 95, 80, y 70% etanol). Seguidos de tres lavados con PBS o agua. Las muestras fueron blanqueadas por incubación de KMnO_4 al 0.25% y PBS- Ca^{2+} por 30 min. Después se lavaron 3 veces con PBS- Ca^{2+} y fueron incubadas en ácido oxálico al 1% y lavadas nuevamente. La recuperación del antígeno fue hecha incubando con tripsina al 0.05% durante 10-30min. a 37°C. Las muestras fueron permeabilizadas usando Triton X-100 al 0.25% y SFB al 1% por 30 min. para posteriormente bloquearlas con Triton X-100 al 0.25% y SFB 10% durante 30-120 min. Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios (contra CD147 y subunidad α_2 y β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa) en permeabilización durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día, las muestras fueron lavadas tres veces e incubadas con el anticuerpo secundario (Alexa 488 o 594 anti ratón o conejo) por 1 hr. a 37°C. Las muestras fueron lavadas dos veces y el núcleo fue teñido con DAPI.

Tanto las muestras para IF como para IHQ se montaron en solución de montaje (VectaShield, Cat. H-1000, Vector Laboratories).

Procesamiento y análisis de las IF por microscopia

Las imágenes de microscopia se obtuvieron utilizando el Microscopio Confocal Leica TCS SP2 ó SP8 (Leica Microsystems, Heidelberg GMBH). La adquisición de imágenes fue realizada con el software LAS X (Leica Application Suite X) y el análisis de datos fue hecho con el programa ImageJ ® (1.42u Bethesda, MD) así como el análisis de la intensidad de fluorescencia relativa.

Extracción de proteínas celulares

Los cultivos celulares se lavaron 4 veces con PBS con Ca^{+2} y se lisaron con amortiguador de lisis (RIPA) (Tris 40mM pH 7.6, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Glicerol 10%, Triton X-100 1%, Desoxicolato de Sodio 0.5% y SDS 0.2%) complementado con inhibidores de

proteasas complete. El extracto celular se incubó en agitación a 4°C por 30 min. La monocapa se raspo con un gendarme de hule y las células se recogieron en un tubo eppendorf. Para sonicarse por 30 segundos a 25 Hz, o bien se pasaron de 10 a 20 veces a través de una jeringa de insulina y se centrifugaron a 15,000 x g durante 15 min. para remover el material insoluble (detritos celulares).

Se determinó la cantidad de proteínas totales por el método de BCA. Los extractos celulares se desnaturalizaron en amortiguador de muestra 4x, calentándolos a 90°C por 5 minutos y se analizaron por electroforesis en gel y Western Blot.

Inmunodetección con Western Blot (WB)

Las muestras se separaron por electroforesis a 100 v constantes por 140 minutos, en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS) al 10%, cargando de 20 a 30 µg de proteína en cada pozo. La transferencia de las proteínas del gel a membrana de PVDF (polivinildeno difluorido) (Amersham Life Science, Cat. RPN303F) se realizó en cámara semi-seca (BIO-RAD, Trans Blot SD Cell 221BR) a 20 volts constantes por 35 minutos. La membrana se incubo en solución de bloqueo (TBS-Tween con 10% de leche descremada marca Svelty y 3% de BSA) a 4°C por toda la noche. Se utilizaron anticuerpos específicos para cada proteína a una dilución de 1:1000, según las especificaciones del fabricante. Los anticuerpos secundarios correspondientes a ratón ó conejo que están acoplados a la peroxidasa de rábano se utilizaron a una dilución de 1:10,000. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia usando el reactivo ECL plus en palcas fotográficas para quimioluminiscencia (GE Healthcare, Cot. 28906839). Los inmunoblots fueron cuantificados por densitometría usando el programa ImageJ 1.43u.

Ensayo de marcaje de proteínas de superficie con biotina

Las células ARPE-19 se cultivaron por 4 semanas en insertos de poliéster como se describió anteriormente. La monocapa de células fue marcada con biotina incubándola dos veces con 1 mg/ml de EZ-LinK Sulfo-NHS-SS-Biotina durante 45 min. Después de detener el marcaje lavando con solución de Glicina, las células se enjuagaron y lisaron para

posteriormente solubilizar las membranas, incubando con 200 μ l de PBS (pH de 8.0), Triton X-100 al 1% e inhibidor de proteasas. Las células lisadas fueron centrifugadas a 15,000 x g por 10 min. El sobrenadante recuperado de las muestras fue mezclado con amortiguador de muestra y cargado en geles de acrilamida al 10% para determinar el total de proteína de las células ARPE-19.

Las proteínas biotiniladas que fueron separadas del resto del sobrenadante se incubaron con 100 μ l de solución de agarosa acoplada a estreptavidina en un volumen total de 150 μ l de amortiguador de lisis durante toda la noche a 4°C en continuo movimiento rotatorio. Las esferas adheridas al complejo estreptavidina-biotina-proteína fueron lavadas 6 veces con PBS (pH 8.0), Triton X-100 al 1% y NaCl al 150 mM. Las proteínas fueron separadas de las esferas incubando las muestras con amortiguador de muestra durante 5 min. a 80°C, para posteriormente analizarlas por WB usando anticuerpos primarios contra la subunidad β_2 de la Na⁺,K⁺-ATPasa y N-cadherina humana.

Silenciamiento de las isoforma β_1 , β_2 y de Sp1

Las células ARPE-19 cultivadas por 4 semanas fueron transfectadas con siRNA contra la subunidad β_1 o β_2 de la Na⁺,K⁺-ATPasa o contra Sp1 de humano en monocapas distintas. Las células se lavaron tres veces con medio sin suero ni antibióticos y se preparo el medio de transfección con el reactivo Lipofectamina 2000 y 250 y 700 ng/ μ l de siRNA para la subunidad β_1 y β_2 respectivamente y 75 pmoles/ μ l de siRNA para Sp1. Posteriormente se agregaron los complejos de Lipofectamina 2000-oligonucleotidos a cada monocapa celular y se incubó a 37°C durante 48 horas. Como control del experimento transfectamos solamente la lipofectamina a las células. El medio de transfección fue removido y las células fueron procesadas para inmunofluorescencias, RTqPCR en tiempo real ó WB para estimar la eficiencia del silenciamiento. Los siRNAs de la subunidad β_2 de la Na⁺,K⁺-ATPasa y Sp1 fueron premarcados con el Kit de marcaje de siRNA Cy3 de acuerdo al protocolo del fabricante (Ambion by Life Technologies).

RT-qPCR en tiempo real

Diseño de oligonucleótidos: Se alinearon las secuencias de las isoformas β con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Para identificar las secuencias distintas entre ellas. Luego se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada isoforma con el programa Primer3 input (v.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y se corroboró la especificidad de cada oligonucleótido por medio de una RT PCR *in silico* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/antisentido.cgi>) para posteriormente enviarlos a sintetizar:

β_2 sentido GAGCTTCGTTCCACAGCTTC y antisentido CCCACCAAACCGTCTAGAAA; β_1 sentido AGGCGTACGGTGAGAACATT y antisentido GGGAAAGATTTGTGCTTGTGA; β_3 sentido TCGAGTACTCCCCGTAACGA y antisentido AGGCTCTGGTTGAGGGACTT; α_1 sentido GAAGCAAGACGTCCTGGAAT y antisentido TTTCAGTCTTTCCGGGTGTT; α_2 sentido CTACCCTGTTGCTTTGGCTTTC y antisentido TGAGGGACCTTAGCGGGAGA y GAPDH sentido ACGGCACAGTCAAGGCTGAG and antisentido CAGCATCACCC- CATTTGATGTTGG.

Purificación y Cuantificación de ARN total: Se utilizaron insertos con células ARPE-19 cultivadas por 2, 4, y 6 semanas de cultivo. El ARN total se extrajo con la solución de Trizol seguido por precipitación con cloroformo, isopropanol y etanol. El ARN utilizado se purificó por columna el ARN total con el Kit RNAeasy (Marca QIAGEN) para obtener ARN total y se cuantificó con un espectrofotómetro. La integridad del ARN total se analizó por electroforesis en gel de agarosa.

Obtención de ADN complementario (ADNc): Se tomaron 3 μ g de ARN total y se le agregó oligo dT mas agua para incubarlos por 10 min a 70°C, después se colocó en hielo para detener la reacción. A esta misma muestra se le agregó amortiguador 5X, dNTPs e inhibidor de RNAasa y se incubó por 1 min. a 42°C, después se colocó en hielo y se agregó la enzima Super Scrip II, se incubó por 1 hr a 42°C y por 15 min. a 70°C, se detuvo la reacción a 4°C, para después cuantificar el ADNc y se almacenó a -20°C.

RT-qPCR: La síntesis y amplificación del ADNc se realizó mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ARNm obtenido de las células ARPE-19, empleándose el estuche de amplificación SYBR Green PCR Master Mix. La expresión diferencial de los genes analizados fue calculada normalizando los valores expresados con respecto a la expresión del gen GAPDH. Los datos fueron analizados usando la ecuación descrita por Livak (2001) (Cantidad total = $2^{-\Delta\Delta CT}$).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 4.00. Los datos mostrados son la media \pm el error estándar. La diferencia estadística fue determinada con una t-test no paramétrica y los valores por igual o por debajo de $P \leq 0.05$ fueron considerados significativos, con un 95% de confiabilidad en los estudios.

RESULTADOS

La subunidad β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa se expresa en el dominio apical de las células EPR en el ojo humano

Para probar si la expresión de la isoforma β_2 es crucial para la polarización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en células EPR, primero analizamos la expresión de dicha subunidad en la membrana apical del EPR de ojos humanos. Como marcador del dominio apical utilizamos a CD147/basigina, subunidad accesoria de los transportadores de monocarboxilato (MTC) esenciales en el transporte de Lactato. Como se muestra en las imágenes de secciones de ojos humanos, usando un anticuerpo específico para cada proteína (Fig.7), β_2 co-localiza con CD147 en el dominio apical. Estos datos demuestran que la Na^+, K^+ -ATPasa apical incluye a la isoforma β_2 en el EPR de humanos.

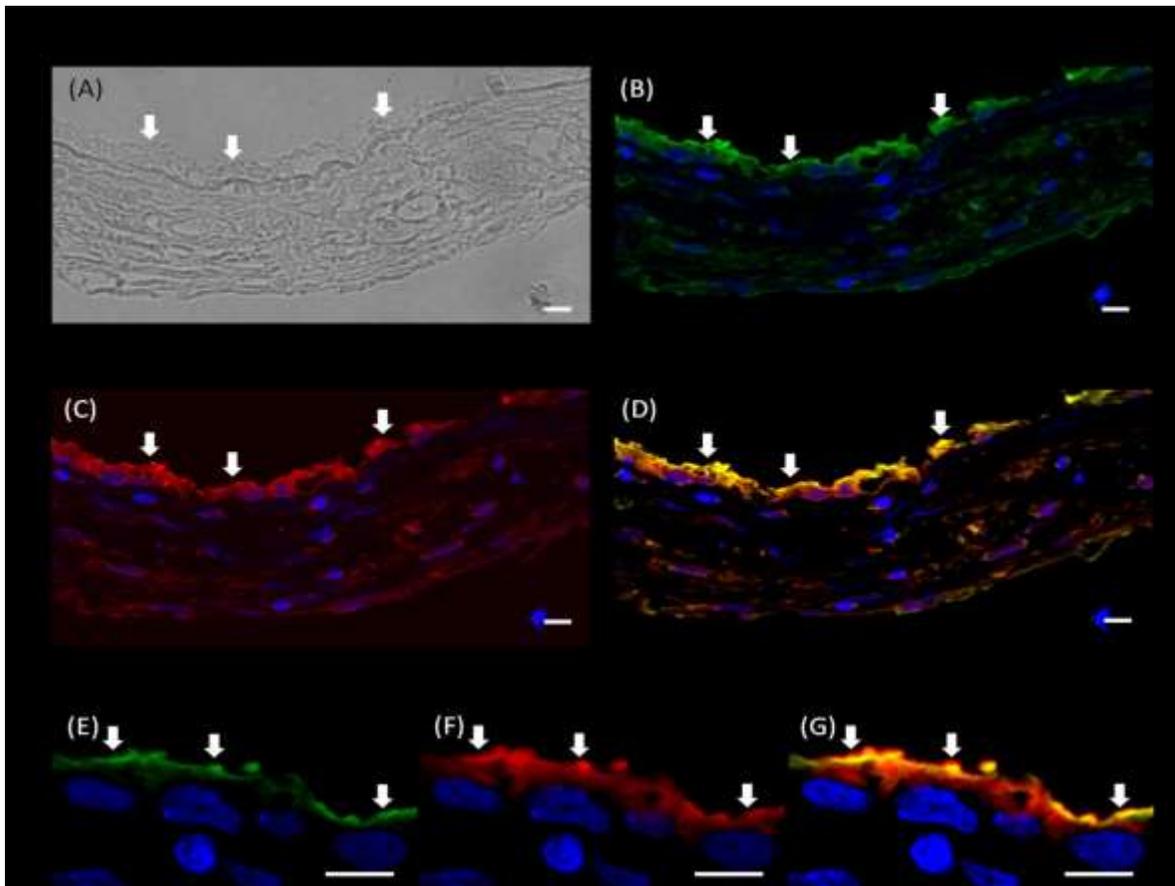


Figura 7. Inmunoflorescencias de CD147 y la subunidad β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa en cortes de ojo humano adulto. (A) Imágenes de campo claro de las secciones (Coroides-células EPR). B-C) Inmunofluorescencias de CD147 (verde) y la subunidad β_2 (rojo). D) Co-localización de CD147 y β_2 . Los núcleos teñidos con DAPI (azul). IF de otra sección con mayor aumento en la zona apical (E-F) y la sobre posición en G. Las flechas indican el dominio apical de las células EPR. La barra de escala representa 40 μm .

Las células ARPE-19 son adecuadas para analizar el mecanismo de polaridad de la Na^+, K^+ -ATPasa en el epitelio pigmentario de la retina (EPR)

Nosotros seleccionamos a la línea celular de origen humano ARPE-19 como modelo de estudio. Estas células se cultivan en insertos y llevan a cabo un proceso denominado re-morfogénesis para distinguirlo del término “diferenciación” en donde las células en desarrollo todavía no están comprometidas a un fenotipo específico. La re-morfogénesis consiste en que las células que pierden el contacto célula-célula durante la cosecha (con tripsina) sufren transición epitelio-mesenquinal (EMT) al volverlas a sembrar los contactos celulares se recobran (Burke y col. 2000; Gallagher-Colombo y col. 2010; Tamiya y col. 2010; Adijanto y col. 2012). La adquisición del fenotipo epitelial EPR se lleva a cabo con la formación de uniones celulares basados en N-caherina, el cambio de una forma celular de fusiforme (fibroblástica) a cuboidal (epitelial), la formación de pigmentos de melanina y la expresión de proteínas apicales como CD147, N-CAM y Na^+, K^+ -ATPasa. Este proceso dura de seis a ocho semanas de cultivo, periodo de tiempo que es necesario para la regulación y expresión de diversos genes asociados con el desarrollo de la maquinaria molecular que está involucrada en el direccionamiento de las proteínas de la membrana en estas células.

Primeramente decidimos analizar la expresión polarizada de la Na^+, K^+ -ATPasa en células ARPE-19. Las células cultivadas por más de 4 semanas en insertos “transwell” recubiertos previamente con laminina, se marcaron con faloidina-rodaminada para observar los filamentos de actina, mostrando a las células planas con fibras de estrés y algunos anillos concéntricos (Fig. 8A). La expresión de CD147, fue detectada en el dominio apical (Fig.

8B). La localización de las subunidades α_1 y β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa es principalmente basolateral (Fig. 8C y D) mientras que la subunidad β_2 humana se expresa muy poco. (Fig. 8E). Fue necesario modificar las condiciones de cultivo para inducir la expresión apical de la Na^+, K^+ -ATPasa.

