

00581



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

REGULACION DE LA FUNCION DEL COTRANSPORTADOR DE Na⁺:K⁺:2Cl⁻

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS (B I O Q U I M I C A) P R E S E N T A :

QFB. MARIA DEL CONSUELO PLATA RAMOS

284125



MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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


PROGRAMA DE MAESTRIA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Julio del 2000

A LOS MIEMBROS DE JURADO DE EXAMEN.

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto sometido a su consideración de la alumna de doctorado, QFB María del Consuelo Plata Ramos titulado: "Regulación de la Función del Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ "

Atentamente.


Dr Gerardo Gamba Ayala
Tutor Principal.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/546/99

PAS. de M. MARÍA CONSUELO PLATA RAMOS
Alumna del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

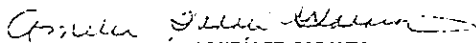
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 10 de noviembre de 1999, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la réplica de la tesis "Regulación de la función del cotransportador Na⁺:K⁺:2Cl⁻", dirigida por el Dr. Gerardo Gamba Ayala.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Herminia Pasantes
VOCAL	Dra. Ana María López Colomé
VOCAL	Dr. Francisco Javier Alvarez Leefmans
VOCAL	Dr. Fraylán Miguel Gómez Lagunas
SECRETARIO	Dr. José Pedraza Chaverri
SUPLENTE	Dr. Julio Morán Andrade
SUPLENTE	Dra. Laura Escobar Pérez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de noviembre de 1999.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*1gg





Este mundo va.

El tiempo pasa y no de largo
y hay quien no se entera que
somos los mismos envueltos en novedad.
Me dices "Cambias....", sin embargo,
tu entusiasmo sigue ahí
no me has preguntado si me da igual o no...
Oh! No.

Amor, te escribo y soy testigo de
lo que se pierde y voy
a acostumbrándome aunque me cueste...

Dame al menos tiempo y que respire
no es un arte fácil prometer
dame al menos tiempo de despedirme

Por que el mundo que va
a la velocidad del rayo
aguento el vuelo más si me agarro de tu mano
acompañame hasta donde pueda llegar
en este mundo que va
como la luz del pensamiento
el mérito está en no quedarme en el intento
y aunque no lo quiera ¿qué duda cabe ya?
que este mundo va...

Me primavera y me otoño
me estío y me invierno
me adapto con serenidad...
dame al menos dos oportunidades
Y tus ojos me verán crecer
dame al menos un par de posibilidades...

M. Bosé



El presente trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, ubicada en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del INCMNSZ, con la asesoría del Dr. Gerardo Gamba Ayala y en colaboración con el Dr. Steven C. Hebert de la Universidad de Yale y el Dr. David Mount de la Universidad de Vanderbilt.

Mi agradecimiento

A mis padres, Consuelo y Fidel, por el cariño que día a día me brindan, por comprenderme y aceptarme, por la ayuda tan incondicional que me proporcionan para realizar cada uno mis proyectos. Mil gracias

A mis hermanos; Moni, Paty y Carmelo; por su cariño y apoyo

A todos mis amigos por compartir conmigo la magia de la amistad, que todo lo hace posible. En especial a Margarita Ramos (Magito) y a Verónica Madrid (Vero) de quienes siempre he recibido una palabra de aliento y un consejo amable.

Mi agradecimiento

A mi asesor el Dr. Gerardo Gamba Ayala por sus enseñanzas, apoyo y cada una de las experiencias; tanto académicas como personales; que viví como miembro del grupo de estudiantes de la Unidad de Fisiología Molecular. Pero sobre todo, por demostrarme que la perseverancia y la paciencia son virtudes necesarias para alcanzar cada uno de nuestros objetivos.

Al Dr. Ricardo Correa, jefe del departamento de Nefrología y MM. del INCMNSZ, por el apoyo que siempre me ha brindado, especialmente para finalizar el presente trabajo.

A los miembros (presentes y pasados) de la Unidad de Fisiología Molecular del IIB y depto. de Nefrología del INCMNSZ: Yola, Elisita D, Carlos, Norma V, Adriana López, Norma B, Luis, Edmundo, Francisco, Roberto, Jorge, Anayanzin, J.P, Euclides, Elisa A, Paola, Silvia, Mary, Jesús, Josefina, Gaby, Paty, Lety y Adriana Mercado, por su apoyo y amistad.

Pero de manera muy especial a: Adriana Monroy (tocayita), Alejandra Merino (Ale) y Verena Rubio (Pupila) por su manera tan única de ser, por ser mujeres muy sinceras y de corazón noble, además de poseer una fortaleza de espíritu envidiable, con ustedes siempre aprendí algo más que ciencia.

Mi agradecimiento

A los doctores: Dra. Marina Gavilanes, Dr. Luis Vaca y Dr. Armando Tovar; que integraron mi comité tutorial; por sus comentarios y observaciones que permitieron llevar a término el presente trabajo.

A la Dra. Amelia Farres, coordinadora del programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la UNAM y a la secretaria Lety García por su apoyo y atenciones que siempre me brindaron.

A CONACyT (número de registro 90451), DGAPA UNAM y Fundación TELMEX por las becas otorgadas para la realización de estudios doctorales.

Al Programa de Apoyo para estudios de Posgrado por los apoyos económicos con los números de registro PAEP 202329 y PAEP 103341.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	iii
Introducción	1
La hormona antidiurética ó vasopresina	5
Concentración y dilución de la orina. Mecanismo contracorriente	8
Mecanismo de la ADH sobre la reabsorción de solutos y agua en el túbulo renal.	14
Fisiología del transporte de Na^+ electroneutro del asa gruesa ascendente de Henle	15
Propiedades y diversidad del cotransporte de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$.	21
Mecanismos de la regulación del cotransporte de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida apical (CSBm1).	27
Biología molecular de los cotransportadores electroneutros de Na^+	28
La familia de los cotransportadores electroneutros de cloro	30
Localización de las proteínas y transcritos de los cotransportadores electroneutros de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ (CSB)	34
Enfermedades hereditarias relacionadas a los transportadores electroneutros de $\text{Na}^+\text{(K)}^+\text{-Cl}^-$.	36
Justificación del presente trabajo	38
Hipótesis	40
Objetivos	40
Resultados y discusión	41
Aislamiento y secuenciación de clonas de DNAC	41
Detección y caracterización de transcritos del CSBm	42
Caracterización de las proteínas del CSBm	46

Inmunofluorescencias	48
Expresión funcional del CSBm1-9 (C9) en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	49
Sensibilidad del CSBm1-9 a los diuréticos	53
Efecto de la activación de la proteínacinas A (PKA) en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con C9	54
Expresión funcional de CSBm1-4 (C4) en condiciones hipotónicas (150 mOsmolar)	55
Expresión funcional de la coinyección de C4 con C9	56
Activación de CSBm1-4 en medios con tonicidades menores de 100 mOsmolar	62
Conclusiones.	73
Metodología	78
Bibliografía	103

RESUMEN

En el asa ascendente de Henle existen dos tipos de transporte de Na^+ sensible a bumetanida (CSB): de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ y de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. Ambos transportadores participan en la reabsorción del 20% de NaCl proveniente del filtrado glomerular y en el mantenimiento de la hipertonicidad de la médula renal. La función de estas proteínas se regula por la hormona antidiurética (ADH) y por cambios de tonicidad en el medio.