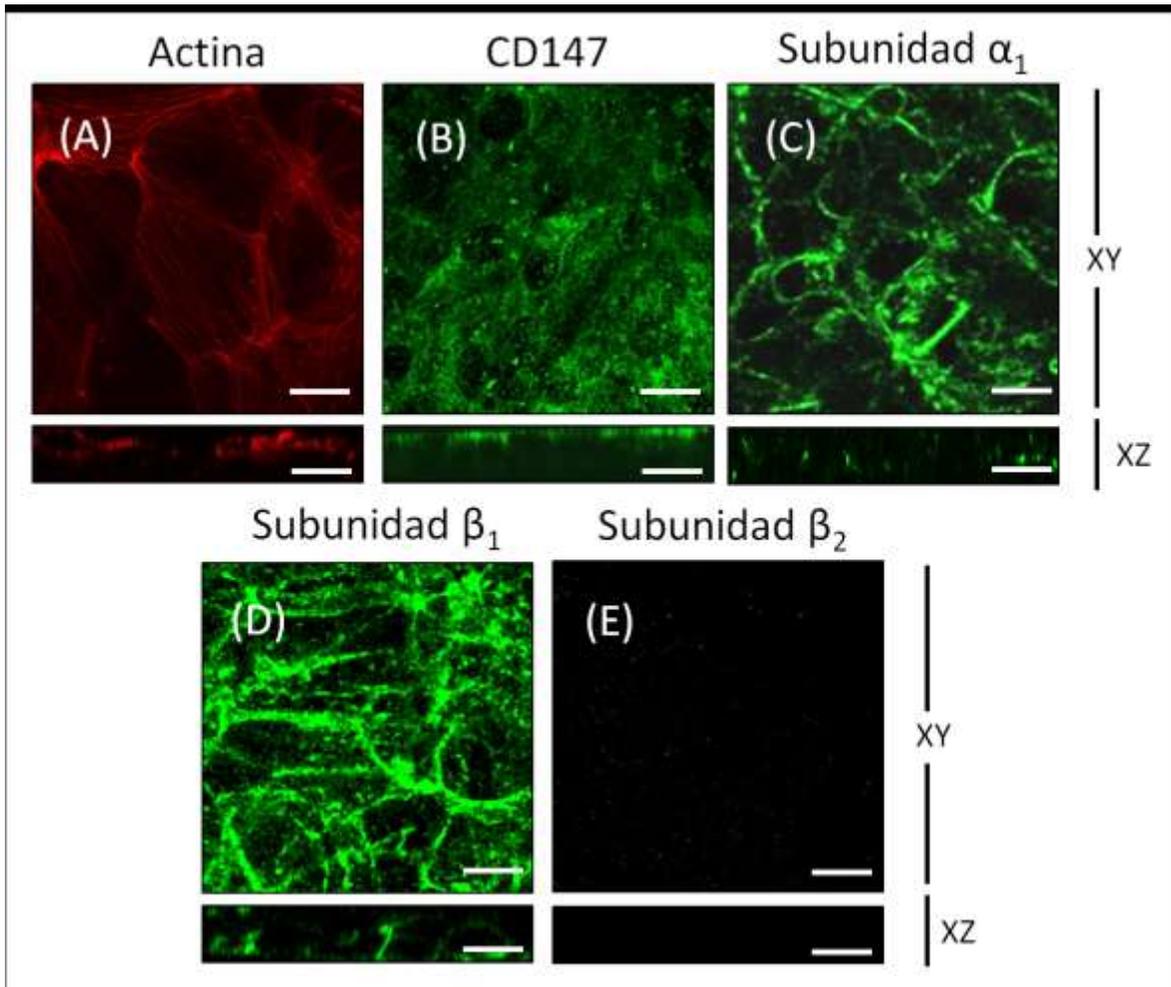


Figura 8. La Na^+, K^+ -ATPasa en las células ARPE-19 se localiza en el dominio basolateral. Imágenes de inmunofluorescencias (XY) muestran la inmunotinción contra actina (A) mostrando fibras de estrés en las células, CD147 (B) ubicada en el dominio apical, las subunidades α_1 (C) y β_1 (D) en la membrana lateral y β_2 (E) no presentan una marca aparente. La barra de escala es de 20 μm .

Decidimos entonces agregar al medio de cultivo una mezcla de insulina, transferrina humana y ácido selénico (ITS), que se ha reportado que induce la epitelialización de las células ARPE-19 (Luo y col. 2006). Cuando examinamos si el suplemento es efectivo en la

estimulación de la polaridad apical de la bomba de sodio después de 4 semanas de cultivo, descubrimos que las células tienen una forma epitelial con anillos concéntricos de microfilamentos de actina cerca de la membrana plasmática y ocasionalmente fibras de estrés en el citoplasma (Fig. 9A). Como esperábamos, las células adquirieron el fenotipo de EPR expresando marcadores moleculares como β -catenina y N-cadherina en la membrana lateral (Fig. 9B y C) y CD147 apical y basolateral (Fig. 9D). Ezrina, es una fosfoproteína que se une a los filamentos de actina y está implicada en la formación de microvellos apicales en las células EPR (Kivelä y col. 2000). Como se observa en la figura 9E a las cuatro semanas de cultivo en presencia de ITS, ezrina se localiza en la membrana apical. La expresión de la Na^+, K^+ -ATPasa conformadas por las subunidades α_1 y β_1 (Fig. 9F y G) se observa en el dominio basolateral principalmente, aunque la expresión de β_1 fue también observada en el dominio apical en ARPE-19. Un patrón apical claro fue observado en la expresión de la subunidad β_2 (Fig. 9H). La formación de las uniones oclusoras fue monitoreada midiendo la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET) de las monocapas. Como se observa en la figura 9I, la RET máxima se ubica entre las 2 y las 4 semanas con un valor promedio de $80 \Omega \cdot \text{cm}^2$ característico de estas células (Dunn y col. 1996; Luo y col. 2006). Por lo tanto, bajo 4 semanas de cultivo con ITS es posible llevar a cabo experimentos que ayuden a resolver el problema sobre la polarización invertida de la Na^+, K^+ -ATPasa en las células EPR.

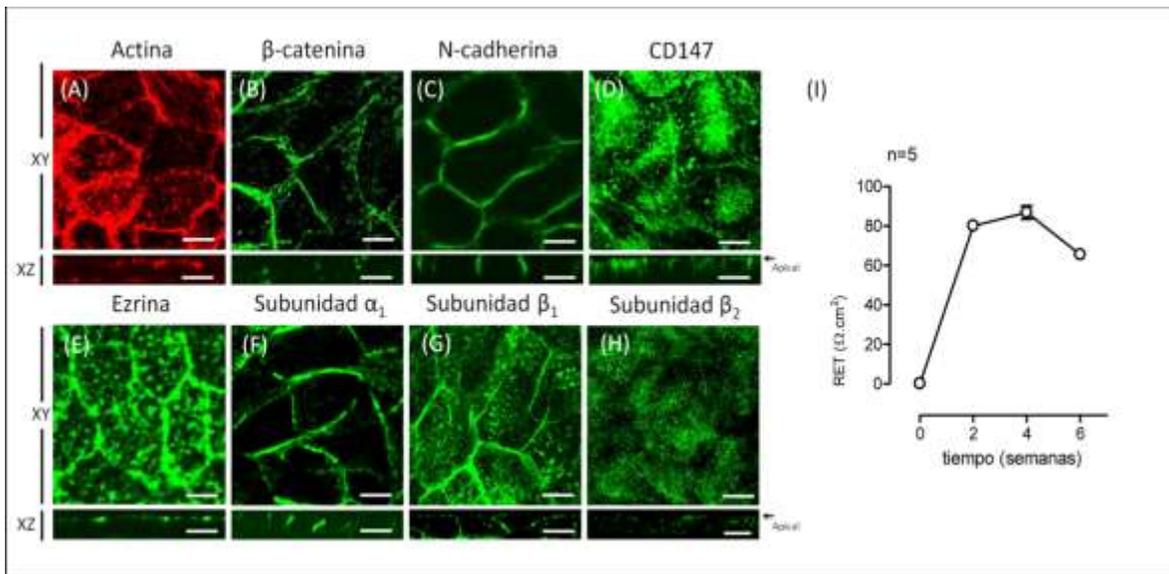


Figura 9. La re-morfogénesis de las células ARPE-19 tratadas con ITS. Las células fueron crecidas sobre insertos claros cubiertos de laminina con ITS hasta 6 semanas de cultivo. Las fotomicrografías muestran células ARPE-19 cultivadas durante 4 semanas y marcadas con Faloidina Red-Texas para detectar Actina (A). Se puede notar una forma epitelial y predominantemente un marcaje de anillos corticales de actina. Las imágenes de confocal de los mismos cultivos muestran β-catenina (B) y N-cadherina (C) en la membrana lateral, CD147 (D) mayormente en la apical, Ezrina (E) en el dominio apical, las subunidades α₁ y β₁ (F y G) en el dominio basolateral y β₂ (H) en el dominio apical. La barra de escala es de 10 μm. (F) Análisis cuantitativo de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET) de las células ARPE-19 durante el proceso de re-morfogénesis. Obsérvese que la RET es máxima alrededor de los 80 Ω·cm² entre la segunda y cuarta semana de cultivo.

La sobre expresión de las isoformas α₂ y β₂ se lleva a cabo durante la re-morfogénesis

Con el fin de caracterizar mejor la polarización apical de la Na⁺,K⁺-ATPasa durante la re-morfogenesis, procedimos a analizar los niveles de expresión de ARNm y de proteína de las diferentes isoformas α y β detectadas previamente en los cultivos de ARPE-19. Como se muestra en la figura 10A el análisis de Western Blot en las células ARPE-19 cultivadas en presencia de ITS muestra que se expresa las 3 isoformas de la subunidad β (β₁, β₂, y β₃). Destaca, que esta es la primera evidencia de la expresión de la isoforma β₃ en ARPE-19. El análisis por RT qPCR de las cantidades relativas de ARNm de las isoformas α y β en

función del tiempo, se presenta en la Fig. 10B y C. Se detectaron cambios en los ARNm que corresponden a las isoformas estudiadas (α_{1-2} , β_{1-3}). La cantidad relativa incrementa conforme avanza el tiempo en la re-morfogénesis; la cantidad de ARNm de α_1 incrementa tan solo 2 veces mientras que la de α_2 lo hace hasta 6 veces (Fig. 10 C). Aunque los ARNm de β_1 y β_2 se incrementan a lo largo de las 6 semanas de cultivo, los de la subunidad β_2 aumenta significativamente mas que los de β_1 (Fig. 10B). Por otra parte, la cantidad de ARNm de β_3 es constante durante este periodo de tiempo. Nosotros también analizamos las cantidades de proteína total en las isoformas β_1 y β_2 . En la figura 10D se muestra que durante la re-morfogénesis la cantidad de proteína total de β_1 y β_2 aumenta con el tiempo, alcanzando la máxima expresión a las 6 semanas. En conjunto la figura 10 demuestra que durante la re-morfogénesis, las isoformas α_2 y β_2 se sobre expresan, incrementando la cantidad de ARNm y proteína a través del tiempo. Esta observación sugiere que existe un componente de regulación transcripcional de estos genes y que probablemente se lleva a cabo con la participación de factores de transcripción específicos.

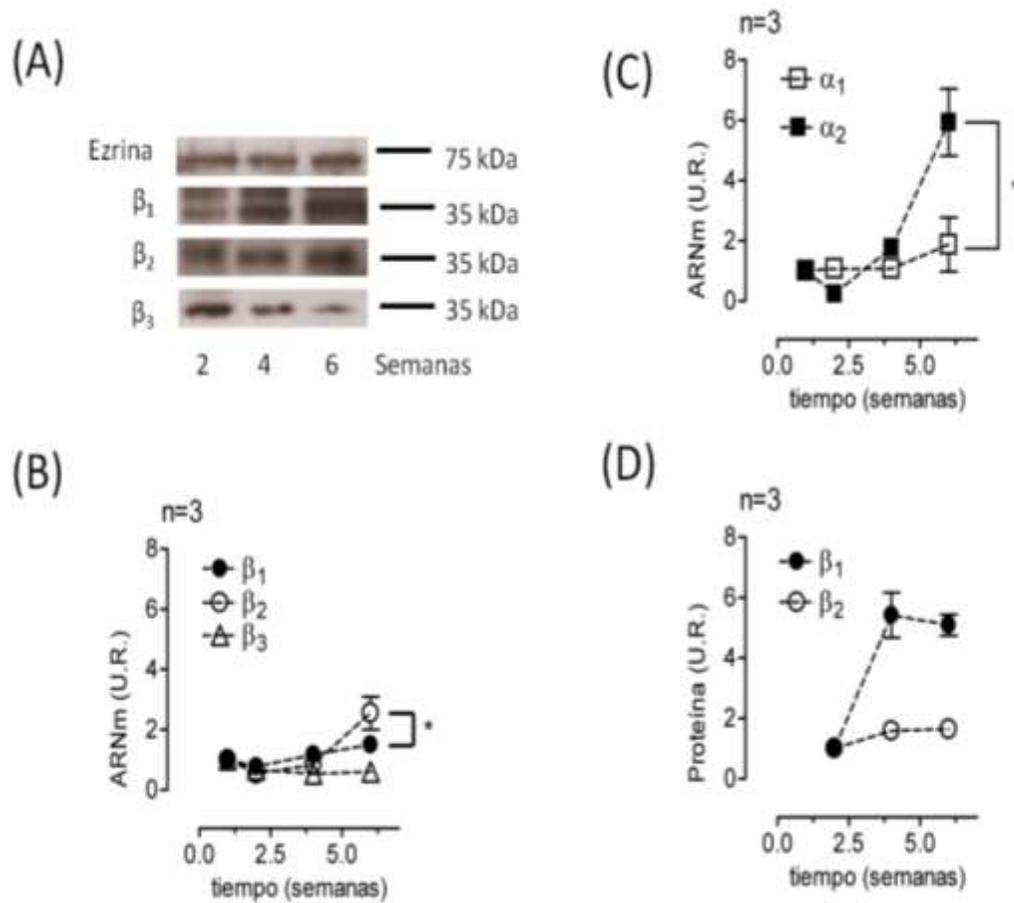


Figura 10. Análisis de las cantidades relativas de ARNm y proteína de las isoformas de las subunidades α y β en células ARPE-19. A) Análisis de Western blot de los lisados celulares de ARPE-19 cultivadas bajo las condiciones ya establecidas para la re-morfogénesis. En la parte superior del blot se utilizó el anticuerpo contra Ezrina (como control de carga), mientras que en la parte inferior se ocupó anticuerpos contra las subunidades β_1 , β_2 y β_3 . Los blots representan 3 diferentes experimentos. B) Los ARNm fueron extraídos a las 1, 2 y 6 semanas de cultivo y analizados por RT qPCR. Cantidades relativas de ARNm de las subunidades β_1 , β_2 y β_3 y de las subunidades α_1 y α_2 en C). Los valores relativos de ARNm fueron normalizados con la cantidad de ARNm detectados en la primera semana de cultivo. D) Cuantificación de proteína por análisis de densitometría del Western blot de 3 diferentes experimentos, utilizando como control de carga a la proteína Ezrina. Las barras de error representan el error estándar en 3 diferentes experimentos. Los cambios estadísticos significativos son señalados por un asterisco ($P < 0.05$, t-test no paramétrica).

El factor de transcripción Sp1 está involucrado en la regulación de la expresión de la subunidad β_2 en células ARPE-19 durante la re-morfogénesis

El factor de transcripción específico 1 (Sp1) pertenece a la pequeña familia de proteínas llamadas factores de transcripción con dedos de zinc (teniendo 3 dedos de zinc en el C terminal) y está relacionado con proteínas de unión al ADN con regiones ricas en GC, con las que tiene alta afinidad y regula la expresión de los genes vía interacción proteína-proteína o interacción con otros factores de transcripción y/o componentes de la maquinaria basal de transcripción (Bouwman y Philipsen, 2002; Wierstra, 2008). Kawakami y col. (1990; 1992) y Avila col. (1998) reportaron que Sp1 incrementa la actividad del promotor del gen de la subunidad β_2 (ATP1B2) en el neuroblastoma humano, células embrionarias de rata y linfocitos humanos. Shull y col. (1989) observaron que Sp1 también activa el promotor del gen de α_2 en el musculo esquelético de células mioblasticas humanas. Además, Li y Langhans (2015) informan, en su revisión que Sp1, regulan la expresión de las diferentes subunidades α y β de la Na^+, K^+ -ATPasa, en diferentes tejidos y es el único factor conocido que regula la expresión de la isoforma β_2 . Por lo tanto, analizamos si Sp1 está involucrado en la regulación de la expresión de las subunidades α_2 y β_2 durante el proceso de re-morfogénesis de las células ARPE-19. El análisis de WB demuestra que la cantidad relativa de Sp1 disminuye ligeramente durante la re-morfogénesis (Fig. 11A) y el de IF que Sp1 se localiza en los núcleos de las células ARPE-19, a las 4 semanas de cultivo en presencia de ITS (Fig. 11B).

Investigamos si Sp1 es necesario para que la subunidad β_2 se exprese en la membrana apical de las células ARPE-19, silenciando su expresión con siRNAs específicos para humano. Las células ARPE-19 de 4 semanas de cultivo se transfectaron con los siRNA específicos contra Sp1 humano. Luego analizamos la eficiencia del silenciamiento. Como se puede observar en la figura 11C, la expresión de Sp1 decae un 40% aproximadamente debido al fenómeno de mosaicismo que presentan estas células de manera natural (Burke, 2008) era necesario identificar qué células fueron realmente transfectadas marcando al siRNA con un fluorocromo y así evaluar el efecto del silenciamiento en las células

transfectadas. La imagen de IF en la figura 11D demuestra que las células que contienen los siRNA marcados con Cy3 (puntos rojos) no expresan Sp1 en el núcleo (señal verde). Las flechas señalan las células en las cuales la expresión de Sp1 se observa disminuida o no se observa. Nosotros anticipamos que si Sp1 está involucrado en la transcripción de β_2 , el silenciamiento de Sp1 también reduciría la cantidad de proteína de la subunidad β_2 en células ARPE-19. El análisis de WB de las células silenciadas para Sp1 demuestra que la cantidad de la subunidad β_2 se redujo un 40% con respecto al control. La imagen de IF de la subunidad β_2 (Fig. 11F) muestra zonas en la monocapa con Sp1 silenciado que también tienen una señal de fluorescencia correspondiente a la subunidad β_2 baja (flechas blancas). Esos datos sugieren que el factor de transcripción Sp1 está involucrado en la regulación de la expresión de la subunidad β_2 en células ARPE-19.