En el riñón de ratón hemos identificado seis isoformas del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ generadas por la combinación de dos mecanismos de empalme alternativo de exones diferentes: Uno es a partir de un cassette de tres exones (A, B y F) que codifica para 32 aminoácidos de la segunda región transmembrana y otro es por un sitio de empalme alternativo, localizado en el exon 16, que genera dos proteínas con extremos carboxi-terminales diferentes, uno largo de 457 aa y otro corto de 132 aa que denominados CSBm1-9 y CSBm1-4 respectivamente. Los últimos 55 aminoácidos de CSBm-4 son diferentes a CSBm-9. Ambas proteínas poseen diferentes sitios potenciales para la PKA y la PKC en la región carboxi y amino-terminal.

Los estudios de expresión funcional de los transportadores en ovocitos de *Xenopus laevis*, inyectados con RNA complementario de las diferentes clonas y valorados con la captación de $^{22}\text{Na}^+$ o $^{86}\text{Rb}^+$, mostraron los siguientes datos: Las tres isoformas CSBm-9 inducen captación de Na^+ sensible a bumetanida y dependiente de la concentración extracelular de K^+ y Cl^- (2705 ± 1701 CSBm-9F, 337 ± 336 Bum, 192 ± 180 sin K^+ y 183 ± 145 pmoles/ovocito/hr sin Cl^-) mientras que C4 no muestra expresión. La captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con C9 y tratados con AMPc+IBMX no se afectó. La coinyección de C9 y C4 indujo una disminución en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ (2.1 ± 0.9 vs 1.0 ± 0.6 nmoles/ovocito/hr $p < 0.01$) que se recuperó parcialmente con la administración de AMPc (1.4 ± 0.9 vs 1.0 ± 0.6). La captación de Na^+ en los ovocitos coinyectados con C9 y C4 fue dependiente de K^+ y Cl^- , y sensible a bumetanida. La coexpresión de C9 con cRNAs no relacionados a los transportadores electroneutros no disminuyó la captación de $^{22}\text{Na}^+$ (C9 : 2.1 ± 0.9 vs C9+canal de K^+ Shaker 1.9 ± 0.6 ó vs

C9+renina 1.75 ± 1.5 nmoles/ovocito/hr [$p = \text{Ns}$]), lo que demostró que el efecto negativo de C4 en los ovocitos coinyectados con C9 y C4 no se debe a una competencia por ribosomas. El efecto inhibitor de C4 fue dependiente de dosis e independiente del cassette de exones que codifica para la segunda región transmembrana. El estudio de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para C4 en ovocitos *Xenopus* inyectados con RNAc de C4 mostró que la proteína se localiza en el citoplasma en vesículas de transporte. Con estos estudios determinamos que las isoformas CSBm-9 (A, B y F) codifican para el cotransportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en condiciones de 150 mOsmolar. Sin embargo, en estas condiciones la isoforma truncada o CSBm-4 no presenta función, pero ejerce un efecto negativo en el transporte de sodio generado por la isoforma C9 que se regula por la presencia de AMPc en el medio.

La captación de $^{22}\text{Na}^+$ de los ovocitos inyectados con RNAc de las clonas tipo C4 e incubados en condiciones isotónicas (200 mOsm/kg) no aumentó en comparación con los grupos controles. En cambio, la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de los ovocitos expuestos a condiciones hipotónicas (70 a 100 mOsm/kg) incremento significativamente (3650 ± 592 pmol/ovocito/h) con respecto a los grupos inyectados con H_2O (52 ± 10 pmol/ovocito/h). Este aumento en la captación fue dependiente de la presencia de Cl^- en el medio (1297 ± 289 pmol/ovocito/h) e independiente a K^+ y sensible a furosemida (998 ± 293 pmol/ovocito/h). Este mismo fenómeno se observó en las tres isoformas tipo 4. La independencia de K^+ de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de la isoforma C4 se confirmó con la ausencia de captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en los ovocitos inyectados con RNAc de C4 (1111 ± 107 C4 vs 888 ± 199 pmol/ovocito/h H_2O). Los estudios de inmunofluorescencia realizados en ovocitos inyectados con RNAc de C4, con anticuerpos específicos para esta clona e incubados en una solución hipotónica de 80mOsmolar, mostraron que la isoformã CSBm-4 llega a la membrana, mientras que en condiciones isotónicas la proteína permanece en el citoplasma en vesículas de transporte. Con los datos anteriores concluimos que las tres isoformas del CSBm-4 (A, B y F) codifican para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a furosemida que se activa por el aumento del volumen celular y/o posiblemente por la dilución de algún componente intracelular ($[\text{Cl}^-]$) durante la hipotonicidad .

ABSTRACT

Two apical bumetanide sensitive Na^+ cotransporters (BSC1) ($\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ and $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$) exist on the thick ascending limb of Henle (TAL). Both transports participate in the 20% reabsorption of NaCl of the glomerular filtrate and they play a key role in the production and maintenance of renal medullar hypertonicity. These proteins are regulated for the vasopressine and changes in the cell volume.

We are identifying in the mouse's kidney six isoforms of BSC1 by the combination of two alternative splicing mechanisms. One is due to the presence of three mutually exclusive cassette exons (A, B and F) which code for 32 amino acid residues corresponding to the putative second transmembrane domain. The second splicing of the BCS1 is the utilization of a poly-adenylation site in the intron between coding exons 16 and 17, which predicts a protein with a significantly shorter C-terminal domain. This splicing produces two proteins that are identical at the N-terminus and the transmembrane domains, but which differ in the length and sequence of the C-terminal domain. The longer isoform exhibit a C-terminus of 457 amino acid (C9). In contrast, the shorter, truncated isoforms exhibit a C-terminus of 132 residues (C4), from which the last 56 are not present in the longer isoforms. Both proteins contain different putative protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) phosphorylation sites.

We determined the functional characteristics of mBSC1 with the functional expression technical in *Xenopus laevis* oocytes with the transport of $^{86}\text{Rb}^+$ and $^{22}\text{Na}^+$. The three CSBm1-9 isoforms (A, B and F) induce uptake $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ dependent of Cl^- , K^+ and Na^+ , however C4 isoforms are not functional in this assay system. The uptake $^{22}\text{Na}^+$ of oocytes injected with C9 RNAc not affected by AMPc-IBMX. The C9 and C4 cRNA co-injected in oocytes of *Xenopus* decreased the $^{22}\text{Na}^+$ uptake in contrast with C9 alone (2.1 ± 0.9 vs 1.0 ± 0.6 nmoles/ovocito/h $p<0.01$). The reduction in $^{22}\text{Na}^+$ uptake in C9/C4 co-injected was partially reversed by the addition of cAMP-IBMX (1.4 ± 0.9 C9/C4 cAMP-IBMX vs 1.0 ± 0.6 C9/C4). It is unlikely that the negative effect of C4 in C4/C9 co-injected oocytes is due to simple competition for ribosome, since unrelated cRNA did not decrease $^{22}\text{Na}^+$ uptake when co-expressed with C9 (C9 : 2.1 ± 0.9 vs C9+

Shaker K^+ channel 1.9 ± 0.6 vs C9+renin 1.75 ± 1.5 nmoles/oocytes/h [$p = \text{Ns}$]). The inhibitory effect of C4 was dose-dependent, and occurred irrespective of which cassette exon included in the co-injected constructs. The $^{22}\text{Na}^+$ uptake in C9/C4 coinjected oocytes was K^+ and Cl^- dependent and bumetanide sensitive. Immunofluorescence in C-4 and C9 injected oocytes we observed that C4 was localized in the membrane vesicles on cytoplasm, in contrast with C9 that it localized in the cell membrane. We propose that C-9 isoforms (A, B and F) encode for bumetanidamide-sensitive $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ cotransporter. The C4 isoforms have a dominant negative influence on transport when co-expressed with C9 isoforms, a function that is reversed by cAMP.