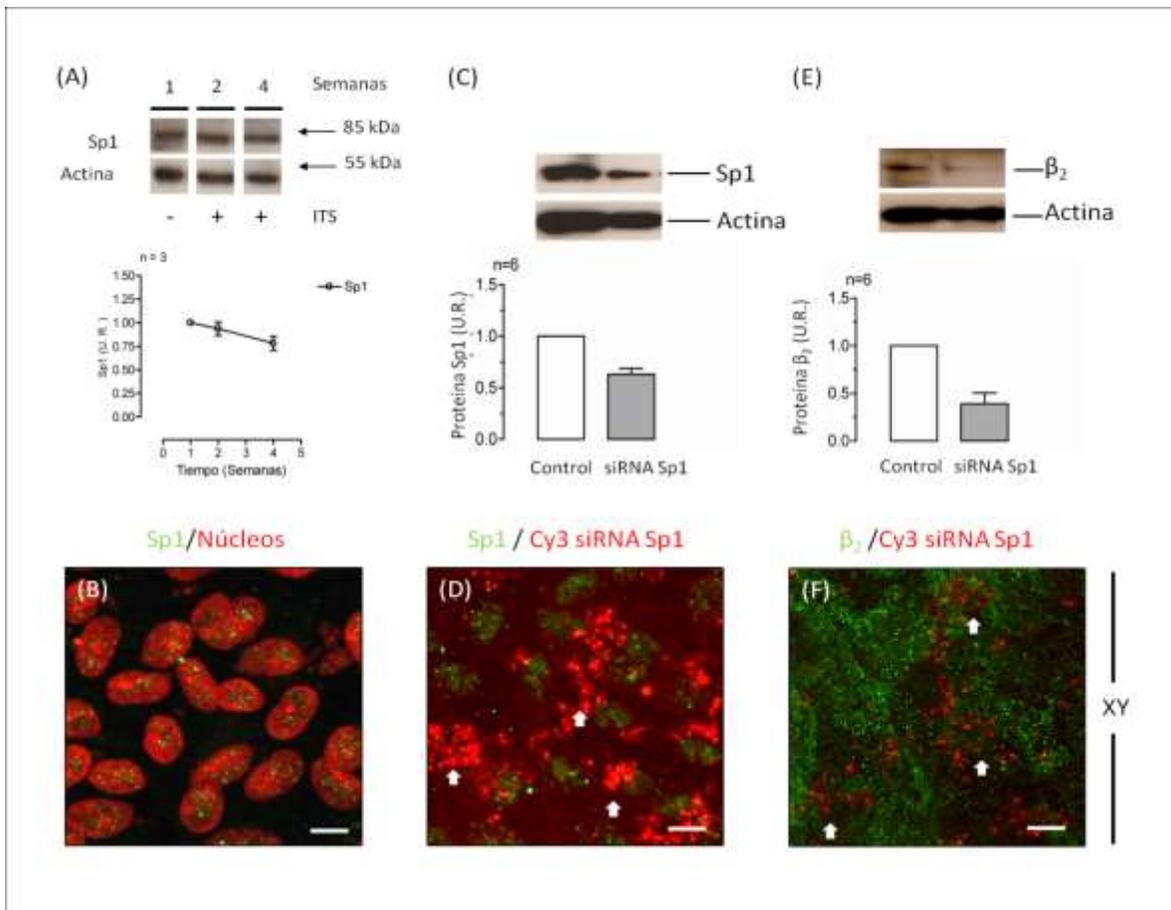


Figura 11. Expresión y silenciamiento vía siRNA del factor de transcripción Sp1 en las células ARPE-19.

A) El análisis de Western blot muestra la expresión de Sp1 durante las 4 semanas de cultivo. El análisis cuantitativo de Sp1 fue normalizado con la señal de Actina utilizada como el control de carga. B) El marcaje por inmunofluorescencia de Sp1 (verde) y de los núcleos (rojo) en las células ARPE-19 cultivadas por 4 semanas en presencia con ITS. La sobre posición de las imágenes muestra una localización nuclear de Sp1. La barra de escala es de 20 μm . C) Análisis por Western blot de la expresión de Sp1, en células ARPE-19 silenciadas con siRNAs contra Sp1. Las células control fueron tratada lipofectamin). El análisis cuantitativo por densitometría representa 6 experimentos independientes. D) Imágenes de inmunofluorescencias de las células ARPE-19 silenciadas marcadas para Sp1 (verde) y Cy3-siRNA para Sp1 (rojo). Las flechas blancas señalan las células transfectadas con siRNA (identificadas por fluorescencia roja) que no expresan Sp1 en el núcleo. La barra de escala representa 20 μm . E) Análisis por Western blot de la expresión de la subunidad b2, en células ARPE-19 silenciadas con siRNAs contra Sp1. Las células control fueron transfectadas sin siRNA (solo lipofectamina). El análisis cuantitativo por densitometría representa 6 experimentos independientes. F) Imágenes de microscopía confocal en donde se realizó el silenciamiento de Sp1 por siRNA (previamente marcados con Cy3) y se inmunodetecto con el anticuerpo específico contra la subunidad β_2 . Las flechas indican las células que fueron silenciadas. Las barras de error representan la media y el error estándar. La barra de escala representa 20 μm .

La expresión apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en células ARPE-19 durante la re-morfogénesis correlaciona con la expresión de las isoformas α_2 y β_2

Los resultados de WB y RT qPCR en la figura 10 muestran que las células ARPE-19 expresan las 3 isoformas de la subunidad β y 2 isoformas de la subunidad α . Nosotros procedimos a analizar la distribución polarizada de las diferentes isoformas α y β en estas células. Como se puede observar por análisis de microscopía confocal, a diferencia de la distribución no polarizada de la isoforma β_1 (Fig. 9G), β_3 está principalmente en la membrana basolateral y no co-localiza con ezrina (Fig. 12A). No obstante β_2 está exclusivamente localizada en la membrana apical, presentando un patrón punteado (Fig. 12B). Sin embargo, la aparente distribución apical no es homogénea, presentando mosaicismo que ha sido previamente reportado en células EPR (Burke, 2008). Como la subunidad β siempre debe estar asociada con la subunidad α para alcanzar la membrana plasmática e insertarse en la misma, procedimos a analizar que isoforma α acompaña a la isoforma β_2 en las células ARPE-19 usando ensayos de IF. La figura 12D muestra que α_1 se

localiza en la membrana basolateral y claramente se excluye de la membrana apical marcada por ezrina, mientras que α_2 está en la membrana apical pero no en los contactos celulares (Fig. 12E). Cabe destacar que no existe co-localización de las isoformas α_1 y β_2 (Fig.12F), α_2 y β_1 (Fig.12G) ó α_1 y α_2 (Fig.12H). Las isoformas α_2 y β_2 son raramente detectadas en ARPE-19 no maduras y son expresadas durante la re-morfogénesis para encontrarlas distribuidas en la membrana apical, exclusivamente.

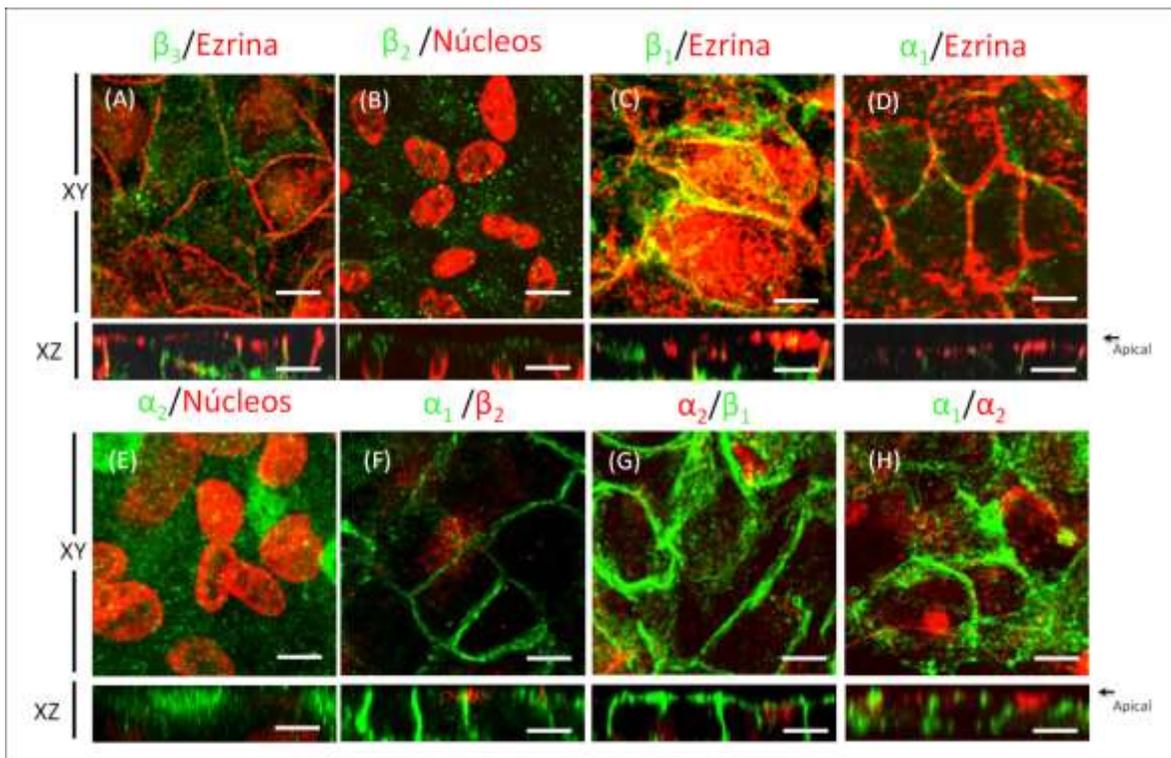


Figura 12. La localización de las diferentes isoformas de las subunidades α y β de la Na^+, K^+ -ATPasa en ARPE-19 es dominio-específica. Los ensayos de inmunofluorescencia de las células ARPE-19 cultivadas durante 4 semanas con ITS. A-E) Imágenes de inmunomarcaje contra la subunidades α ó β de la Na^+, K^+ -ATPasa; co-tinción con anti-Ezrina como marcador apical (A, C y D) o co-tinción con yoduro de propidio para la detección de núcleos. (B y E). Expresión de las subunidades β_3 (A) y α_1 (D) están primordialmente en el dominio lateral; las subunidades β_2 y α_2 (B y E) son localizadas en el dominio apical; α_1/β_2 (F), α_2/β_1 (G) y α_1/α_2 (H) no co-localizan. La escala de la barra es de $10 \mu\text{m}$.

La Na^+, K^+ -ATPasa no se estabiliza en el dominio apical de las células ARPE-19

Aunque el patrón de distribución mostrado por el análisis de IF de la subunidad β_2 sugiere una localización apical, teníamos que confirmar que la bomba una vez ensamblada con la isoforma β_2 y es insertada en la membrana del dominio apical de las células ARPE-19. Por lo tanto, analizamos la co-localización de la subunidad β_2 y α_2 con el marcador apical CD147 (Fig. 13A y B) y los marcadores laterales N-cadherina y β -catenina (Fig. 13 C y D). Las imágenes obtenidas por microscopia confocal (Fig. 13) revelan que la subunidad β_2 no co-localiza con ninguno de los marcadores apicales ni basolaterales. Sin embargo la carencia de co-localización no es suficiente para concluir que β_2 no reside en la membrana apical. Por lo tanto procedimos a realizar un ensayo de biotilación de proteínas de superficie de estado estable. Las células ARPE-19 fueron cultivadas durante 4 semanas con ITS sobre insertos. La biotina fue agregada en ambos sitios, basolateral y apical de la monocapa marcando únicamente a las proteínas localizadas en la membrana celular. Posteriormente se lisaron las células y las proteínas marcadas con biotina fueron precipitadas con esferas de neutravidina-sefarosa y desnaturalizadas para su aislamiento. Como se muestra en la figura 13E las células expresan N-cadherina y la subunidad β_2 como se detecta en el sobrenadante del lisado celular. La N-cadherina biotilada también se detecta en los precipitados indicando que se expresa en la membrana plasmática, como lo esperábamos. Sin embargo la subunidad β_2 no se detectó en el marcaje con biotina (precipitado de estreptavidina) en ninguno de los 6 experimentos realizados. Eso nos indica que la subunidad β_2 no se inserta ni estabiliza en la membrana plasmática.

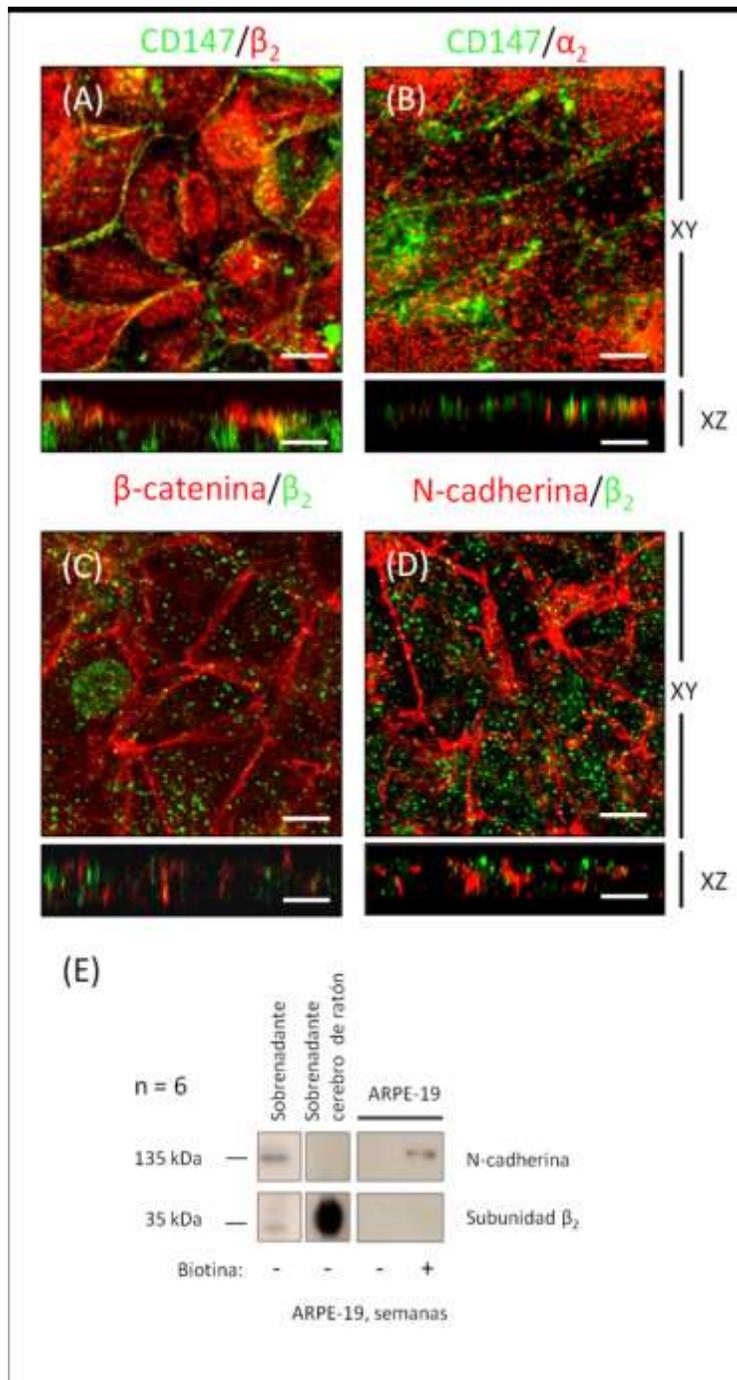


Figura 13. La Na^+, K^+ -ATPasa de las células ARPE-19 no se estabiliza en el dominio apical. A y B) Co-tinciones de las subunidades α_2 y β_2 con la proteína CD147, no se observa co-localización apical. C y D) Co-tinciones de la subunidad β_2 con los marcadores laterales N-cadherina y β -catenina, tampoco se aprecia una co-localización. La barra de escala equivale a $10 \mu\text{m}$. E) Biotinilación de proteínas de superficie analizada por WB utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad β_2 y N-Cadherina. Las muestras de las

proteínas de membrana de ARPE-19 biotiniladas no presentan marca para subunidad β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa.

La co-localización de las subunidades α_2 y β_2 está presente en la membrana apical de células EPR de ojo humano adulto

Nuestros resultados (Figura 13), indican que la bomba de Na^+ formada por la subunidad β_2 no se inserta en la membrana apical de las células ARPE-19 sino que probablemente, se esté reteniendo en un compartimento sub-apical. Hay que recordar que la línea celular ARPE-19 carece del contacto con los fotorreceptores, y es posible que dicha ausencia, no permita que la subunidad β_2 se estabilice en la membrana. Para evaluar esta posibilidad estudiamos la expresión de las isoformas β_2 y α_2 por ensayos de IF en la membrana apical de las células EPR del ojo humano. La figura 14 muestra la co-localización de las subunidades α_2 y β_2 en el dominio apical del EPR. Considerando que la subunidad β_2 es una molécula de adhesión (Gloor y col, 1990), nosotros pensamos que no se estabiliza en la membrana apical porque no puede interactuar con una proteína receptora en el lumen apical de la monocapa de ARPE-19, como lo hacen de manera natural las células EPR en contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores. Por consiguiente, la bomba localizada en la membrana apical en células ARPE-19 por IF, puede ser resultado del reciclamiento de la subunidad β_2 apical acumulada en los endosomas (AREs: endosomas de seleccionamiento apical ó CREs: endosomas de reciclamiento común. Lehmann y col. 2014). Sin embargo, estos datos no excluyen la posibilidad de que la subunidad β_2 esté involucrada en la polarización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa.