mBSC1-4 injected oocytes incubated in normal osmolarity (200m Osm) they do not express significant Na^+ uptake over H₂O-injected controls. However, when mBSC1-4 oocytes are exposed to hypotonicity for one hour, a significant increase in $^{22}\text{Na}^+$ uptake is observed, which is Cl^- dependent and furosemide-sensitive (mean \pm SEM in pmol/oocyte/hour): 52 ± 10 (H₂O-control); 3650 ± 592 (mBCS1-4); 1297 ± 289 (without Cl^-); and 998 ± 293 (+furosemide [100 μM]). The lower extracellular osmolarity (from 150 to 70 mOsm/Kg), the higher the mBCS1-4 expression ($r = 0.95$, $p < 0.01$). mBSC1-4 in hypotonic medium does not transport $^{86}\text{Rb}^+$ (1111 ± 107 C4 vs 888 ± 199 pmol/oocyte/h H₂O). In addition, increased $^{22}\text{Na}^+$ uptake is not K^+ dependent, but is completely blocked by the addition of cAMP+IBMX to the uptake medium. All three mBSC1-4 isoform (A, B and F) exhibit the same characteristics. Immunofluorescence with C4 specific antibody in C-4 injected oocytes and they incubated in 80 mOsm medium, we observed that the protein BSC-4 was localized in the cell membrane in contrast with the oocytes incubated in 200 mOsm medium that C4 was localized in the membrane vesicles on cytoplasm. Thus we conclude that m BSC1-4 encode a hypotonically activated, cAMP and furosemide-sensitive Na:Cl cotransporter.

INTRODUCCIÓN

El riñón tiene como papel central conservar la homeostasis del organismo al regular la composición y volumen de los líquidos corporales, por medio de la eliminación y retención de cantidades específicas de agua y de solutos ¹. Estos procesos se llevan a cabo en la nefrona, que es la unidad funcional del riñón, por medio de los mecanismos de ultrafiltración glomerular y reabsorción tubular. La filtración glomerular es un proceso pasivo generado principalmente por la presión de perfusión renal y la integridad anatómica del glomérulo; en cambio la reabsorción tubular es un proceso activo, que depende de los mecanismos de transporte de agua y solutos a través del epitelio ².

La presencia de una gran variedad de transportadores a lo largo de los túbulos renales permite que diariamente el epitelio tubular reabsorba 180 litros de agua y 1.3 Kg de cloruro de sodio, así como otras moléculas y únicamente excrete de 1-2 litros diarios de orina con pequeñas cantidades de NaCl (50-130 meq). De esta manera, se evita la pérdida de nutrientes importantes para el organismo como glucosa, aminoácidos y proteínas ^{2,3}.

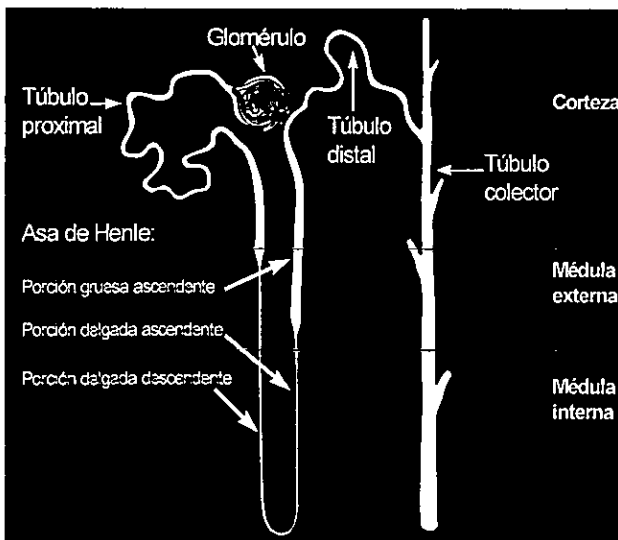


Figura 1. Partes de la nefrona

El funcionamiento y regulación de los diferentes transportes que existen en el túbulo renal son los que determinan la concentración final de los diversos solutos excretados en la orina; así como la osmolaridad, pH y volumen de la misma ¹⁻³.

La reabsorción de sodio, a lo largo de la nefrona, depende de la operación

simultanea de la bomba de Na^+/K^+ en la membrana basolateral y de diversas proteínas acarreadoras de sodio de la membrana apical ⁴⁻⁶. La localización exclusiva de la bomba de Na^+/K^+ en la membrana basolateral, genera la formación de un gradiente electroquímico, por la reducción de la concentración de Na^+ e incremento de la concentración de K^+ dentro de la célula, lo que favorece la

Tabla 1. Transporte de NaCl a lo largo de la nefrona

Segmento	% del total reabsorbido	Mecanismos de reabsorción de Na^+ y Cl^-
Túbulo proximal	60	Intercambiador de Na^+/H^+ , cotransportador de Na^+ con aminoácidos y solutos orgánicos, Paracelular.
Asa de Henle	20	Cotransporte de Na^+ y $2Cl^-$ sensible a furosemidas
Túbulo distal	~5	Cotransporte de Na^+ y Cl^- sensible a Tiazidas
Túbulo colector	15	Canal de Cl^- sensible a acetazolamida

entrada de Na^+ por la cara apical a favor de su gradiente electroquímico. El ingreso de Na^+ a la célula se lleva a cabo por medio de transportadores secundarios de Na^+ que se localizan a lo largo de la cara apical del túbulo renal ^{2,3,7}.

Transporte de agua a lo largo de la nefrona

Segmento	% del total reabsorbido	Mecanismos de reabsorción de agua
Túbulo proximal	60	Acuoporinas constitutivas
Asa de Henle	20	Acuoporinas constitutivas
Túbulo distal	0	no hay reabsorción de agua
Túbulo distal (distal) y túbulo colector	20	Acuoporinas regulativas

El túbulo renal reabsorbe a los diferentes solutos y al agua de forma heterogénea, dado a que esta compuesto por diferentes tipos de células. La organización y localización de estas células divide

al túbulo renal en varias porciones, que presentan propiedades morfológicas, bioquímicas y funcionales diferentes. Actualmente se conocen 12 tipos de células a lo largo de la nefrona; sin embargo, para términos prácticos los túbulos renales se subdividen en cuatro partes: 1) túbulo proximal; 2) asa de Henle, que a su vez se subdivide en tres secciones a) asa descendente delgada, b) asa ascendente delgada, c) asa ascendente gruesa; 3) túbulo distal y 4) túbulo colector (figura 1).

7

Una de las funciones más importantes de la nefrona es la reabsorción de NaCl y agua. El túbulo proximal reabsorbe 60% de sodio y agua, en la primera sección de esta zona se recuperan el 100% de aminoácidos y glucosa del filtrado glomerular, debido a la función de cotransportadores de compuestos orgánicos acoplados con el sodio, tales como: el transportador de Na^+ /glucosa, Na^+ /alanina, Na^+ /taurina, Na^+ /cisteína. Los transportadores de Na^+ /sulfatos, Na^+ /fosfatos, Na^+ / H^+ también se localizan en esta zona. La gran cantidad de transportes de Na^+ con solutos orgánicos, presentes en la primera sección del túbulo, genera que el voltaje transepitelial sea positivo, lo que trae como consecuencia una reabsorción preferencial por el bicarbonato de sodio en las primeras regiones del túbulo proximal, lo que aumenta la concentración luminal de Cl^- y caída de HCO_3^- . Con estas características en la segunda parte del túbulo se presentan dos tipos de transporte de NaCl, una pasiva que es la reabsorción de NaCl por la vía paracelular y otra activa en donde se involucran los intercambiadores de Na^+ / H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.¹

Por otra parte en el asa de Henle se reabsorbe 25% del NaCl del filtrado glomerular, principalmente por medio del cotransportador electroneutro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a diuréticos de asa⁵. En diversos estudios se demostró que el asa delgada ascendente de Henle es permeable al NaCl, pero los mecanismos que llevan a cabo dicho transporte no se conocen. Por la gran cantidad de la bomba de Na^+/K^+ presentes en esta zona se propone que sea un transporte activo secundario. Sin embargo, existen reportes que no detectan cambios en el voltaje transepitelial y consideran que la absorción de NaCl en el asa ascendente delgada de Henle es de forma pasiva^{6,8-12}.

La absorción de agua en el asa de Henle sólo ocurre en el asa ascendente delgada. Esta región reabsorbe 20% de agua proveniente del filtrado glomerular. La alta permeabilidad al agua existente en esta zona es facilitada por la presencia de canales de agua denominados acuaporinas tipo 1 (AQP-1)¹³.

A diferencia del asa descendente delgada, el asa ascendente gruesa así como el túbulo distal son impermeables al agua; por tal motivo al asa gruesa de Henle se le considera como la zona de dilución de la orina y es la responsable de mantener la hipertonicidad de la médula renal, por su participación en el mecanismo contracorriente (ver adelante).

En el túbulo distal y colector se reabsorbe un porcentaje menor de sodio que en el asa de Henle, 5% y 3 % respectivamente. En el túbulo distal se localiza el cotransportador electroneutro de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a diuréticos tipo tiazida (CST) y en el túbulo colector los canales de Na^+ sensibles a amilorida (ENAC). Ambos transportes modulan la reabsorción de Na^+ en estas zonas¹⁴.

Con respecto a la absorción de agua, el túbulo colector es responsable de reabsorber del 8%-17% de H_2O . La alta permeabilidad del agua en esta zona es por la presencia de la acuaporina 2 (AQP-2)^{10,15}. Este canal se presenta en la membrana apical y en pequeñas vesículas intracelulares de las células de los túbulos colectores¹⁶. El movimiento de estas vesículas a la membrana apical se regula por la vasopresina¹⁷. En presencia de la hormona, las vesículas se mueven hacia la membrana plasmática, lo que resulta en un aumento del número de AQP-2 en la membrana apical de las células epiteliales de los túbulos colectores, induciendo el incremento de la permeabilidad al agua. Por tal motivo los túbulos colectores son considerados como la zona de concentración urinaria (tabla 1)^{15,18-21}.

La modulación de la absorción y excreción de NaCl en la orina, al igual que otros procesos fisiológicos, se lleva a cabo por diversas hormonas como las prostanglandinas, hormona paratiroidea, glucagon, calcitonina, arginina-vasopresina, aldosterona y adrenalina²². En el presente trabajo tenemos un particular interés en la regulación de la absorción de NaCl por la vasopresina, por

lo que a continuación se explicarán de forma general los mecanismos de acción y regulación de esta hormona.

La hormona antidiurética (ADH) o vasopresina.

La vasopresina u hormona antidiurética (ADH) es un péptido de 9 aminoácidos. Los seis primeros forman la estructura de un anillo por los puentes disulfuros que se realizan con las cisteínas y los otros tres forman una cadena lateral (figura 2). En esta cadena se encuentra una arginina, por lo que en ocasiones a la hormona se le nombra arginina-vasopresina ^{2,3,23,24}.

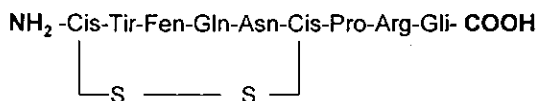


Figura 2. Estructura primaria de la vasopresina.

La biosíntesis de la vasopresina se lleva a cabo en células neuroendócrinas localizadas en los núcleos

paraventricular y supraóptico del hipotálamo. Ambos núcleos tienen prolongaciones axonales hasta la hipófisis. Una vez que la hormona es producida se transporta dentro de vesículas membranales por los axones de las neuronas hasta la hipófisis posterior, en donde se almacena hasta que se libera la hormona al sistema circulatorio bajo ciertos estímulos ^{2,3,23,24}.

La vasopresina se sintetiza a partir de un precursor hormonal o prohormona que consta de tres unidades peptídicas. Los 9 aminoácidos de la vasopresina se encuentran en la región amino terminal; seguidos de una secuencia hidrofóbica nombrada neurofisina, que es la proteína de transporte, y de un glucopéptido denominado copeptina (figura 3). La neurofisina y la copeptina se separan de la vasopresina por la acción de las proteasas cuando llegan al aparato de Golgi. La finalidad de la prohormona es transportar al péptido del citoplasma al retículo endoplásmico en donde se dobla el péptido y se dimeriza. Estos procesos son críticos para que la vasopresina sea transportada y empaquetada en el aparato de Golgi en gránulos neurosecretorios ²³.

En el momento que la vasopresina se libera de las células neurosecretoras a los capilares sanguíneos de la hipófisis, la hormona viaja por el torrente sanguíneo

hasta llegar a sus órganos blanco, entre ellos el riñón, en donde ejerce la acción de incrementar la reabsorción de agua y NaCl ^{2,3,23,24}.

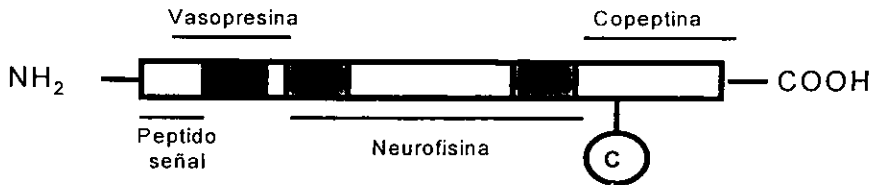


Figura 3. Estructura de la prohormona de la vasopresina

Una representación gráfica de la anatomía del hipotálamo y la neurohipófisis se observa en la figura 4, en la cual se esquematizan los dos principales factores fisiológicos reguladores de la secreción de la ADH de la hipófisis posterior: los cambios en la osmolaridad de los líquidos corporales y la presión arterial. Existen otras hormonas que pueden alterar la secreción de la ADH, como son el péptido natriurético atrial y la angiotensina II. Algunos fármacos también modifican la secreción de la ADH como es el caso de la nicotina que favorece la secreción de la hormona o del etanol que la inhibe ^{2,3}.

Los pequeños aumentos en la osmolaridad de los líquidos corporales (<1%) son censados por osmoreceptores, los cuales mandan una señal a la hipófisis posterior para liberar a la ADH. La existencia de osmoreceptores fue propuesta por primera vez en los trabajos de Verney en 1947 ²⁵ a partir de una serie de experimentos que inducían la liberación de la vasopresina. Los experimentos consistían en inyectar soluciones hipertónicas de NaCl, de glucosa, de sacarosa o de sulfato de sodio durante 10 segundos en la arteria carótida de perros. La inyección producía en los perros una rápida disminución del flujo urinario (antidiuresis). Un efecto similar se observó al inyectar homogenados de la puitaria posterior. La localización de los osmoreceptores la llevó a cabo el mismo grupo por medio de la ligación de la carótida derecha junto con la inyección de soluciones hipertónicas. En este estudio observaron que no se producía antidiuresis, por lo que sospecharon que los osmoreceptores se localizaban a lo

largo de la circulación de la arteria carótida. Poco después demostraron con experimentos de lesiones intracraneales y ligación arterial, que los osmoreceptores se localizan en el hipotálamo anterior^{24,26}.