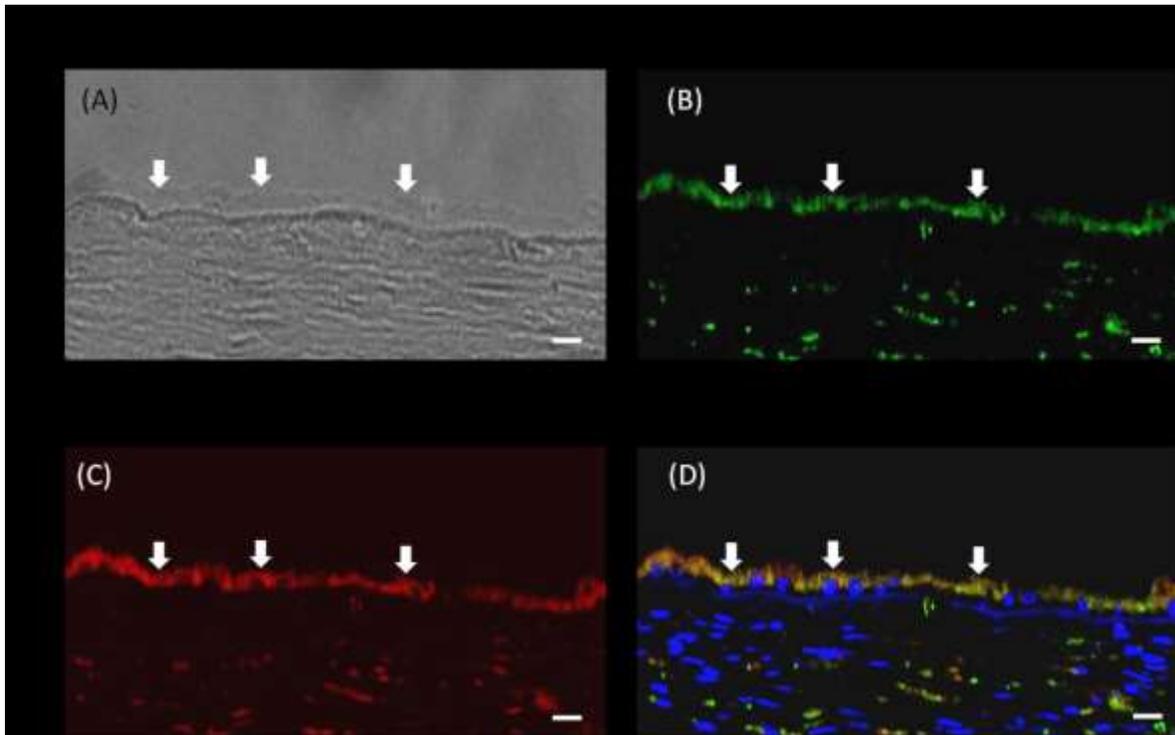


Figura 14. Inmunofluorescencias de las subunidades α_2 y β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa en cortes de ojo humano adulto. A) Imagen de campo claro de la sección analizada (Coroides y células EPR). B-C) Inmunofluorescencias de las subunidades β_2 (verde) y α_2 (rojo). D) Sobre posición de las imágenes de las subunidades β_2 y α_2 observando co-localización en el dominio apical. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las flechas indican el dominio apical de las células EPR. La barra de escala equivale a $40\mu\text{m}$.

El silenciamiento de la expresión de la subunidad β_2 en células maduras de ARPE-19 disminuye la localización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa

Para analizar si la expresión apical de la bomba depende de la expresión de la isoforma β_2 , realizamos un silenciamiento de la isoforma usando siRNA específico contra la proteína humana. Como se puede observar en la figura 15A, la expresión de los ARNm de β_2 decae en un 60%. Al mismo tiempo la cantidad relativa de ARNm de α_2 es también reducida. Sin embargo, la cantidad de ARNm de las isoformas α_1 y β_1 no se ve altera manteniendo los niveles de las células no transfectadas. El análisis por WB mostrado en la figura 15B revela que el nivel de la proteína en células ARPE-19 transfectadas con siRNA decae ligeramente.

Esto puede ser explicado por el hecho que las monocapas de ARPE-19 tienen una baja proliferación y además una baja tasa de recambio de proteínas. Aunque las cantidades de ARNm son significativamente reducidas, existe siempre una alta cantidad de proteínas remanentes en la célula.

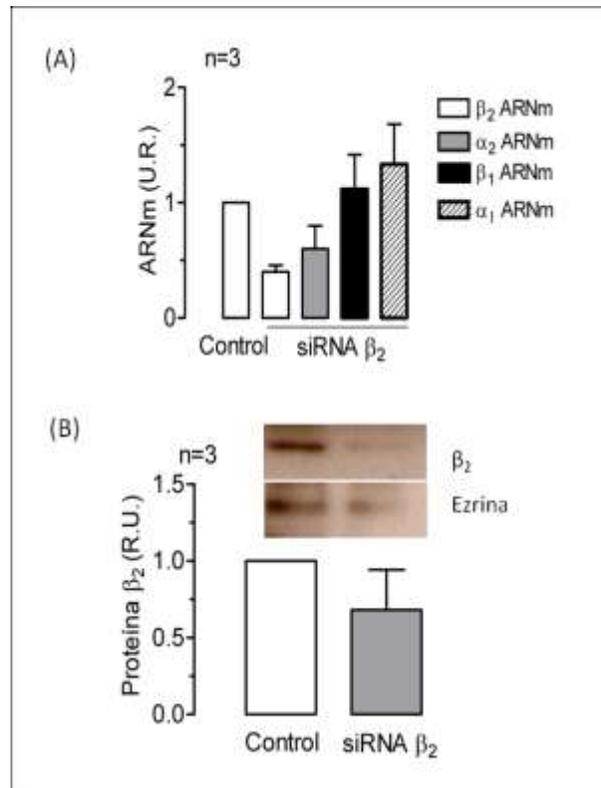


Figura 15. Silenciamiento de la subunidad β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa en células maduras de ARPE-19. Las células ARPE-19 cultivadas durante 4 semanas fueron silenciadas con siRNA contra la subunidad β_2 humana. A) Cantidades relativas de ARNm de las subunidades α_1 , α_2 , β_1 y β_2 medidas en 3 experimentos independientes y analizadas por RT qPCR. El nivel de silenciamiento de ARNm de β_2 es aproximadamente del 60%. B) Estudio de Western blot contra la subunidad β_2 en células ARPE-19 control y silenciadas. Análisis cuantitativo por densitometría en 3 experimentos independientes estudiados. La cantidad de proteína corresponde a la subunidad β_2 y fue normalizada con los niveles detectados en las células transfectadas solo con lipofectamina. El nivel de silenciamiento fue del 40% aproximadamente.

Los análisis de IF muestran áreas en las cuales el silenciamiento es aparentemente efectivo (en verde) debido a que la expresión de la isoforma β_2 es menor que en las células no silenciadas (Fig. 16 A y B). Al mismo tiempo, la localización apical de la subunidad α_2 es

también disminuida (Fig. 16 C y D). El análisis de RT qPCR (Fig. 15A) la expresión y localización de ambas subunidades β_1 y α_1 aparentemente no se altera, mostrando una distribución basolateral aunque en algunos casos fue percibida especialmente la β_1 también en el dominio apical. Esta distribución se considera no polarizada ya que la proteína se localiza indistintamente en los dos dominios (Fig.16E). Los análisis de WB e IF en la figura 15B y 16 muestran que estas proteínas están parcialmente silenciadas. Las monocapas que fueron transfectadas con siRNA todavía expresan la subunidades α_2 y β_2 en la membrana apical, en otras palabras es difícil definir si la localización apical de la bomba está alterada por el silenciamiento ó por efecto del mosaicismo celular natural. Por lo tanto, realizamos el silenciamiento de la monocapa con siRNA que fueron pre-marcados con el fluorocromo Cy3. En los ensayos de IF detectamos a las células silenciadas por su tinción positiva para Cy3. En ellas analizamos el cambio en la intensidad de fluorescencia debida a la expresión de α_2 y β_2 . Como podemos observar en la figura 17A y B, las células que fueron marcadas en rojo (Cy3, señaladas con flechas) no expresan la subunidad β_2 mostrando que esas células fueron silenciadas y el análisis de intensidad de fluorescencia indica que se abatio la expresión en un 75% (Fig. 17C). Cuando buscamos la expresión de la subunidad α_2 en las células silenciadas (Fig.17 D y E) observamos que la expresión apical se mantiene. Sin embargo cuando medimos la intensidad de fluorescencia de la subunidad α_2 en células positivas para Cy3 se observa que disminuiyo su expresión en 40% (Fig. 17F). Nuestros hallazgos indican que la localización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa depende de la expresión de la isoforma β_2 .

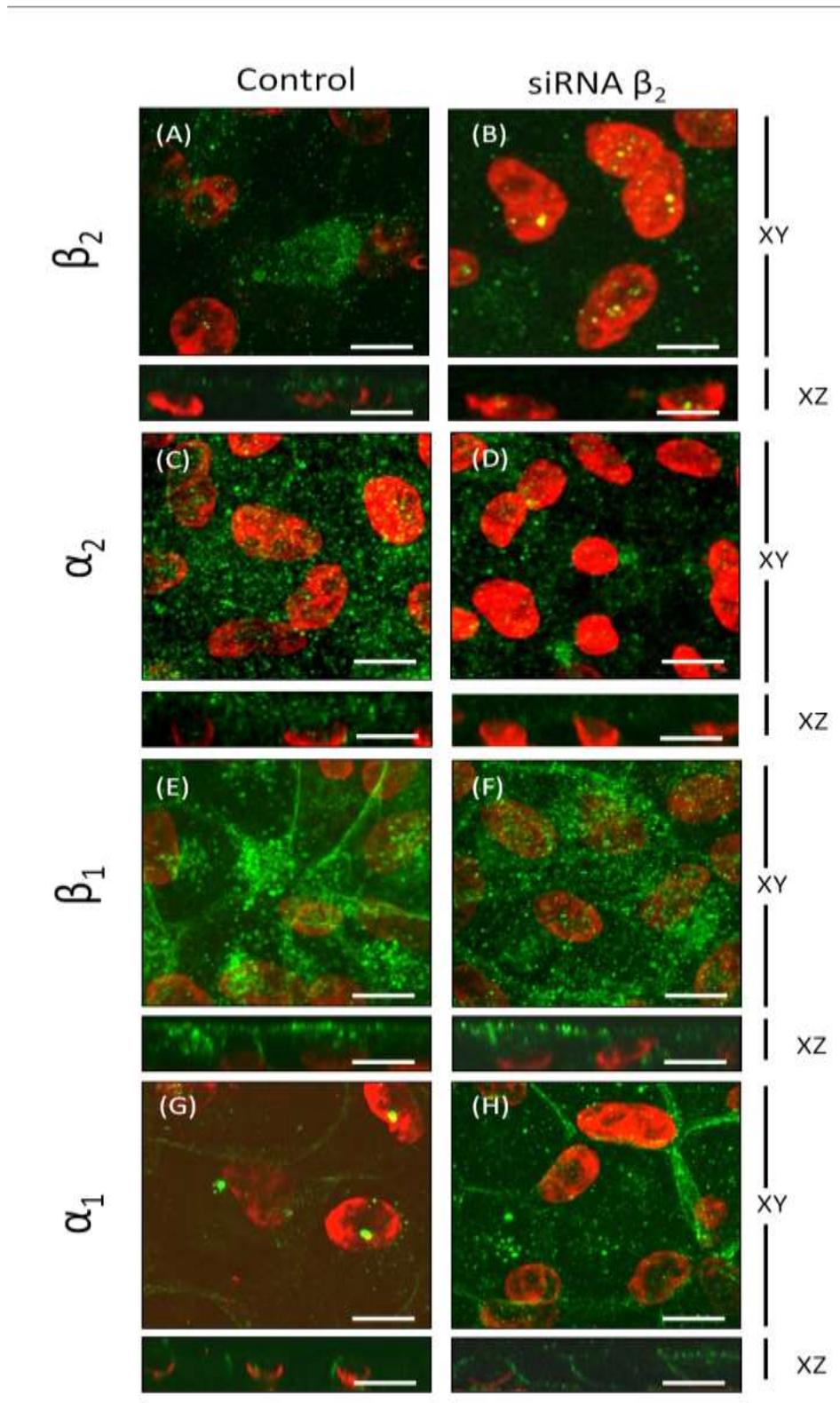


Figura 16. Análisis por inmunofluorescencia de células ARPE-19 silenciadas por siRNA contra la isoforma β_2 humana. Las células ARPE-19 cultivadas durante 4 semanas, fueron transfectadas con siRNA específicos contra la isoforma β_2 humana como en la figura 14. Imágenes de confocal de células no silenciadas (panel izquierdo) y silenciadas (panel derecho) para las subunidades α y β . Expresión apical de las isoformas β_2 y α_2 en células no silenciadas son observadas en A y C. La deslocalización y disminución de la intensidad de fluorescencia de ambas subunidades β_2 y α_2 son observadas en las células silenciadas (B y D). Expresión apical y basolateral de la isoforma β_1 (E) es generalmente mantenida en células con β_2 silenciadas (F). El patrón basolateral de la isoforma α_1 se mantiene en las células silenciadas (G y H). La barra de escala es de 10 μm .

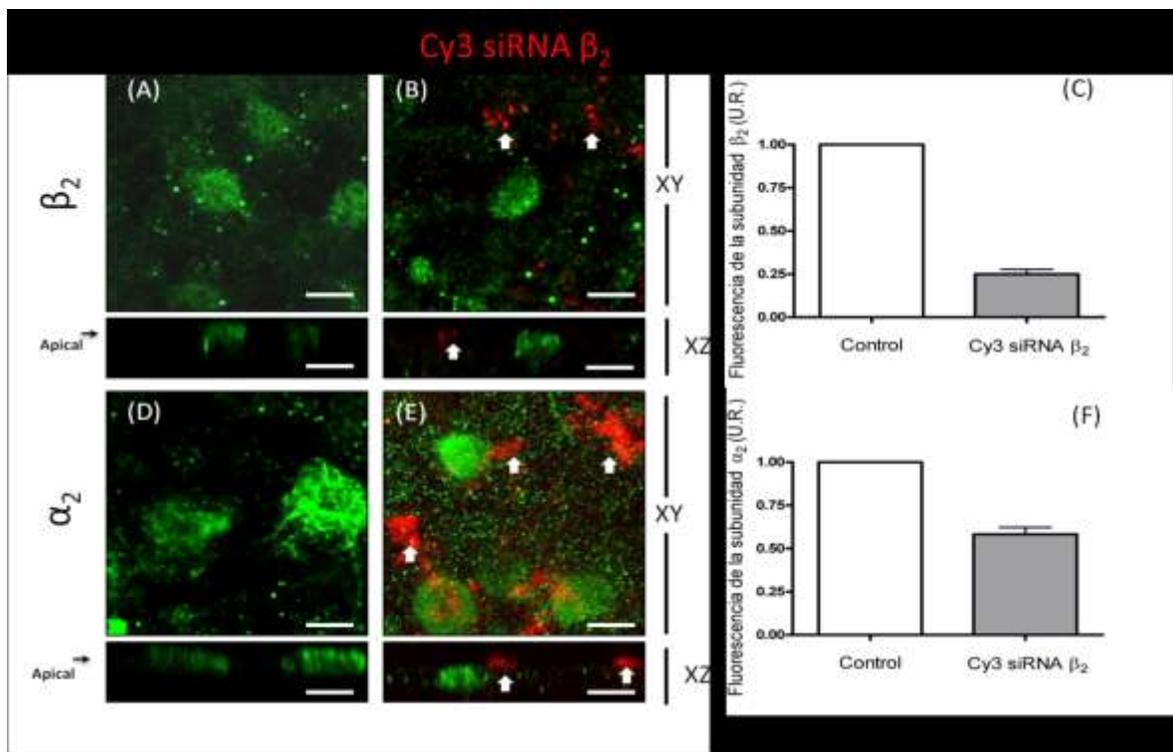


Figura 17. Silenciamiento de la subunidad β_2 en las células ARPE-19 afecta la distribución apical de la bomba de Na^+ . Las células fueron transfectadas con siRNA marcados con Cy3 y son específicos contra la isoforma β_2 . Los puntos rojos fluorescentes identifican las células transfectadas. Las imágenes confocal de células no silenciadas en las cuales las subunidades α_2 y β_2 son inmunodetectadas (A y C) mostrando una distribución apical en ambas subunidades. Imágenes de células silenciadas (B y D) muestran la expresión apical de las subunidades α_2 y β_2 (verde). Las flechas indican las células transfectadas con Cy3 siRNA β_2 . La barra de escala es de 10 μm .

Recientemente, Mony y col. (2013) reportaron que la subunidad β_1 es esencial para el mantenimiento del fenotipo epitelial de las células ARPE-19. Por lo tanto, analizamos si el silenciamiento de la expresión de la subunidad β_1 afecta la localización apical de la subunidad β_2 (Fig. 18). Como se puede observar en la figura 18 A-D, la localización tanto de α_1 como de β_1 se altera cuando se silencia la expresión de la subunidad β_1 de humano, notablemente se observa que la Na^+K^+ -ATPasa está des-localizada en el dominio lateral de las células ARPE-19, sin embargo la distribución apical de la subunidad β_2 no se modifica (Fig. 18E-F). Por lo tanto, nuestros datos sugieren fuertemente que los dímeros $\alpha_2\beta_2$ juegan un papel esencial en el mantenimiento de la polarización apical de la bomba de Na^+ en las células EPR.

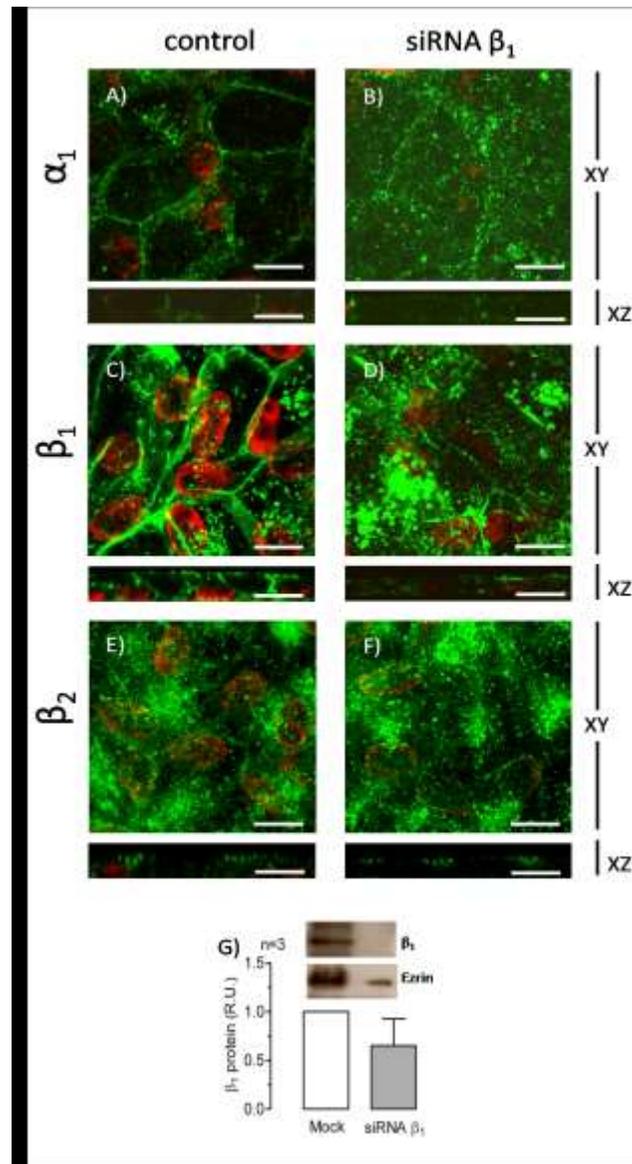


Figura 18. Silenciamiento de la isoforma β_1 humana en ARPE-19 no altera la localización apical de la isoforma β_2 . Células ARPE-19 de 4 semanas de cultivo fueron transfectadas siRNAs específicos contra la isoforma β_1 humana. Imágenes de confocal del silenciamiento de células inmunomarcadas para las isoformas α y β (panel derecho) y no silenciadas (panel izquierdo). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio. La expresión basolateral de la subunidad α_1 en células no transfectadas es observado en A y una distribución basolateral y apical de la subunidad β_1 es observada en C. El silenciamiento de β_1 resulta en la deslocalización de las subunidades α_1 y β_1 (B y D). Obsérvese que la localización apical de la isoforma β_2 (E) se mantiene en el silenciamiento de β_1 (F). El nivel de silenciamiento de ARNm fue del 40% (G). La barra de escala es de 10 μ m.

DISCUSIÓN

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) forma una monocapa de células que están en íntima asociación con la base de los fotorreceptores formando la barrea hemato-retiniana externa. Las células EPR tienen una forma hexagonal, y visto desde la superficie, se pueden apreciar numerosos gránulos citoplasmáticos que incluyen a los gránulos de pigmento. Una característica común de todas las células diploides es su tendencia a perder su fenotipo epitelial después de su extracción y re-sembrado *in vitro*. Esto sucede también con las células del EPR; con el desprendimiento de los contactos celulares durante la tripsinización y el resembrado de las células, se lleva a cabo el proceso de transición epitelio mesenquimal (EMT) resultando en la pérdida del fenotipo EPR. Esta transición es reversible (Adijanto y col. 2012; Gallagher y col. 2010; Grisanti y Guidry, 1995; Tamiya y col. 2010). Los cultivos de EPR tienen una limitada capacidad para epitelializarse y someterse a una maduración fenotípica o re-morfogénesis como lo describe Burke (2008).

En el presente estudio, primero tuvimos que establecer las condiciones de cultivo en las que se lleva a cabo el proceso de re-morfogénesis de las células ARPE-19 *in vitro*. La presencia de la Na^+, K^+ -ATPasa en el dominio apical de las células ARPE-19 la manifiesta la maduración y diferenciación de la monocapa (Burke y col. 2000; Kannan y col. 2006; Sonoda y col. 2009). Las células ARPE-19 incubadas en filtros transwell presentan un fenotipo mesenquimal caracterizado por una forma alargada fusiforme y expresan la Na^+, K^+ -ATPasa $\alpha_1\beta_1$ en los contactos celulares. Al adicionar el ITS al medio de cultivo se activan los mecanismos de polarización de las células que culminan en una monocapa bien polarizada después del mes de cultivo. El crecimiento celular con el ITS en el medio de cultivo resulta en una monocapa epitelial que expresa la Na^+, K^+ -ATPasa en ambos dominios, apical y basolateral, como ya se describió en células EPR de rata (Okami y col. 1990) y bovino (Burke y col. 2000). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual se alcanza la polaridad apical de las proteínas en el EPR. En este trabajo nos hemos enfocado en dilucidar ese mecanismo, y más específicamente en identificar qué isoformas tienen la información molecular necesaria para la clasificación y envío de la Na^+, K^+ -ATPasa al dominio apical en el EPR. Nuestras observaciones indican que las isoformas α_1 y

β_1 son las más comunes en las células ARPE-19. Como en los epitelios clásicos, la bomba está compuesta de estas dos isoformas y son localizadas en el dominio lateral y su función es el mantenimiento del gradiente iónico requerido para la homeostasis celular. Sin embargo las isoformas α_2 y β_2 son raramente detectadas en células ARPE-19 no maduras (Fig. 8). Nuestras observaciones sugieren que durante las cuatro semanas de cultivo, se activa el mecanismo de polarización que lleva a la Na^+, K^+ -ATPasa al dominio apical. Nosotros demostramos que la localización apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en las células ARPE-19 depende en la expresión de la subunidad β_2 asociada con la subunidad α_2 (Fig. 12) y encontramos que son consistentes nuestras observaciones con las muestras fijadas de ojo humano (Fig. 14). Además, demostramos que durante el proceso de re-morfogénesis los ARNm de estas isoformas se sobre expresan (Fig. 10) y que el factor de transcripción Sp1 está involucrado en dicha regulación (Fig. 11). El silenciamiento de la subunidad β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa utilizando siRNA en células ARPE-19, resulta en una disminución de la polarización apical de la bomba (Fig. 16) sin que sea afectada la localización del dímero $\alpha_1\beta_1$. El silenciamiento de la subunidad β_1 no afecta a la localización de la subunidad β_2 (Fig. 18).

Las células ARPE-19 como modelo de estudio en el mecanismo de polarización de las células EPR

Las células EPR forman una barrera hemato-retiniana que regula el movimiento de solutos entre los capilares de la coroides y los fotorreceptores de la retina. Aunque los cultivos primarios de células EPR fetal del humano (hfRPE) son consideradas los mejores modelos para el análisis de los mecanismos de polaridad y tráfico vesicular en EPR (Lehmann y col. 2014), nosotros no tuvimos acceso a dichos cultivos primarios. Por lo tanto, utilizamos la línea celular ARPE-19 adquirida de la ATCC, la cual se obtuvo por Dunn y col. (1996) transformando cultivos celulares humanos de EPR (Dunn y col. 1996). Las células ARPE-19 conservan aceptablemente la polaridad y función de barrera, características que son importantes en el estudio del envío dirigido de las proteínas. Las principales ventajas que tienen las células ARPE-19 son: se cariotipo normal, su tasa de proliferación rápida y su capacidad de mantener algunos caracteres específicos del EPR (Dunn, y col. 1996).

Lehmann y col. (2014) opinan que en células ARPE-19 tienen una “maquinaria de tráfico diferente que en las células EPR *in situ*”, debido a que la Na⁺,K⁺-ATPasa se ubica en la membrana basolateral. Basados en nuestros experimentos, nosotros sugerimos ser más precisos cuando se considere la polaridad de la Na⁺,K⁺-ATPasa en células ARPE-19 y referirse al dímero $\alpha_1\beta_1$ ó $\alpha_2\beta_2$. Así mismo, nuestros datos son consistentes con los reportados por Ahmado y col. (2011) que reportan la localización lateral de α_1 y β_1 en células no polarizadas y en la membrana apical en células pigmentadas (polarizadas). Sorpresivamente algunos estudios han reportado la localización de la bomba de sodio en la membrana apical utilizando anticuerpos contra la subunidad α_1 en células ARPE-19. Sin embargo diferentes autores definen distintos patrones de localización basados en imágenes de IF como apicales (Geisen y col. 2006; Kannan y col. 2006).

Está bien documentado, que en diversas líneas celulares y cultivos primarios tienden a perder el fenotipo de EPR en consecutivos pasajes.

El rompimiento de la adhesión celular induce una transición epitelio mesenquimal (TEM), resultando en la pérdida del fenotipo epitelial que puede ser irreversible (Grisanti y Guidry, 1995; Gallagher-Colombo y col. 2010; Tamiya y col. 2010; Adijanto y col. 2012). En consecuencia, sugerimos que α_1 y β_1 son el dímero que se envía por defecto a la membrana plasmática en células ARPE-19 no diferenciadas. Durante la re-morfogénesis, solamente algunas células ARPE-19 logran alcanzar la epitelialización y su fenotipo de EPR, mientras que otras se quedan en estado mesenquimal. Aquí nosotros aplicamos condiciones de cultivo que aumentan la proporción de células bien diferenciadas, pero aún no logramos obtener una población completamente diferenciada. Bajo esas condiciones mejoradas, la producción del dímero $\alpha_2\beta_2$ fue sobre expresada y después de 4 semanas de cultivo, una gran cantidad de células mostró un patrón de distribución apical para este dímero. Ciertamente el dímero $\alpha_2\beta_2$ estuvo ausente de la membrana basolateral. La localización apical aparente probablemente depende de la maduración y diferenciación de la maquinaria de tráfico apical, la cual bajo estas condiciones se adquiere parcialmente.

El factor de transcripción Sp1 se expresa en las células ARPE-19 y está involucrado probablemente en la regulación de la expresión de la subunidad β_2

Durante la re-morfogénesis, las cantidades relativas de ARNm de las subunidades α_2 y β_2 se incrementan (Fig. 10), indicando una regulación transcripcional de dichas subunidades y sugiriendo la participación de algún factor de transcripción. Basados en los trabajos de Kawakami y col. (1990; 1992; 1993) y de Avila y col. (1998), nosotros sospechamos que Sp1 podría estar al menos implicado en la regulación de la subunidad β_2 durante la re-morfogénesis.

Sp1 es un factor nuclear ubiquo que juega un papel importante en el mantenimiento basal de la transcripción de genes. Se han encontrado sitios de interacción en regiones de todos los promotores de las subunidades α y β de la Na^+, K^+ -ATPasa (Li y Langhans, 2015). Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de Sp1 afecta la expresión de la subunidad β_2 de la bomba de sodio, aclarando que este factor también está involucrado en la regulación de la subunidad β_2 en las células ARPE-19 (Fig. 11).

Evidencias recientes revelan otras funciones para Sp1, como la regulación de la transcripción de genes en respuesta a señales extracelulares como el estímulo con insulina. Sp1 media el entrecruzamiento de cascadas de señalización que regulan los genes blancos y responden a esa vía. Eso incluye, independientemente de la actividad de Sp1, la colaboración o competencia con otros factores de traducción. La adición de insulina (un componente del ITS) al medio de cultivo podría activar el factor de transcripción Sp1 que promueve la polarización de la Na^+, K^+ -ATPasa vía unión regulatoria positiva en *cis* de los genes de α_2 y β_2 (Shull y col. 1989; Kawakami y col. 1992). Esos datos sugieren que el factor de transcripción Sp1 está involucrado en la regulación de α_2 y β_2 , sin embargo, hace falta realizar más estudios para confirmar su participación en los mecanismos de regulación de la subunidad β_2 vía Sp1 en las células ARPE-19.

La polarización apical aparente de los dímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$ en células ARPE-19

En los epitelios clásicos, el mecanismo fundamental de la polarización basolateral de la Na^+, K^+ -ATPasa está relacionado con la expresión de las subunidades α_1 y β_1 . Sin embargo, los trabajos publicados sobre la composición isómero-específica de la Na^+, K^+ -ATPasa en las células EPR son confusos. El epitelio pigmentario de la retina es de origen neuroepitelial, por lo que anticipamos la expresión de la subunidad β_2 /AMOG (Fig. 9). La literatura incluye reportes consistentes y contradictorios: a) Los análisis de ARNm de EPR humana revelan la expresión de las subunidades α_1 , β_1 y β_2 pero no de la α_2 (Ruiz y col. 1995; 1996); b) La distribución de todas las subunidades, examinadas con doble y triple marca inmunofluorescente, revela que α_1 y β_1 son las isoformas que se expresan predominantemente en las células del EPR de rata y ratón, mientras que la subunidad β_2 se detectó en los fotorreceptores, células bipolares y células de Müller, pero no en el EPR (Wetzel y col. 1999); c) Estudios realizados en células del EPR *in vitro* (cultivos primarios ó líneas celulares inmortalizadas) usan anticuerpos contra la subunidad α_1 y β_1 para inmunodetectar a la Na^+, K^+ -ATPasa (Steinberg y Miller 1979; Rizzolo y Zhou, 1995; Burke y col. 2000; Rajasekaran y col. 2003; Kannan y col. 2006).

Todos esos datos son confusos, pero nuestras observaciones en las células ARPE-19 no polarizadas sugieren que el dímero $\alpha_1\beta_1$ es el constitutivo de la bomba de Na^+ y es esencial para todas las células vivas. Este dímero probablemente use los mecanismos de tráfico vesicular no diferenciados que lo envían a la membrana plasmática y se estabiliza al unirse a los contactos celulares, gracias a las interacciones *trans* β_1 - β_1 entre las células vecinas. Considerando que la subunidad β_2 es una molécula de adhesión en el ojo, ésta podría interactuar con una proteína en *trans* localizada en el segmento externo de la membrana del fotorreceptor (interacción heterotípica) estabilizando el complejo $\alpha_2\beta_2$ en el dominio apical. Nuestras imágenes obtenidas de secciones del ojo humano (Fig. 14) concuerdan con esta suposición. Es probable que la Na^+, K^+ -ATPasa sea solamente detectada en el dominio apical de células del EPR bajo condiciones muy específicas (Hu y col. 2001; Marrs y col. 1995; Rizzolo y Zhou, 1995; Kannan y col. 2006; Sonoda y col. 2009) debido a la ausencia

de interacciones entre las células del EPR y los fotorreceptores en cultivos *in vitro*. Evidentemente, la ausencia de los fotorreceptores en el lado apical del cultivo celular del EPR implica la carencia de algunos factores esenciales para la correcta función de las células EPR fuera de la retina. En varios modelos de EPR, la Na^+, K^+ -ATPasa es localizada en el dominio apical incluso en ausencia de los contactos con la retina. Sin embargo, en dichos estudios no se han hecho experimentos que confirmen la localización en la membrana apical por medio de co-tinciones con marcadores apicales o por biotinizaciones de la superficie celular (Okami et al., 1990; Rizzolo y Zhou, 1995; Kannan y col. 2006; Sonoda y col. 2009). Evidentemente, la ausencia de fotorreceptores en el lado apical de los cultivos EPR no significa que la Na^+, K^+ -ATPasa no esté siendo clasificada y enviada al dominio donde ejerce su función, pero si implica que el dímero $\alpha_1\beta_1$ no esté polarizado y vaya directamente a todos los dominios membranales, incluyendo el apical (Hu y col. 1994; Kannan y col. 2006; Sonoda y col. 2009). Nuestros experimentos de silenciamiento sostienen esta noción (Fig. 16 y 18). El silenciamiento parcial de la isoforma β_2 disminuye la localización apical de los dímeros $\alpha_2\beta_2$ pero no de $\alpha_1\beta_1$ (Fig. 16).

Durante la re-morfogénesis, la expresión de los dímeros no cesa. Sin embargo, la expresión de las subunidades α_2 y β_2 conforme pasa el tiempo de cultivo en células ARPE-19, nos indica que los mecanismos de tráfico vesicular también deben ser diferenciados y probablemente activados para asemejar el mecanismo que las células del EPR en el ojo presentan. En el caso de que los dímeros $\alpha_1\beta_1$ que sean enviados al dominio apical por un mecanismo no diferenciado, es más probable que no se establezca y rápidamente sea removido para ser redirigido al dominio basolateral o si el dímero está constituido por $\alpha_2\beta_1$ llegue al dominio apical y sea degradado. Por otra parte los dímeros $\alpha_2\beta_2$ son enviados directamente al dominio apical y no al basolateral (Fig. 12) ya que no los pudimos detectar durante el proceso de re-morfogénesis, indicando que la maquinaria de tráfico vesicular madura a la par de la expresión de dichas subunidades.