Por otra parte, con estudios de radioinmunoensayos para medir vasopresina, Roberson y colaboradores²⁷ demostraron que en pacientes con diferentes grados de hidratación existe una relación importante entre la concentración de ADH plasmática y la osmolaridad tanto de la orina como del plasma, con excepción de aquellos pacientes que sufrían diabetes insípida. En estos estudios observaron que pequeños cambios en la osmolaridad del plasma inducen incremento o decremento de la ADH plasmática y de la osmolaridad urinaria. Por ejemplo, un individuo normal presenta una osmolaridad en plasma de 287 mOsmol/Kg H₂O, los niveles de ADH son de ~2 pg/ml y la osmolaridad urinaria es de 500 mosmoles; si el volumen total de agua corporal aumenta 1%, la concentración de ADH disminuye a 1pg/ml, la osmolaridad del plasma baja 1% (2.8 mosmoles/Kg H₂O) y la osmolaridad de la orina a 250 mosmol/Kg H₂O. En términos generales

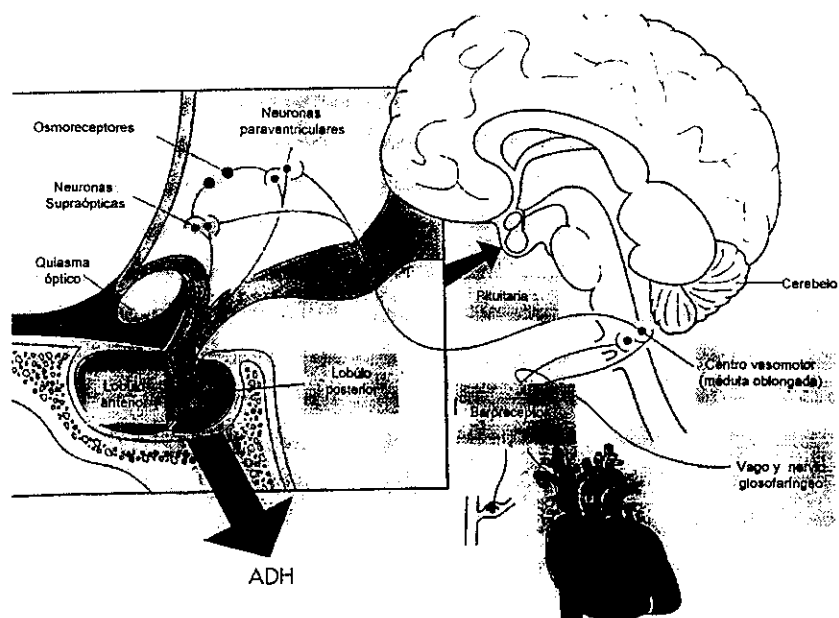


Figura 4 Anatomía de la neurohipófisis.

estos estudios determinan que el incremento de 1 mosmol/kg H₂O en el plasma aumenta 0.38 pg/ml de ADH y la osmolaridad de la orina incrementa 100 mosmoles/kg H₂O ²⁶.

Con estas observaciones se sugiere que los osmoreceptores inducen la síntesis y secreción de la ADH y la sensación de sed al censar incrementos en la osmolaridad plasmática. Una situación contraria sucede cuando disminuye la osmolaridad del plasma, porque se inhibe la secreción de la hormona; además la vasopresina se degrada rápidamente minutos después de secretarse, lo que facilita la pérdida de agua en el organismo y el incremento de la osmolaridad plasmática ^{2,26}.

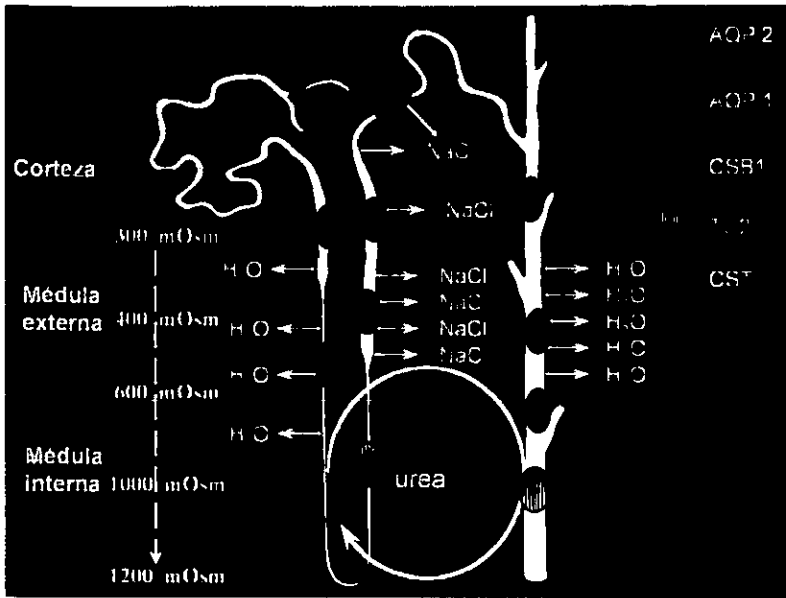
El segundo estímulo que induce la secreción de ADH es la disminución del volumen sanguíneo y la presión arterial. Los receptores que median este estímulo son conocidos como baroreceptores, y se localizan en la aurícula izquierda, vasos pulmonares, arco aórtico y seno carotídeo ^{2,3}.

La sensibilidad de los baroreceptores es menor a la de los osmoreceptores, ya que se requiere que el volumen sanguíneo o presión arterial disminuya de 5% a 10% para la secreción de vasopresina ².

En resumen, la disminución de la concentración plasmática de vasopresina induce la pérdida de agua en el organismo, con el incremento del volumen urinario excretado y la disminución de los osmolitos contenidos en ella (diuresis). Una situación contraria sucede cuando la concentración plasmática de ADH aumenta, ya que el organismo excreta menor cantidad de orina e incrementa la concentración de solutos urinarios (antidiuresis) para evitar la pérdida de agua.

Concentración y dilución de la orina. Mecanismo contracorriente.

Se propone que la presencia del asa de Henle en la nefrona de mamíferos y en algunas aves, característica morfológica que no presentan otras especies del reino animal, fue producto de la evolución de ambientes acuáticos a ambientes terrestres, debido a que, el asa de Henle juega un papel importante en los procesos de concentración y dilución urinaria, por lo tanto, en el equilibrio osmolar y volumen de líquidos corporales.



A

	ADH	AAH	TC	
Corteza	300	300	300	300
	↓ NaCl, H ₂ O	↑	↓ H ₂ O	
	500	500	500	500
	↓ NaCl, H ₂ O, NaCl	↑	↓ Intersticio medular	
	600	600	600	600
	↓ H ₂ O	↑	↓ H ₂ O	
	800	800	800	800
	↓ NaCl, H ₂ O	↑	↓ H ₂ O	
	1000	1000	1000	1000
Papila	1200	1200	1200	1200

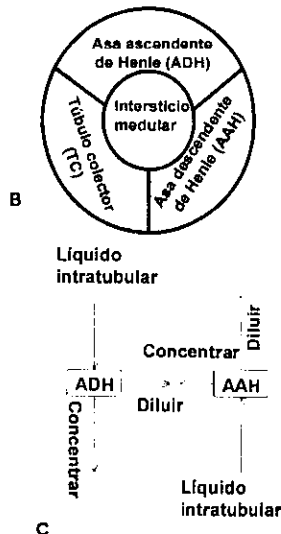


Figura 5. La figura superior muestra la localización de los diferentes transportes implicados en el mecanismo contracorriente; acuoporina 1 y 2 (AQP 1, AQP2), cotransportador electroneutro de sodio sensible a bumetanida (CSB1) cotransportador electroneutro de sodio sensible a tiazida (CST), transportador de urea (TU2). En la figura B es un modelo gráfico de cómo los tubulos participantes en el mecanismo contracorriente y reabsorción de agua comparten una zona basolateral en común, que es el intersticio medular (ver texto). La figura A y C muestran la dirección y lugares de concentración y dilución líquido intratubular e intersticio medular (ver texto).

La concentración y dilución de la orina se facilita por tres características de la nefrona : 1) la heterogeneidad que presenta el asa de Henle en la absorción y secreción de NaCl y urea; 2) la estructura de S que forma esta zona junto con los túbulos colectores (figura 5a) y 3) la interacción de los túbulos con la red de capilares, conocida como vasa recta. La organización de S entre el asa de Henle y túbulos colectores permite la formación de un centro, que es el intersticio medular (ver figura 5b).

Los diferentes mecanismos de transporte de agua y solutos interaccionan estrechamente en este centro o intersticio medular (figura 5A, 5C), de manera tal que facilita la formación de un gradiente hipertónico a lo largo de la médula renal, que va de 300 mOsmoles en corteza hasta 1200 mOsmoles en la papila renal humana. La generación del gradiente osmolar es por medio de un proceso conocido como mecanismo contracorriente. La presencia o ausencia del gradiente hipertónico medular es lo que finalmente permite la retención o eliminación de agua en el organismo ^{28,29}.

El concepto de mecanismo contracorriente lo inició Werner Kuhn en 1942 ³⁰ al reportar la presencia de un gradiente hipertónico en la médula renal. Después en 1959 Carl W. Gottschalk y Margaret Mylle ^{30,31} determinaron, con la técnica de micropunción de túbulos renales, que el asa de Henle es la zona que diluye la orina, mientras que, la región de concentración urinaria son los túbulos colectores. En las décadas de los 60's y 70's se amplió el conocimiento de este mecanismo con los trabajos de Kokko ^{32,33} y el modelo matemático de Stephenson ^{34,35} en los cuales se propuso la presencia de: 1) transporte pasivo de NaCl y urea en el asa ascendente delgada de Henle, para la generación y conservación de la hipertonicidad medular; 2) transporte activo de sal en el asa ascendente gruesa, en el túbulo contorneado distal y en los elementos corticales del sistema colector y 3) alta permeabilidad de agua en el asa descendente delgada de Henle.

En las dos últimas décadas los avances de la biología molecular permitieron identificar y aislar las proteínas implicadas en proceso de dilución y concentración de la orina, como son los transportadores de urea ^{36,37}, las acuoporinas ^{18,19,38}, los

cotransportadores electroneutros de Na:K:2Cl sensible a bumetanida ^{39,40} y de Na:Cl sensible a tiazidas ^{40,41}, los canales de cloro ⁴², la bomba de Na⁺/K⁺ ⁴¹, el sensor de calcio ⁴³ y el receptor de la vasopresina ⁴⁴.

La formación del gradiente hipertónico que presenta la médula es un proceso constante, que se modifica dependiendo de los grados de hidratación del organismo. El gradiente se pierde en los procesos que impliquen un exceso de agua en el organismo y ausencia de ADH, como sucede en la diuresis. A este fenómeno se le conoce como "lavado medular". La pérdida del gradiente osmolar durante la diuresis contrasta con el gradiente que se forma en la antidiuresis, ya que el gradiente se conserva y llega a la máxima concentración de osmolitos. Esto lo podemos visualizar con mayor claridad en la figura 6, en la que se observa la caída drástica de la osmolaridad de la orina y de la médula durante la diuresis con respecto a la antidiuresis. Es importante considerar que el mecanismo contracorriente es un proceso activo y de constante cambio, que tiene como finalidad mantener adecuadamente la cantidad de solutos y volumen de líquidos corporales. Por tratarse de un proceso dinámico necesita de elementos

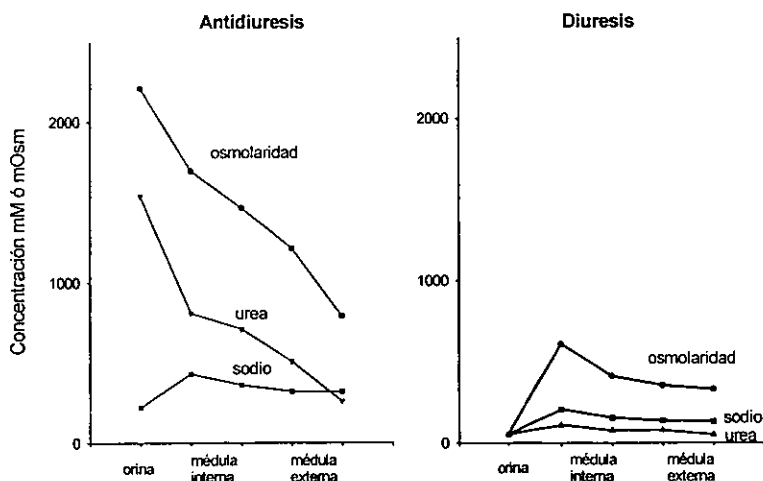


Figura 6. Osmolaridad, concentración de Na⁺ y urea en la médula renal y orina durante la diuresis (A) y antidiuresis (B).

reguladores como la hormona antidiurética.

La vasopresina juega un papel importante en el mantenimiento de la hipertonicidad de la médula renal, ya que no sólo regula el transporte de agua en los túbulos colectores, sino también el transporte de NaCl y urea en las diferentes secciones implicadas en el mecanismo contracorriente. Se ha demostrado que la presencia de vasopresina incrementa la absorción NaCl en el asa ascendente de Henle y el reciclaje de urea de los túbulos colectores y asa descendente delgada de Henle ^{20,45-49}.

La recuperación del gradiente hipertónico después del lavado medular en la diuresis se resume en cuatro pasos, que se repiten constantemente hasta formar el gradiente medular y es lo que se conoce como mecanismo contracorriente ⁵⁰.

El primer paso es la absorción de agua por medio de la AQP1 en la asa delgada de Henle, pero sin reabsorción de NaCl. En este paso el líquido del intersticio medular se diluye de forma gradual, por que recibe el agua que proviene del líquido tubular (figura 5c) ^{18,19,50-52}.

El segundo paso es la reabsorción de NaCl sin reabsorción de agua en el asa ascendente delgada y gruesa, esto permite la dilución del líquido intratubular y concentración del líquido intersticial medular (figura 5C). No se conoce exactamente el tipo de transporte que realiza absorción de Na⁺ en el asa ascendente delgada de Henle ^{8,9,11,53}. Sin embargo, Matsumura et al ⁵⁴ demostraron que ratones Knockout para el canal de cloro CLC-K1, presente en esta zona, desarrollan diabetes insípida como consecuencia de la incapacidad de formar el gradiente hiperosmolar en la médula renal, lo que sugiere que estos canales están involucrados en el manejo de NaCl en esta región y son elementos importantes en el mantenimiento de la tonicidad medular. Otra característica del asa ascendente delgada de Henle, que favorece la dilución del líquido intratubular, es la impermeabilidad al agua y secreción de urea por los transportadores de urea 2 (TU2) ^{44,55}. La urea excretada en esta región es reabsorbida en los túbulos colectores por los TU1. La combinación de ambos eventos genera un reciclaje de urea que atraviesa el intersticio medular y lo mantiene hipertónico ^{37,50-52}.

Por otra parte, en el asa gruesa ascendente de Henle no se reabsorbe agua pero sí hay una intensa reabsorción de NaCl por la presencia del contrantransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSB) ³⁹. Este transportador se activa por vasopresina ⁵⁶. Con todos estos mecanismos de transporte se diluye el líquido intratubular conforme se acerca a la corteza renal. La dilución de la orina continua ligeramente en el túbulo distal con la reabsorción de NaCl por el transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST). La osmolaridad del líquido intratubular en esta región llegar a ser menor que a la osmolaridad del plasma (150 mOsmolar) ^{38,50-52}.