Función fisiológica de los dímeros $\alpha_x\beta_x$ de Na^+,K^+ -ATPasa en las células EPR

Las diferentes isoformas que componen a la Na^+,K^+ -ATPasa presentan distintas afinidades por el Na^+ , el K^+ y/o la ouabaina (Sweadner, 1989; Blanco y Mercer 1998; Wetzel y col. 1999). Por lo mismo, las diferentes combinaciones pueden producir diferentes consecuencias en el ambiente celular. Mientras que en los epitelios clásicos el dímero α_1/β_1 mantiene la homeostasis y volumen celular, en las células EPR el dímero α_2/β_2 está asociado con la regulación de la concentración del Na^+ en el espacio inter-retiniano, esencial para el proceso de la foto-transducción. La subunidad α_1 tiene alta afinidad por el Na^+ y la ouabaina, en contraste con la subunidad α_3 que presenta baja afinidad por este ion (Jewell y Lingrel, 1991; Munzer y col. 1994); la subunidad α_2 tiene una baja afinidad por la ouabaina y el K^+ (Crambert y col. 2000). El cambio de la expresión de las isoformas β_2 y β_3 por β_1 incrementa la afinidad por el Na^+ por parte de la bomba como se reportó en células Sf-9 de insecto (Yu y col. 1997; Blanco y Mercer 1998) y fotorreceptores (Wetzel y col. 1999). La asociación preferente de α_2 con β_2 (Tokhtaeva y col. 2012; Habeck y col. 2016) involucra una afinidad por el K^+ , nueve veces menor que la formada por la asociación de otras isoformas α y β (Crambert y col. 2000). En el espacio inter-retinal formado entre los fotorreceptores y la membrana apical de las células EPR, los canales de Na^+ regulan el paso del ion a través de la membrana plasmática del fotorreceptor y están normalmente abiertos en condiciones de oscuridad. La corriente asociada con este potencial se llama corriente oscura (Marmorstein, 2001). Esto lleva a la hiperpolarización de la membrana plasmática del fotorreceptor y el decremento del Na^+ en el espacio subretinal. Gracias a la polaridad apical de la Na^+,K^+ -ATPasa en las células EPR es posible el mantenimiento de altas concentraciones de Na^+ en el ambiente inter retiniano (Ames y col. 1992) y esto es debido a su conformación del dímero α_2/β_2 (Fig.14). Es probable que el dímero α_2/β_2 tenga una mayor importancia en el mantenimiento de los gradientes de Na^+ en el espacio subretinal a diferencia de las otras poblaciones de bombas presentes en ARPE-19 compuestas por los dímeros α_1/β_1 y α_1/β_3 (Fig.12) que tendría un papel trascendental en la homeostasis celular del K^+ en el dominio lateral.

El direccionamiento polarizado de las proteínas multiméricas de membrana es un mecanismo poco claro en las células EPR

Los modelos más comunes de envío de proteínas apicales y basolaterales en epitelios, se han obtenido estudiando las proteínas monoméricas (TfR, LDLR y FcR; Matter y col., 1994; Gan y col. 2002). Sin embargo, para las proteínas multiméricas, los modelos existentes no dejan en claro el mecanismo de polarización por ejemplo, de la Na⁺,K⁺-ATPasa. En consecuencia, el mecanismo por el cual el dímero $\alpha_2\beta_2$ llega a la membrana apical es pobremente comprendido.

Se acepta que las proteínas tienen señales de envío apicales o basolaterales y que, en algunos casos, dos o más señales coexistan o se opongan en la misma proteína (Philp y col. 2011). De este modo, en el caso de la Na⁺,K⁺-ATPasa se demostró claramente que la subunidad α_1 contiene una señal de direccionamiento basolateral que no ha podido ser identificada (Dunbar y col. 2000). Por otro lado, se comprobó que la subunidad β también posee una señal para su envío polarizado, que actúa como una señal de polaridad de menor jerarquía a la basolateral de α_1 . Particularmente, se demostró que la N-glicosilación de la subunidad β_2 funciona como una señal de envío apical (Vagin y col. 2005; 2006). Perez-Bay y col. (2014) estudiaron la transcitosis epitelial en células ARPE-19 de TfR (receptor de transferrina) que va desde la membrana basolateral hacia la apical, describiendo un mecanismo que depende de un sitio de N-glicosilación específico que funciona como una señal de envío hacia la apical, reconocido por Galectina-4. Sin embargo aunque la isoforma β_2 tiene de 7 a 9 N-glicosilaciones y en las células HGT-1 (línea celular de carcinoma gástrico) las N-glicosilaciones de β_2 funcionan como una señal de envío apical, no existen más evidencias que sugieran un mecanismo de transcitosis similar al observado en TfR para la Na⁺,K⁺-ATPasa que explique su envío al dominio apical en células del EPR. En células epiteliales LLC-PK1 y MDCK transfectadas con la isoforma β_2 , la Na⁺,K⁺-ATPasa se envía al dominio basolateral, sugiriendo que hay una señal dominante basolateral de α_1 sobre la señal apical de β_2 . (Vagin y col. 2005). Pero se tiene que considerar que las mismas señales de direccionamiento pueden ser interpretadas de diferentes maneras dependiendo el tipo celular utilizado (Castorino y col. 2011) como sería

el caso de las células del EPR. En los epitelios clásicos el mecanismo de polarización basolateral de la Na^+, K^+ -ATPasa está relacionado con la expresión de las subunidades α_1 y β_1 . Si bien se ha demostrado que la isoforma β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa juega un papel importante en el mecanismo de polarización de la bomba (Shoshani y col. 2005; Padilla-Benavides y col. 2010) en células EPR la isoforma β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa también está involucrada en el mecanismos de envío apical en estas células. Por estas observaciones se justifica el estudio sobre el papel de la subunidad β_2 en polaridad apical de la bomba de Na^+ en las células ARPE-19.

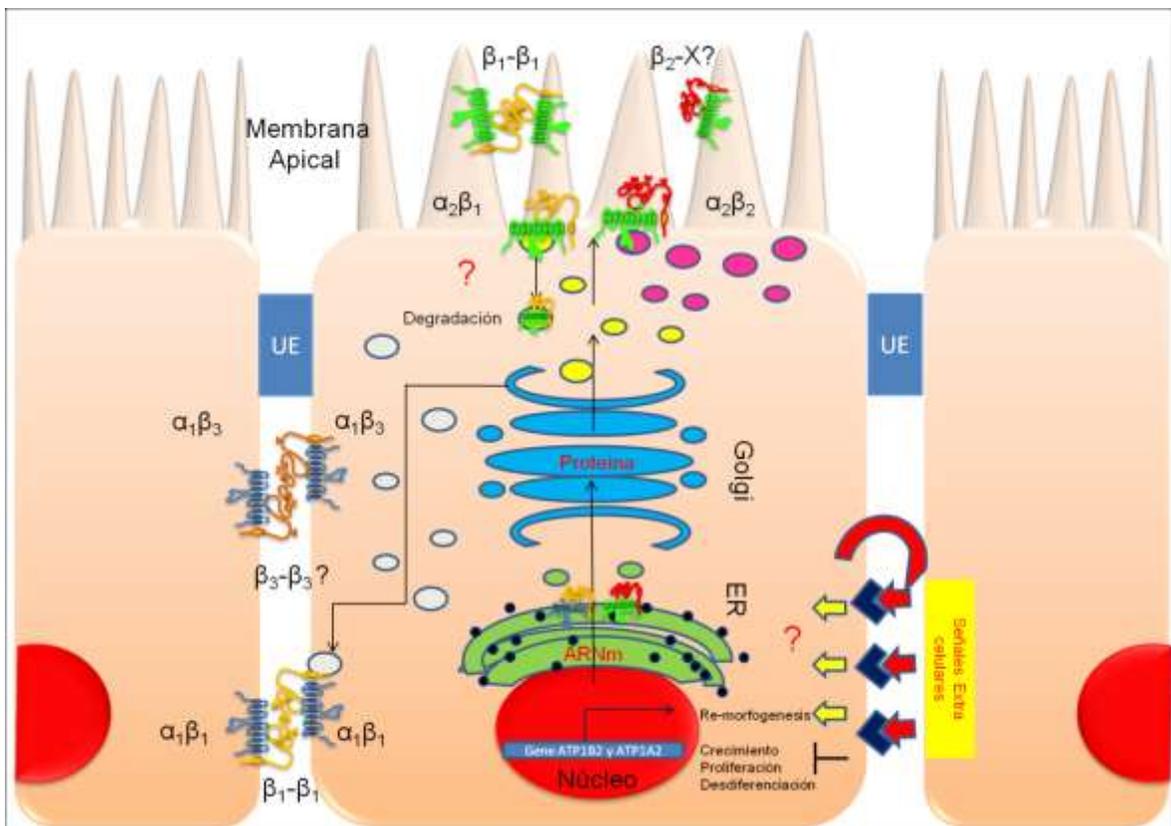


Figura 19. El direccionamiento apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en las células polarizadas ARPE-19, es regulada por las subunidades α_2 y β_2 . Las células ARPE-19 cultivadas durante 4 semanas en insertos recubiertos de laminina en presencia de ITS están polarizadas; las células son relativamente altas, expresando los marcadores EPR y formando las uniones oclusoras entre ellas. Nuestro modelo propone que las señales extracelulares inducen la transducción de señales que activa la re-morfogénesis. Consecuentemente, por un mecanismo poco estudiado, Sp1 activa la transcripción en el núcleo de los genes ATP1A2 y ATP1B2 . En células ARPE-19 polarizadas los mecanismos de exportación basolateral envían a los

dímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_1\beta_3$ a la membrana lateral (vesículas grises). Las trans-interacciones $\beta_1\text{-}\beta_1$ (y quizás $\beta_3\text{-}\beta_3$) entre las células vecinas estabiliza y retiene esos dímeros en la membrana lateral de la célula de manera constitutiva. Durante el proceso de re-morfogénesis los mecanismos de envío apical son activados por la asociación de las subunidades α_2 y β_2 . El dímero $\alpha_2\beta_2$ se envía de manera directa al dominio apical (vesículas purpuras) y es probable que se establezcan en una interacción heterotípica en trans con otra proteína del segmento externo del fotoreceptor ($\beta_2\text{-}X$). Nuestros estudios demuestran que la subunidad β_1 pero no la subunidad α_1 se encuentra en el dominio apical aunque en menor proporción. Una pequeña parte de la subunidad α_2 se asocia con la subunidad β_1 y son enviadas al dominio apical (vesículas amarillas). Es probable que este dímero no se establezca en el dominio apical y sea reciclado para ser degradado.

Nuestras observaciones sobre las células ARPE-19 polarizadas están resumidas en la figura 19, que esquematiza los datos complicados y confusos presentados en la literatura revisada.

1) La expresión de la isoformas β_1 de la $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPasa}$ es detectada en el dominio basolateral y apical respectivamente. Nuestras observaciones están de acuerdo con el trabajo de Hu y col. (1994), que aplicaron ouabaina del lado basal y apical en cultivos de EPR humano, demostrando que la bomba de sodio está presente en ambos dominios de la membrana.

2) En sistemas artificiales de expresión génica (ovocitos de *Xenopus*), cada una de las 4 isoformas de la subunidad α se asocian con cada una de las tres isoformas de la subunidad β y forman una bomba funcional (Blanco y Mercer 1998; Blanco 2005; Crambert y col. 2000) sin embargo, la combinación *in situ* de α/β son específicas y confieren tejido-especificidad funcional a la bomba. Demostramos que la combinación predominante en la membrana apical de las células polarizadas de ARPE-19 es $\alpha_2\beta_2$. Nuestros datos son consistentes con el concepto de que la isoforma α_2 prefiere unirse con la isoforma β_2 ensamblando a la $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPasa}$ en diferentes tejidos (Antonicek y col. 1987; Lin y col. 2005; Harada y col. 2006; Tokhtaeva y col. 2012) y se confirma con la co-localización de $\alpha_2\beta_2$ en secciones del ojo humano que mostramos en este trabajo.

3) La monocapa polarizada de ARPE-19, expresa las subunidades de la $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPasa}$ en un dominio específico de la membrana α_1 es detectado exclusivamente en el dominio basolateral y α_2 en el dominio apical (Fig. 12). La subunidad β_1 es localizada en el dominio apical y basolateral; β_2 está únicamente en el dominio apical mientras que la subunidad β_3 esta exclusivamente en el dominio basolateral. Las asociaciones $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_1\beta_3$ se encuentran en el dominio basolateral y $\alpha_2\beta_2$ en la apical. Lo que queda por clarificar es si la subunidad

β_1 esta co-localizada como dímero $\alpha_1\beta_1$ o en una combinación no preferencial con α_2 . Nosotros no detectamos α_1 en el dominio apical (Fig. 12). La subunidad β_1 no sale del retículo endoplasmico, ni llega a la membrana, sí no está ensamblada con la subunidad α_1 , por lo que es más probable que exista un dímero $\alpha_2\beta_1$. En este caso especulamos que α_2 tiene una información apical dominante. 4) Los ensayos de inmunofluorescencia en secciones de ojo de humano (Fig.14), cerdo y ratón (datos no mostrados) demuestran un claro marcaje apical en las células EPR con anticuerpos específicos contra la isoforma β_2 . Todos los datos sugieren que las Na^+, K^+ -ATPasa apical en el epitelio pigmentario de la retina está formada por las isoformas $\alpha_2\beta_2$ cada una con una señal de polarización apical, que son leídas y reconocidas por la maquinaria de tráfico vesicular de las células del EPR.

Enfermedades relacionadas con la subunidad β de la Na^+, K^+ -ATPasa en los epitelios

En recientes años se ha hecho evidente que la expresión y función de la Na^+, K^+ -ATPasa son esenciales para el mantenimiento del fenotipo epitelial normal. La expresión aberrante de las diferentes subunidades de la Na^+, K^+ -ATPasa en epitelios, involucra el desarrollo y progresión de varios cánceres (Vagin y col. 2005; Mijatovic y col. 2007; Einbond y col. 2008). Además, se ven alteradas, la proliferación, migración y apoptosis celular (Prassas y Diamandis 2008; Prassas y col. 2008). Por ejemplo, en el riñón poliquístico se observa el cambio en la expresión de la subunidad β_1 por β_2 (Wilson y col. 2000). Por otro lado la pérdida en la expresión de la subunidad β_2 de la bomba de Na^+ contribuye a la degeneración de astrocitos en el extremo final del tronco encefálico (Magyar y col. 1994) e incrementa las propiedades invasivas del glioblastoma multiforme (Sun y col. 2013).

En el caso de la retina, la expresión de las diferentes isoformas de las subunidades α y β es variable. En los fotorreceptores la Na^+, K^+ -ATPasa ($\alpha_3\beta_{2-3}$) se localiza en el soma y el segmento interno, pero no en el segmento externo (Wetzel y col. 1999), las células del EPR expresan α_2 y β_2 en el dominio apical (Fig. 12). La expresión de la subunidad β_2 probablemente esté implicada en el establecimiento y anclaje de la bomba de sodio en la membrana apical por interacción y unión de alguna proteína proveniente del segmento externo del fotorreceptor (N-CAM o lectina) y el mantenimiento del fotorreceptor. El

silenciamiento de la subunidad β_2 en ratones (Knock out) aumenta la apoptosis de los fotorreceptores (Magyar y col, 1994; Molthagen y col. 1996), como sucede en muchos de los modelos en ratones de Retinitis Pigmentosa (Chang y col. 1993; Lolley y col. 1994; Portera-Cailliau y col, 1994), por lo que no descartamos la participación de la subunidad β_2 en esta patología. La interacción entre los fotorreceptores y las células del EPR es muy importante: las células del EPR se encargan del mantenimiento completo de los fotorreceptores que abarca desde el intercambio de nutrientes y deshechos hasta la secreción de factores de crecimiento. El tener esa íntima asociación implica que la falta o separación de estas células provoque una pérdida de funciones, des-diferenciación y desarrollo de procesos patológicos como Retinoblastoma (es posible que la subunidad β_2 esté involucrada en este mecanismo). Sumado a esto el silenciamiento de la subunidad β_1 de la Na^+, K^+ -ATPasa está asociada con el cambio en la forma celular de los epitelios en el cáncer y la fibrosis (Rajasekaran y col. 1999; 2001; 2010) e induce la transición epitelio mesenquimal en células ARPE-19 (Mony y col. 2013), por lo que no descartamos tampoco que también este asociada con procesos cancerosos en ojo.

CONCLUSIONES

- Nuestros resultados indican que las células ARPE-19 cultivadas bajo nuestras condiciones llevan a cabo el proceso de la re-morfogénesis, diferenciando la monocapa en un epitelio con fenotipo EPR.
- El mecanismo de regulación de la expresión de las isoformas α_2 y β_2 de la Na^+, K^+ -ATPasa tiene al menos un componente transcripcional y probablemente involucre al factor de transcripción Sp1.
- La Na^+, K^+ -ATPasa apical está compuesta por el dímero $\alpha_2\beta_2$, y es enviada directamente a dicho dominio.
- El silenciamiento de la expresión de la subunidad β_2 por siRNA, disminuye notablemente la localización apical de la bomba.
- La isoforma β_2 es responsable de la polaridad apical de la Na^+, K^+ -ATPasa en las células EPR.

PERSPECTIVAS

Como perspectiva de estudio nos hemos propuesto analizar la maquinaria de envío y rutas de tráfico que dirigen a los complejos $\alpha_2\beta_2$ al dominio apical en las células ARPE-19 con un fenotipo polarizado e identificar la molécula de los fotoreceptores ó del espacio inter-retiniano que estabiliza a la bomba de sodio en el dominio apical. Así también como estudiar que otros factores de transcripción río arriba o abajo regulan el gen ATP1B2.

Cabe destacar que esta investigación pretende coadyuvar en el entendimiento de los procesos de diferenciación de la retina y como la Na^+, K^+ -ATPasa mantiene fisiológica y estructuralmente la asociación de los fotoreceptores y las células EPR. Con esta investigación pretendemos que auxilie en la búsqueda y desarrollo de nuevos tratamientos moleculares para enfermedades de la retina como retinitis pigmentosa y retinoblastomas u otra relacionada con desordenes metabólicos y celulares.