El tercer paso es la conjugación de los dos anteriores. En el momento que el asa ascendente gruesa de Henle reabsorbe NaCl aumenta la osmolaridad del intersticio medular. Este incremento favorece la entrada de agua del lado del asa descendente de Henle por fuerzas osmóticas, facilitada por la presencia de la AQP1. La entrada de agua continua hasta llegar a un equilibrio osmolar en el líquido intratubular e intersticial ⁵⁰.

El cuarto paso es el movimiento del líquido intratubular en "U" a través del asa de Henle. Si vemos el fenómeno como algo dinámico, la osmolaridad del líquido intratubular va aumentando conforme pasa por el asa delgada descendente de Henle, por la salida gradual de H_2O , y se diluye conforme pasa por el asa ascendente, por la absorción de NaCl. La tendencia a un equilibrio osmolar entre las tres regiones (asa descendente, intersticio medular y asa ascendente) por la constante actividad de los diferentes transportes descritos en los pasos 1 y 2 es lo que poco a poco forma el gradiente osmolar de la médula renal (figura 7). ⁵⁰ Por último, la formación de un gradiente osmolar en la médula renal permite la absorción de agua en los túbulos colectores medulares, por medio de la actividad de la acuoporina 2 (AQP2), que es regulada por la ADH ^{16,19} (figura 5a). Por otra parte se demostró que la AQP2 es la única acuoporina renal que incrementa su función con la vasopresina y mutaciones en esta molécula son causa de la diabetes insípida ^{57 38,51,52,58}.

Nosotros estamos interesados en estudiar la función y regulación molecular del transporte de Na^+ sensible a bumetanida del asa ascendente gruesa de Henle, el cual interviene en la recuperación del 20% de Na^+ del líquido intratubular y la

generación del gradiente osmolar de la medula, por lo que en la siguiente sección se explicará la fisiología de este transporte y de forma breve, la acción molecular de la vasopresina sobre la función de los diferentes transportadores del túbulo renal.

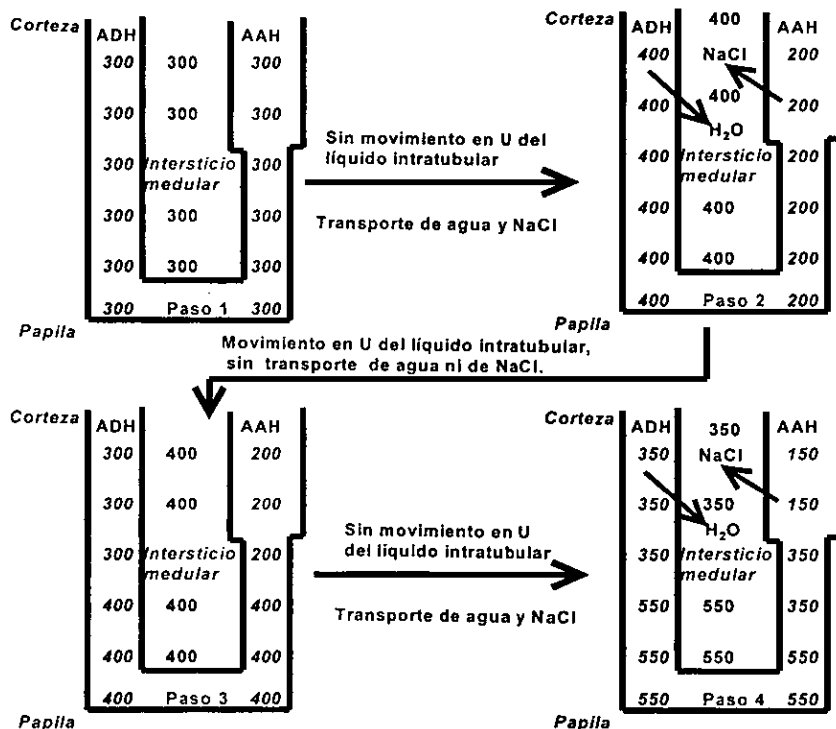


Figura 7 Pasos para la formación del gradiente osmótico en la médula renal.

Mecanismo de la ADH sobre la reabsorción de solutos y agua en el túbulo renal

El mecanismo molecular por el cual la vasopresina modula los diferentes transportes del epitelio renal es a través de la cascada de segundos mensajeros que se inicia con la interacción con su receptor V_2 (RV_2) que se localiza en los túbulos renales. Existen tres tipos de receptores para la vasopresina RV_{1a} , RV_{1b} y RV_2 . Estos receptores son proteínas de ≈ 371 aminoácidos con siete dominios transmembranales y son miembros de la familia de receptores que se acoplan a

las proteínas G. El receptor RV_{1a} se localiza en músculo esquelético, hígado, en la red vascular de la médula renal y en el cerebro; el receptor RV_{1b} se encuentra en la pituitaria posterior y el RV_2 esta presente en los túbulos colectores de la medula renal⁵⁹.

La estimulación de los receptores RV_1 induce la hidrólisis del fosfatidilinositol mediado por proteínas G, seguido de la activación de la proteínasa C (PKC) e incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} . Con esta cascada de señales de transducción se logra la contracción del músculo liso vascular⁵⁹⁻⁶¹.

La cascada de señales de transducción que activa la ADH al interactuar con el RV_2 es diferente a la del RV_1 . En esta vía se activa a la adenilciclase por medio de la vía proteínas G, lo que incrementa los niveles del AMPc intracelular. El AMPc activa a la proteínasa dependiente de AMPc (PKA) uniéndose a la fracción reguladora de la PKA, lo que induce la liberación de la fracción catalítica. Esta fracción es la responsable de fosforilar a las proteínas blanco en el riñón, con la finalidad de 1) incrementar la permeabilidad del agua principalmente en las células tardías del túbulo distal y túbulos colectores; 2) incrementar la actividad del transporte electroneutro de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$ del asa ascendente gruesa de Henle y 3) incrementar la permeabilidad de la urea en la sección de los túbulos colectores localizados de la médula interna, pero no en la sección de los túbulos colectores de la región cortical y medula externa⁵⁹⁻⁶¹.

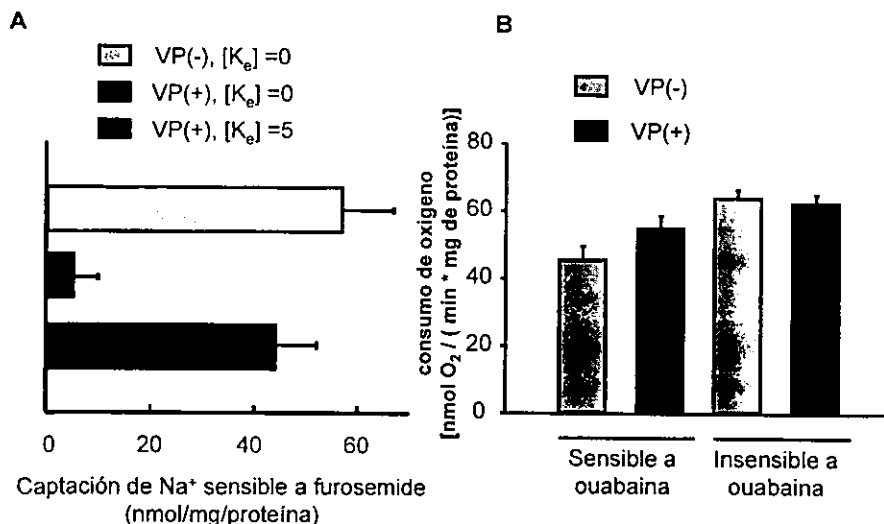
Fisiología del transporte de Na^+ electroneutro del asa gruesa ascendente de Henle

El asa ascendente gruesa de Henle atraviesa tanto corteza como médula externa. Aunque existen pocas diferencias morfológicas entre las dos secciones, si presentan diferencias funcionales^{7,62}. Entre éstas está el efecto de la ADH sobre el cotransporte de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$, ya que la vasopresina incrementa la función del cotransporte de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$ que se localiza en el asa ascendente de Henle medular, pero no del transporte que se encuentra en el asa de Henle cortical^{45,63}. Los grupos de Hebert⁵⁶ y de Evelof⁶⁴⁻⁶⁶ identificaron dos tipos de cotransportes de Na^+ sensible a furosemida en el asa ascendente gruesa de Henle de médula: el

de Na:Cl y el de Na:K:2Cl, los cuales se regulan por la presencia de la ADH y la tonicidad del medio.