LITERATURA CITADA

1. Ackermann, U., y Geering, K., 1990. Mutual dependence of Na,K-ATPase alpha- and beta-subunits for correct posttranslational processing and intracellular transport. *FEBS Lett.* 269: 105-108
2. Adijanto J, Castorino JJ, Wang ZX, Maminishkis A, Grunwald GB, Philp NJ. 2012. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression. *J Biol Chem.* 8: 287 (24): 20491-503.
3. Ahmado A, Carr AJ, Vugler AA, Semo M, Gias C, Lawrence JM, Chen LL, Chen FK, Turowski P, da Cruz L, Coffey PJ. 2011 Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 9;52(10):7148-59.
4. Ames A 3rd, Li YY, Heher EC, Kimble CR. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J Neurosci.* 1992 Mar;12(3):840-53.
5. Antonicek H, Persohn E, Schachner M. 1987. Biochemical and functional characterization of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. *J Cell Biol.* ;104(6):1587-95.
6. Arystarkhova E., Sweadner K. J. 1997. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase β 3 subunit. The presence of β 3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J. Biol. Chem.* 272:22405–22408.
7. Avila J, Alvarez de la Rosa D, González-Martínez LM, Lecuona E, Martín-Vasallo P. 8;287(24):20491-503. Structure and expression of the human Na,K-ATPase beta 2-subunit gene. *Gene.* 1998 Feb 27;208(2):221-7.
8. Bad-Dinitz, E., S. Albeck, Y. Peleg, V. Brumfeld, K. E. Gottschalk, and S. J. D. Karlish, 2009. A C-Terminal Lobe of the β subunit of Na,K-ATPase and H,K-ATPase Resembles Cell Adhesion Molecules. *Biochemistry*, 48: 8684-8691
9. Beggah A.T., Jaunin P., Geering K., 1997. Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry.* 11; 272 (15): 10318-10326
10. Bennett, V., 1990. Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 51-56
11. Besirli C. G., Gong T. W., Lomax M. I. 1997. Novel β 3 isoform of the Na,K-ATPase β subunit from mouse retina. *Biochim. Biophys. Acta* 1350:21–26.
12. Blanco G. 2005. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin Nephrol.*;25(5):292-303.
13. Blanco G., DeTomaso A. W., Koster J., Xie Z. J., Mercer R. W. 1994. The α -subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the β -subunit. *J. Biol. Chem.* 269:23420–23425.
14. Blanco G., Koster J. C., Sanchez G., Mercer R. W. 1995. Kinetic properties of the α 2 β 1 and α 2 β 2 isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 34:319–325.

15. Blanco G., Mercer R. W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology*, 275 (52): F633-650
16. Blanco G., Sanchez G., Mercer R. W. 1995. Comparison of the enzymatic properties of the Na,K-ATPase $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 3\beta 2$ isozymes. *Biochemistry*
17. Bok, D. 1982, Autoradiographic studies on the polarity of plasma membrane receptors in retinal pigment epithelial cells. In: Hollyfield J. G. (ed), *The Structure of Eye*. Elsevier, New York, :247-256
18. Bouwman P, Philipsen S. 2002. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol*. 30;195(1-2):27-38.
19. Burke JM, Cao F, Irving PE.2000. High levels of E-/P-cadherin: correlation with decreased apical polarity of Na/K ATPase in bovine RPE cells in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. ;41(7):1945-52.
20. Burke, J. M. and Hjelmeland L. M., 2005. Mosaicism of the Retinal Pigment Epithelium: seeing the small picture. *Molecular interventions*, 5: 241-249
21. Burke, J. M., 2008. Epithelial phenotype and the RPE: Is the answer blowing in the Wnt?. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27: 579-595
22. Caplan, M. J., Aderson, H. C., Palade, G. E., and Jamieson, J. D., 1986. Intracellular sorting and polarized cell surface delivery of (Na⁺,K⁺) ATPase, an endogenous component of MDCK cell basolateral plasma membranes. *Cell* 46: 623-631.
23. Castorino, J. J., Deborde, S., Deora, A., Schreiner, R., Gallagher-Colombo, S. M., Rodriguez-Boulan, E., et al. 2011. Basolateral sorting signals regulating tissuespecific polarity of heteromeric monocarboxylate transporters in epithelia. *Traffic* 12, 483–498.
24. Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD. 1978.Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol.*;77(3):853-80
25. Cereijido M., Contreras R. G., Shoshani L. 2001. The polarized distribution of Na⁺,K⁺-ATPase and active transport across epithelia. *J Membr Biol*. 1;184(3):299-304.
26. Cereijido M., Contreras R. G., Shoshani L. y Garcia-Villegas M.R., 2003. Membrane targeting. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81: 81-115
27. Cereijido M., Contreras R. G., Shoshani L., Flores-Benitez D., Larre I., 2008. Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochem. Biophys. Acta*. 1778 (3): 770-793.
28. Cereijido M, Ehrenfeld J, Meza I, Martínez-Palomo A. 1980. Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J Membr Biol.*;52(2):147-59.

29. Cereijido, M., Contreras R. G., and Shoshani L., 2004. Cell Adhesión, Polarity, and Epithelial in the Dawn of Metazoans. *Physiol. Rev.*, 84: 1229-1262.
30. Cereijido, M., Ehrenfeld, J., Meza, I., and Martinez-Palomo, A., 1980. Structural and functional membrane polarity in cultura monolayers of MDCK cell. *J. Membr. Biol.* 52: 147-159
31. Chalcroft J.P., S. Bullivant 1970. An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze–fracture replicas of both sides of the fracture. *J. Cell Biol.*, 47 (1970), pp. 49–60
32. Chang GQ, Hao Y, Wong F. 1993. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron.*;11(4):595-605.
33. Chow D. C., Forte J. G. 1995. Functional significance of the β subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J. Exp. Biol.* 198:1–17.
34. Contreras RG, Lázaro A, Bolivar JJ, Flores-Maldonado C, Sánchez SH, González-Mariscal L, García-Villegas MR, Valdés J, Cereijido M. 1995. A novel type of cell-cell cooperation between epithelial cells. *J Membr Biol.*;145(3):305-10.
35. Contreras, R. G., Avila, G., Guitierrez, C., Bolivar, J. J., Gonzalez-Mariscal, L., Darzon, A., Beaty, G., Rodriguez-Boulan, E., and Cereijido, M., 1989. Repolarization of Na⁺-K⁺ pumps during establishment of epithelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 257: C896-C905
36. Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lazaro, A., Monroy, A. O., Roldan, L., Florentino, R., and Cereijido, M., 2002. E-cadherin and tight junctions between epithelial cells of different animal species. *Pflugers Arch.*, 444: 467-475.
37. Cortas N, Elstein D, Markowitz D, Edelman IS. 1991. Anomalous mobilities of Na,K-ATPase alpha subunit isoforms in SDS-PAGE: identification by N-terminal sequencing. *Biochim Biophys Acta.*18;1070(1):223-8.
38. Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelièvre L, Geering K. 2000. Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isozymes. *J Biol Chem.* 21;275(3):1976-86.
39. Daniele LL, Adams RH, Durante DE, Pugh EN Jr, Philp NJ. 2007. Novel distribution of junctional adhesion molecule-C in the neural retina and retinal pigment epithelium. *J Comp Neurol.* 10;505(2):166-76.
40. 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.* 21;16(4):408-14.
41. Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau-Hannedouche O, Maes E, Pons A, André S, Le Bivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K, Huet G. 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol.* 9;169(3):491-501
42. Delacour D, Koch A, Ackermann W, Eude-Le Parco I, Elsässer HP, Poirier F, Jacob R. 2008. Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo. *J Cell Sci.* 15;121(Pt 4):458-65.

43. Deora A.A., Philp N., Hu J., Bok D., and Rodriguez-Boulau, E., 2005. Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia. *PNAS* 45 (102):16245-16250
44. Deora AA, Gravotta D, Kreitzer G, Hu J, Bok D, Rodriguez-Boulau 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(9):4148-65.
45. Dunbar L. A., Roush D. L., Courtois-Coutry N., Muth T. R., Gottardi C. J., Rajendran V., Geibel J., Kashgarian M. y M. J. Caplan, 1997. Sorting of ion pumps in polarized epithelial cells. *Academy of Sciences*: 514-523
46. Dunbar, L. A., and Caplan, M. J., 2000. The cell biology of ion pumps: sorting and regulation. *Eur. J. Cell. Biol.* 79: 557-563
47. Dunn K. C., A. E. Aotaki-Keen, F. R. Putkey y L. M. Hjelmeland, 1996. Arpe-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Exp. Eye Res.* 62: 155-169
48. Eakle K. A., Kabalin M. A., Wang S. G., Farley R. A. 1994. The influence of β subunit structure on the stability of Na^+/K^+ -ATPase complexes and interaction with K^+ . *J. Biol. Chem.* 269:6550–6557.
49. Eakle K. A., Lyu R. M., Farley R. A. 1995. The influence of β subunit structure on the interaction of Na^+/K^+ -ATPase complexes with Na^+ . A chimeric β subunit reduces the Na^+ dependence of phosphoenzyme formation from ATP. *J. Biol. Chem.* 270:13937–13947.
50. Einbond LS, Shimizu M, Ma H, Wu HA, Goldsberry S, Sicular S, Panjikanan M, Genovese G, Cruz E. 2008. Actin inhibits the Na^+/K^+ -ATPase and enhances the growth inhibitory effect of digitoxin on human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 31;375(4):608-13.
51. Ernst, S. A., and Mills, J. W., 1980. Autoradiographic localization of tritiated ouabain-sensitive sodium pump sites in ion transporting epithelia. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 72-77
52. Fambrough, D. M., 1988. The sodium pump becomes a family. *Trends Neurosci.* 11, 325-328
53. Fambrough, D. M., and Bayne, E. K., 1983. Multiple forms of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in the chicken. Selective detection of the major nerve, skeletal muscle, and kidney form by a m Ab. *J. Biol. Chem.* 258: 3926-3935
54. Farquhar M.G., G.E. Palade. 1963. Functional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.*, 17, pp. 375–412.
55. Farr G., Hull M., Mellman, I., and Caplan M. 2009. Membrane proteins follow multiple pathways to the basolateral cell surface in polarized epithelial cells. *The Journal of Cell Biology.* 186 (2): 269-282.
56. Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino and Mellman, 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cell. *Cell* 99: 189-198

57. Gallagher-Colombo S, Maminishkis A, Tate S, Grunwald GB, Philp NJ. 2010. Modulation of MCT3 expression during wound healing of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;51(10):5343-50.
58. Gallemore R.P., Hughes B. A., Miller S.S., 1998. Light-induced responses of the retinal pigment epithelium. In: Marmor M. F., Wolfensberger T.J. eds. *The Retinal Pigment Epithelium*. New York: Oxford University Press: 175-198
59. Garty H, Karlish SJ. 2006. Role of fxyd proteins in ion transport. *Annu Rev Physiol* 68: 431–459.
60. Geering K. 2006 .FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F241–F250
61. Geering, K., 2001. The functional role of β subunits in oligomeric P- type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 425-438
62. Geering, K., Theulaz, I., Verrey, F. Hauptle, M. T., y Rossier, B. C., 1989. A role for the beta-subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* 257: C851-C858
63. Geisen P, McColm JR, King BM, Hartnett ME. 2006. Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture. *Curr Eye Res.*;31(9):739-48.
64. Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K. J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M., and Schachner, M., 1990. The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the β subunit of the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 110: 165-174
65. Glynn I. M. 1993. All hands to the sodium pump. *J. Physiol. (Lond.)* 462:1–30.
66. Gonzalez A, Rodriguez-Boulan E. 2009. Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett.* 3;583(23):3784-95.
67. Gonzalez-Mariscal L, Hernández S, Vega J. 2008 Inventions designed to enhance drug delivery across epithelial and endothelial cells through the paracellular pathway. *Recent Pat Drug Deliv Formul.*;2(2):145-76.
68. Gonzalez-Mariscal, L., Chavez, D. R., Lazaro, A., and Cerejido, M, 1989. Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities. *J. Membr. Biol.* 107: 43-56.
69. Grisanti S, Guidry C. 1995. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;36(2):391-405.
70. Gundersen, D., Orłowski, J. and Rodriguez-Boulan, E., 1991. Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 112:863-872

71. Gundersen, D., Powell, S.K., Rodriguez-Boulan, E., 1993. Apical polarization of N-CAM in retinal pigment epithelium is dependent on contact with the neural retina. *J. Cell Biol.* 121: 335-343
72. Habeck M, Tokhtaeva E, Nadav Y, Ben Zeev E, Ferris SP, Kaufman RJ, Bab-Dinitz E, Kaplan JH, Dada LA, Farfel Z, Tal DM, Katz A, Sachs G, Vagin O, Karlisch SJ. 2016. Selective Assembly of Na,K-ATPase $\alpha 2\beta 2$ Heterodimers in the Heart: distinct functional properties and isoform-selective inhibitors. *J Biol Chem.* 28;291(44):23159-23174.
73. Hammerton M. D., Shrank A.B., 1988. Congenital hypertrophy of the lateral nail folds of the hallux. *Pediatric Dermatology*, 5 (4): 243-245
74. Hammerton, R. W., Krzeminski, K. A., Mays, R. W., Ryan, T.A., Wollner, D.A., and Nelson, W. J., 1991. Mechanism for regulating cell surface distribution of Na⁺,K⁺(+)-ATPase in polarized epithelial cells. *Science* 254: 847-850
75. Harada, K., Lin, H., Endo, Y., Fujishiro, N., Sakamoto, Y., and Inoue, M. 2006. Subunit composition and role of Na⁺,K⁺-ATPases in ventricular myocytes. *J. Physiol. Sci.* 56, 113–121.
76. Hieber V., Siegel G. J., Fink D. J., Beaty M. W., Mata M. 1991. Differential distribution of (Na,K)-ATPase alpha isoforms in the central nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11:253–262.
77. Hu J, Bok D. 2001. A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers. *Mol Vis.* 7;7:14-9
78. Hundal H. S., Marette A., Mitsumoto Y., Ramlal T., Blostein R., Klip A. 1992. Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na,K-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 267:5040–5043.
79. Jacob R., Alfalah M., Grunberg J., Obendorf M, Naim H.Y., 2000. Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brushborder membrane protein. *Journal of biological chemistry.* 275: 6566-6572
80. Jaisser F., Horisberger J. D., Rossier B. C. 1992. The β subunit modulates potassium activation of the Na-K pump. *Ann. NY Acad. Sci.* 671:113–119.
81. Jaitovich, A.A., Bertorello, A.M., 2006. Na⁺,K⁺-ATPase: an indispensable ion pumping-signaling mechanism across mammalian cell membranes. *Semin. Nephrol.*, 26: 386-392
82. Jewell EA, Lingrel JB. 1991. Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J Biol Chem.* 5;266(25):16925-30.
83. Jørgensen P. L. 1990. Structure and molecular mechanisms of the Na,K-pump. *Monovalent Cations in Biological Systems.* (CRC, Boca Raton, FL), pp 117–154.

84. Just, F. and Walz, B., 1994. Immunocytochemical localization of Na⁺/K⁺-ATPase and V-H⁺-ATPase in the salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res.* 278:161-170
85. Kannan R, Zhang N, Sreekumar PG, Spee CK, Rodriguez A, Barron E, Hinton DR. 2006. Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis.* 22;12:1649-59.
86. Kashgarian, M. Biemesderfer, D., Caplan, M., and Forbush, B., 3rd, 1985. mAb to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int.* 28: 899-913
87. Kawakami K, Okamoto H, Yagawa Y, Nagano K. 1990. Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase. II. Cloning and analysis of the 5'-flanking region of the rat NKAB2 gene encoding the beta 2 subunit. *Gene.* 16;91(2):271-4.
88. Kawakami K, Suzuki-Yagawa Y, Watanabe Y, Nagano K, 1992. Identification and characterization of the cis-elements regulating the rat AMOG (adhesion molecule on glia)/Na,K-ATPase beta 2 subunit gene. *J Biochem.* 111(4):515-522
89. Kawakami K, Watanabe Y, Araki M, Nagano K., 1993. Sp1 binds to the adhesion-molecule-on-glia regulatory element that functions as a positive transcription regulatory element in astrocytes. *J Neurosci Res.* 35(2):138-146.
90. Kivelä T, Jääskeläinen J, Vaheri A, Carpén O. 2000. Ezrin, a membrane-organizing protein, as a polarization marker of the retinal pigment epithelium in vertebrates. *Cell Tissue Res.*; 301(2):217-23.
91. Koefoed-Johnsen, V., and Ussing, H. H., 1958. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.* 42: 298-308
92. Lavoie L., Levenson R., Martin-Vasallo P., Klip A. 1997. The molar ratios of α and β subunits of the Na⁺-K⁺-ATPase differ in distinct subcellular membranes from rat skeletal muscle. *Biochemistry* 36:7726–7732
93. Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E. 2014. Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Exp Eye Res.*;126:5-15.
94. Li Z, Langhans SA. 2015 Transcriptional regulators of Na,K-ATPase subunits. *Front Cell Dev Biol.* 26;3:66.
95. Lin, H., Ozaki, S., Fujishiro, N., Takeda, K., Imanaga, I., Prestwich, G. D., et al. 2005. Subunit composition and role of Na⁺,K⁺-ATPases in adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* 564, 161–172
96. Lisanti MP, Caras IW, Davitz MA, Rodriguez-Boulan E. 1989. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.*;109(5):2145-56.

97. Liu X, Spicarová Z, Rydholm S, Li J, Brismar H, Aperia A. 2008. Ankyrin B modulates the function of Na,K-ATPase/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor signaling microdomain. *J Biol Chem.*;283(17):11461-8
98. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*;25(4):402-8.
99. Lolley RN, Rong H, Craft CM. 1994. Linkage of photoreceptor degeneration by apoptosis with inherited defect in phototransduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;35(2):358-62.
100. Lopina O.D., 2000. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, mechanism and regulation. *Membrane and Cell Biology*, 12: 721-744
101. Lubarski I, Pihakaski-Maunsbach K, Karlsh SJ, Maunsbach AB, Garty H. 2005. Interaction with the Na,K ATPase and tissue distribution of FXYD5 (related to ion channel). *J Biol Chem* 280: 37717–37724.
102. Lubarski I, Karlsh SJD, Garty H. 2007. Structural and functional interactions between FXYD5 and the Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1818–F1826.
103. Luo Y., Y. Zhuo, M. Fukuhara, y L. Rizzolo, 2006. Effects of Culture Conditions on Heterogeneity and the Apical Junctional Complex of the ARPE-19 Cell Line. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (8): 3644-3655
104. Lytton J., Lin J. C., Guidotti G. 1985. Identification of two molecular forms of (Na⁺,K⁺)-ATPase in rat adipocytes. Relation to insulin stimulation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 260:1177–1184.
105. Magyar JP, Bartsch U, Wang ZQ, Howells N, Aguzzi A, Wagner EF, Schachner M. 1994. Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on Glia, the beta 2 subunit of murine Na,K-ATPase. *J Cell Biol.*;127(3):835-45.
106. Malik N., Canfield V. A., Beckers M. C., Gros P., Levenson R. 1996. Identification of the mammalian Na,K-ATPase β3 subunit. *J. Biol. Chem.* 271:22754–22758.
107. Maminishkis A, Chen S, Jalickee S, Banzon T, Shi G, Wang FE, Ehalt T, Hammer JA, Miller SS. 2006. Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;47(8):3612-24.
108. Marmorstein A. D., 2001. Review: The Polarity of the Retinal Pigment Epithelium. *Traffic* 2: 867-872
109. Marmorstein A.D., Bonilha V.L., Chiflet S., Neill J. M. Rodriguez-Boulan E., 1996. The polarity of the plasma membrane protein RET-PE2 in retinal pigment epithelium is developmentally regulated. *J. Cell Sci.*, 109: 3025-3034

110. Marrs JA, Andersson-Fisone C, Jeong MC, Cohen-Gould L, Zurzolo C, Nabi IR, Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ. 1995. Plasticity in epithelial cell phenotype: modulation by expression of different cadherin cell adhesion molecules. *J Cell Biol.* ;129(2):507-19.
111. Martin-Vasallo P., Dackowski W., Emanuel J. R., Levenson R. 1989. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 264:4613–4618.
112. Martin-Vasallo P, Ghosh S, Coca-Prados M. 1989. Expression of Na,K-ATPase alpha subunit isoforms in the human ciliary body and cultured ciliary epithelial cells. *J Cell Physiol.*;141(2):243-52.
113. Matter K, Hunziker W, Mellman I. 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell.*;71(5):741-53.
114. Matter K. 2000. Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr Biol.*;10(1):R39-42. Review.
115. Matter,K., Yamamoto, E. M., and Mellman, I. 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 126, 991–1004.
116. Mays RW, Siemers KA, Fritz BA, Lowe AW, van Meer G, Nelson WJ. 1995. Hierarchy of mechanisms involved in generating Na/K-ATPase polarity in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol.*;130(5):1105-15
117. McDonough A. A., Geering K., Farley R. A. 1990. The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J.* 4:1598–1605.
118. McGrail K. M., Phillips J. M., Sweadner K. J. 1991. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J. Neurosci.* 11:381–391.
119. Mercer R. W. 1993. Structure of the Na,K-ATPase. *Int. Rev. Cytol.* 137:139–168.
120. Mercer, R. W., Schneider, J. W. y Benz, E. J., 1988. Molecular cloning and characterization of alfa-subunit isoform of the Na⁺,K⁺- ATPase. *Progress in Clinical Biological Research*, 268: 119-126
121. Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, Nilsson B, Mathieu A, Van Vynckt F, Darro F, Blanco G, Facchini V, Kiss R. 2007. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol.* ;212(2):170-9.
122. Miller S.S., Steinberg R.H., Okley B., 1978. II The electrogenic Na⁺ pump of the flog retinal pigment epithelium. *Journal of Membrane Biology*, 44: 259-279

123. Miller TJ, Davis PB. 2008. FXVD5 modulates Na⁺ absorption and is increased in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L654–L664.
124. 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.*12;107(41):17633-8.
125. Molthagen M, Schachner M, Bartsch U. 1996. Apoptotic cell death of photoreceptor cells in mice deficient for the adhesion molecule on glia (AMOG, the beta 2- subunit of the Na,K-ATPase). *J Neurocytol.*;25(4):243-55.
126. Mony S, Lee SJ, Harper JF, Barwe SP, Langhans SA. 2013. Regulation of Na,K-ATPase β1-subunit in TGF-β2-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human retinal pigmented epithelial cells. *Exp Eye Res.*;115:113-22.
127. Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sørensen TL, Petersen J, Andersen JP, Vilsen B, Nissen P. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature.*;450(7172):1043-9.
128. Munzer JS, Daly SE, Jewell-Motz EA, Lingrel JB, Blostein R. 1994. Tissue- and isoform-specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem.* 17;269(24):16668-76.
129. Muth TR, Gottardi CJ, Roush DL, Caplan MJ. 1998. A basolateral sorting signal is encoded in the alpha-subunit of Na-K-ATPase. *Am J Physiol.* ;274(3 Pt 1):C688-96.
130. Nejsum L. N. y J. Nelson, 2009. Epithelial cell surface polarity: the early steps. *Frontiers in Bioscience*14: 1088-1098
131. Nelson W. J., Hammerton, R.W. and Mcneil H., 1991. Role of the membrane-cytoskeleton in the spatial organization of the Na⁺ K⁺ ATPase in polarized epithelial cells. *Physiology*, 47: 7-87
132. Nelson, W. J. and P. J. Veshnock. 1987. Ankyrin binding to (Na⁺ + K⁺) ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cell. *Nature*, 328: 533-536
133. Nelson, W.J. 1991. Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells. *Semin. Cell Biol.* 2: 375-385
134. Newell, F. W.,1993. *Conceptos fundamentales de oftalmología*. Ed. Mosby: 6-98
135. Noguchi, S., Mishina, M., Kawamura, M. y Numa, S., 1987. Expression of functional (Na⁺ /K⁺)-ATPase from cloned cDNAs. *FEBS Lett.* 225: 27-32
136. Ohtsubo M, Noguchi S, Takeda K, Morohashi M, Kawamura M. 1990. Site-directed mutagenesis of Asp-376, the catalytic phosphorylation site, and Lys-507, the putative ATP-binding site, of the alpha-subunit of *Torpedo californica* Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta.*;1021(2):157-60.

137. Okami T, Yamamoto A, Omori K, Takada T, Uyama M, Tashiro Y. 1990. Immunocytochemical localization of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in rat retinal pigment epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* ;38(9):1267-75.
138. Padilla-Benavides T, Roldán M. L., Larre I., Flores-Benitez D., Villegas-Sepúlveda N., Contreras R.G., Cerejido, M. y Shoshani.L., 2010.The Polarized Distribution of Na⁺,K⁺-ATPase: Role of theInteraction between β Subunits. *Molecular Biology of the Cell*, 21: 2217-2225
139. Paul S. M., Palladino M. J. and G. J. Beitel., 2007. A Pump-independent function of the Na⁺,K⁺ ATPase is required for epithelial junction function and tracheal tubesize control. *Development.* 134:147-155
140. Pedemonte C. H., Kaplan J. H. 1990. Chemical modification as an approach to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am. J. Physiol.* 258(*Cell Physiol.* 27):C1–C23.
141. Peng L., Martin-Vasallo P., Sweadner K. J. 1997. Isoforms of Na,K-ATPase α and β subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J. Neurosci.* 17:3488–3502.
142. Perez Bay, A. E., Schreiner, R., Benedicto, I., and Rodriguez-Boulan, E. J. 2014. Galectin-4-mediated transcytosis of transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 127, 4457–4469.
143. Philp N.J., Yoon H., y Grollman E.F., 1998. Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MTC3 in the basal membrane of rat RPE. *Am. J. Physiol*, 274: R1824-R1828
144. Philp, N. J., Shoshani, L., Cerejido, M., and Rodriguez-Boulan, E. 2011. “Epithelial domains,” in *Cellular Membrane Domains*, ed I. R. Nabi (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.), 351–369
145. Platt, O.S., Lux, S.E., Falcone, J. F., 1993. A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin. *J. Biol. Chem.* 268: 24421-24426
146. Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R. 1994. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;91(3):974-8.
147. Prassas I, Paliouras M, Datti A, Diamandis EP. 2008. High-throughput screening identifies cardiac glycosides as potent inhibitors of human tissue kallikrein expression: implications for cancer therapies. *Clin Cancer Res.*15;14(18):5778-84.
148. Prassas I, Diamandis EP. 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov.*;7(11):926-35.

149. Rajasekaran SA, Ball WJ Jr, Bander NH, Liu H, Pardee JD, Rajasekaran 1999. AK. Reduced expression of beta-subunit of Na,K-ATPase in human clear-cell renal cell carcinoma. *J Urol.*;162(2):574-80.
150. Rajasekaran SA, Gopal J, Rajasekaran AK. 2003. Expression of Na,K-ATPase beta-subunit in transformed MDCK cells increases the translation of the Na,K-ATPase alpha-subunit. *Ann N Y Acad Sci.*;986:652-4
151. Rajasekaran SA, Huynh TP, Wolle DG, Espineda CE, Inge LJ, Skay A, Lassman C, Nicholas SB, Harper JF, Reeves AE, Ahmed MM, Leatherman JM, Mullin JM, Rajasekaran AK. 2010. Na,K-ATPase subunits as markers for epithelial-mesenchymal transition in cancer and fibrosis. *Mol Cancer Ther.* ;9(6):1515-24.
152. Rajasekaran, S. A., Barwe, S. P., and Rajasekaran, A. K., 2005. Multiple functions of Na,K-ATPase in epithelial cells. *Semin. Nephrol.* 25: 328-334
153. Rajasekaran, S. A., Palmer, L. G., Quan, K., Harper, J. F., Ball, W. J. Jr., Bander, N. H., Peralta Soler, A., and Rajasekaran, A. K., 2001. Na,K-ATPase β subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility. *Mol. Biol. Cell* 12: 279-295
154. Rizzolo LJ, Zhou S. 1995. The distribution of Na⁺,K⁺-ATPase and 5A11 antigen in apical microvilli of the retinal pigment epithelium is unrelated to alpha-spectrin. *J Cell Sci.*;108 (Pt 11):3623-33.
155. Rodriguez-Boulan E., Kreitzer G. y A Müsch, 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Molecular cell biology.* 6: 233-247
156. Ruiz A, Bhat SP, Bok D. 1996. Expression and synthesis of the Na,K-ATPase beta 2 subunit in human retinal pigment epithelium. *Gene.*17;176(1-2):237-42.
157. Ruiz A, Bhat SP, Bok D. 1995. Characterization and quantification of full-length and truncated Na,K-ATPase alpha 1 and beta 1 RNA transcripts expressed in human retinal pigment epithelium. *Gene.*3;155(2):179-84.
158. Sakisaka, T., Ikeda, W., Ogita, H., Fujita, N., and Takai, Y., 2007. The roles of nectins in cell adhesions: Cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 593-602
159. Scheiffele P, Roth MG, Simons K. 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 15;16(18):5501-8.
160. Scheiffele P, Peränen J, Simons K. 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature.* 2;378(6552):96-8.
161. Shamraj O. I., Lingrel J. B. 1994. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase α subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12952-12956.

162. Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C., 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459: 446-450
163. Shoshani, L. and Contreras, R. G., 2001. Biogenesis of Epithelial Polarity and Tight Junctions. In: *Tight Junctions*, ed. M.Cereijido and J. M. Anderson, Boca Raton FL: CRC Press: 165-197
164. Shoshani, L., Contreras, R. G., Roldan, M. L., Moreno, J., Lazaro, A. Balda, M. S., Matter, K., and Cereijido, M., 2005. The polarized expression of Na⁺,K⁺-ATPase in epithelia depends on the association between β-subunits located in neighboring cell. *Mol. Biol. Cell* 16: 1071-1081
165. Shull G. E., Greeb J., Lingrel J. B. 1986. Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit from rat brain. *Biochemistry* 25:8125–8132.
166. Shull G. E., Schwartz A., Lingrel J. B. 1985. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature* 316:691–695.
167. Shull MM¹, Pugh DG, Lingrel JB. 1989. Characterization of the human Na,K-ATPase alpha 2 gene and identification of intragenic restriction fragment length polymorphisms. *J Biol Chem.* 15;264(29):17532-43.
168. Shyjan A. W., Cena V., Klein D. C., Levenson R. 1990. Differential expression and enzymatic properties of the Na⁺,K⁺-ATPase α3 isoenzyme in rat pineal glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1178–1182.
169. Simons K, Ikonen E. 1997 Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 5;387(6633):569-72.
170. Skou J. C., Esmann M. 1992. The Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24:249–261.
171. Skou, J.C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 394-401
172. Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. 2009. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc.*;4(5):662-73.
173. Stechly L, Morelle W, Dessein AF, André S, Grard G, Trinel D, Dejonghe MJ, Leteurtre E, Drobecq H, Trugnan G, Gabius HJ, Huet G. 2009. Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic.*;10(4):438-50.
174. Steinberg, R.H., and Miller, S. S., 1979. Transport and Membrane Properties of the Retinal Pigment Epithelium. In: *The Retinal Pigment Epithelium*, ed. K. M. Zinn and M. F. Marmor, Cambridge, MA: Harvard University Press: 205-225
175. Sun MZ, Kim JM, Oh MC, Safae M, Kaur G, Clark AJ, Bloch O, Ivan ME, Kaur R, Oh T, Fouse SD, Phillips JJ, Berger MS, Parsa AT. 2013. Na⁺ /K⁺ -ATPase β2-subunit (AMOG) expression abrogates invasion of glioblastoma-derived brain tumor-initiating cells. *Neuro Oncol.* ;15(11):1518-31.

176. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Broude N. E., Ushkaryov Yu A., Allikmets R. L., Melkov A. M., Smirnov Yu V., Malyshev I. V., Dulobova I. E., Petrukhin K. E. 1987. The family of human Na⁺,K⁺-ATPase genes. No less than five genes and/or pseudogenes related to the α subunit. *FEBS Lett.* 217:275–278.
177. Sweadner KJ, Rael E. 2000. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics* 68: 41–56.
178. Sweadner KJ. 1989. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 9; 988(2):185-220.
179. Tai AW, Chuang JZ, Sung CH. 2001 Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport. *J Cell Biol.* 25;153(7):1499-509.
180. Takeyasu, K., y Kawakami, K., 1989. [Na⁺,K(+)- ATPase:genes, expression and membrane insertion]. *Seikagaku* 61: 394-401
181. Tamiya S, Liu L, Kaplan HJ. 2010. Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;51(5):2755-63.
182. Tokhtaeva E, Clifford RJ, Kaplan JH, Sachs G, Vagin O. 2012. Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase α - β heterodimers. *J Biol Chem.* 27;287(31):26115-25.
183. Tokhtaeva E, Sun H, Deiss-Yehiely N, Wen Y, Soni PN, Gabrielli NM, Marcus EA, Ridge KM, Sachs G, Vazquez-Levin M, Sznajder JI, Vagin O, Dada LA. 2016. The O-glycosylated ectodomain of FXYD5 impairs adhesion by disrupting cell-cell trans-dimerization of Na,K-ATPase β 1 subunits. *J Cell Sci.* 15;129(12):2394-406.
184. Tsuiji H, Takasaki S, Sakamoto M, Irimura T, Hirohashi S 2003. Aberrant O-glycosylation inhibits stable expression of dysadherin, a carcinoma-associated antigen, and facilitates cell-cell adhesion. *Glycobiology* 13: 521–527.
185. Ussing HH, Erlj D, Lassen U. 1974. Transport pathways in biological membranes. *Annu Rev Physiol.*;36:17-49.
186. Vagin O., Turdikulova S., and G. Sachs, 2004. The H⁺,K⁺-ATPase β subunit as a model to study the role of N-glycosylation in membrane trafficking and apical sorting. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 39026-39034
187. Vagin O., Turdikulova S., and G. Sachs, 2005. Recombinant addition of N-glycosylation sites to the basolateral Na⁺,K⁺-ATPase subunit results in its clustering in caveolae and apical sorting in HGT-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (52): 43159-43167

188. Vagin, O., Tokhtaeva, E., and Sachs, G., 2006. The role of the $\beta 1$ subunit of the Na,K-ATPase and its glycosylation in cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 281: 39573-39587
189. Vagin, O., Tokhtaeva, E., Yakubov, I., Shevchenko, E., and Sachs, G., 2008. Inverse correlation between the extent of N-glycan branching and intercellular adhesion in epithelia. Contribution of the Na,K-ATPase $\beta 1$ subunit. *J. Biol. Chem.* 283: 2192-2202
190. Weisz OA, Rodriguez-Boulan E. 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci.* 1;122(Pt 23):4253-66.
191. Wetzell RK, Arystarkhova E, Sweadner KJ. 1999. Cellular and subcellular specification of Na,K-ATPase alpha and beta isoforms in the postnatal development of mouse retina. *J Neurosci.* 15;19(22):9878-89.
192. Wierstra I. 2008. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;372(1):1-13
193. Wilson P.D., Devuyst O., Li X., Gatti L., Falkenstein D., Robinson S., Fambrough D., Burrow CR., 2000. Apical plasma membrane mispolarization of NaK-ATPase in polycystic kidney disease epithelia is associated with aberrant expression of the beta 2 isoform. *Am. J. Pathol.*, 156: 253-268
194. Wright, E. M., 1972. Mechanisms of ion transport across the choroid plexus. *J. Physiol.* 226: 545-571
195. 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.* 17;139(4):929-40.
196. Yu C, Xie Z, Askari A, Modyanov NN. 1997. Enzymatic properties of human Na,K-ATPase alpha1beta3 isozyme. *Arch Biochem Biophys.* 1;345(1):143-9.
197. Zahler R., Brines M., Kashgarian M., Benz E. J. Jr., Gilmore-Hebert M. 1992. The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:99-103

ANEXOS