Sun et al.⁵⁶ demostraron, con túbulos perfundidos del asa ascendente gruesa de Henle de riñón de ratón, que la presencia de vasopresina modifica el tipo de transporte electroneutro de Na⁺:Cl⁻ a Na⁺:K⁺:2Cl⁻, la figura 8A muestra parte de los resultados que demostraron este hecho. En la gráfica antes mencionada, se observa que en ausencia de vasopresina y K⁺ existe un transporte de Na⁺ sensible a furosemida que se pierde en presencia de vasopresina, sin embargo, el transporte de Na⁺ sensible a furosemida se recupera cuando el líquido perfundido presenta 5mM de K⁺; con estos estudios los autores propusieron que la presencia de la ADH activa el cotransporte de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ mientras que la ausencia de la hormona se encuentra activo el transporte de Na⁺:Cl⁻.

El mecanismo de activación del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ por la vasopresina es a través de la cascada de señales de transducción de la PKA. La PKA fosforila a proteínas específicas para incrementar o disminuir la actividad de los diferentes



Sun A y col. J Membrane Biol. 120, 83-94, 1991

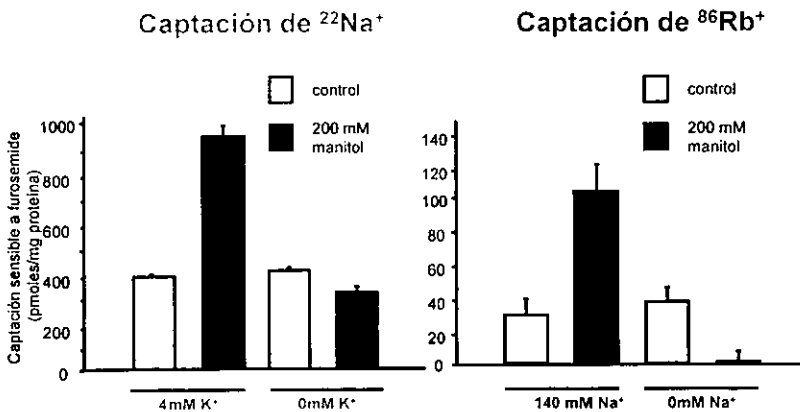
Figura 8. A) Captación de Na⁺ sensible a furosemida en túbulos del asa ascendente de Henle de ratón perfundidos con soluciones sin K⁺ y vasopresina (VP) (barra gris claro) o en presencia de vasopresina (VP⁺) sin K⁺ (barra negra) y en presencia de vasopresina con 5mM de K⁺ (barra gris oscuro).

B) Consumo de oxígeno en túbulos perfundidos en ausencia (VP⁻) (barra gris) o presencia (VP⁺) (barra negra) de vasopresina sensible o no a ouabaina (inhibidor de la bomba de Na⁺/K⁺)

transportes que regula. En el caso de los cotransportadores electroneutros de Na^+ , la vasopresina inhibe la función del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ y activa la función del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ (figura 11). Por otra parte otros trabajos demostraron que la PKA también activa al canal de K^+ sensible al ATP^{67,68} y al canal de cloro basolateral^{69,70}

Hebert y colaboradores^{45,62,71-74} observaron que la función del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida del asa ascendente gruesa de Henle disminuye 80% al bloquear la función de la bomba de Na^+/K^+ con ouabaina. Lo que demuestra que el gradiente iónico que genera la bomba de Na^+/K^+ induce la función del cotransportador electroneutro de Na^+ .

El gradiente que forma la bomba de Na^+/K^+ facilita la entrada de Na^+ y Cl^- a la célula por la cara apical, a través del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ sensible a furosemida, ambos iones salen de la célula por la bomba de Na^+/K^+ y los canales de cloro de la cara basolateral. El K^+ que entra por el cotransportador se recicla hacia la cara apical por los canales de K^+ sensibles a ATP (ROMK) (figura 11). El reciclaje de K^+ a través de estos canales es importante para el funcionamiento del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, ya que se demostró que el bloqueo de los



Evelof y Calamia Am. J. Physiol 250: F176-180, 1986

Figura 9 Captación de $^{22}\text{Na}^+$ y $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a furosemida, en células aisladas del asa ascendente de Henle, en condiciones isotónicas 200 mOsmolar (barra blanca) y condiciones hipertónicas (500 mOsmolar) (barra gris oscuro) en ausencia o presencia de 4mM de potasio, señalado con líneas en la parte inferior de las barras

canales de K^+ de la cara apical con sales de Ba^{2+} disminuye significativamente la función del cotransporte electroneutro sensible a diuréticos de asa ^{62,74}.

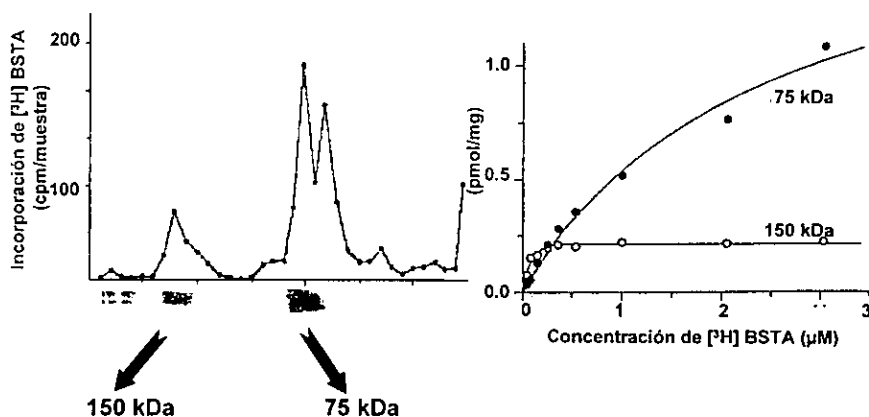
El reciclaje de K^+ indirectamente genera un gradiente eléctrico negativo en la cara basolateral de las células, debido a que el cotransportador de $Na^+:K^+:2Cl^-$ sensible a furosemida transporta 1 Na^+ y $2Cl^-$ de la cara apical a la cara basolateral de la célula, mientras que el K^+ regresa a la cara apical. El gradiente negativo que se forma por la diferencia estequiométrica entre un catión por dos aniones en la cara basolateral permite la reabsorción de un segundo catión de la cara apical como Na^+ , Ca^{2+} o Mg^+ por vía paracelular (figura 11).

El cambio de transporte de $Na^+:Cl^-$ a $Na^+:K^+:2Cl^-$ hace que las células del asa ascendente gruesa de Henle sean termodinámicamente más eficientes en el transporte de Na^+ , porque reabsorben el doble de iones ($2Na^+$ y $2Cl^-$) a diferencia del cotransporte de $Na^+:Cl^-$ que únicamente transporta un par de iones con el mismo gasto de energía que utiliza la bomba de Na^+/K^+ para formar el gradiente electroquímico (figura 11). Este modelo de eficiencia energética fue propuesto a partir de los datos anteriores y por mediciones del flujo de cloro transcelular en túbulos aislados del asa de Henle con técnicas electrofisiológicas. En estos trabajos se observó que el flujo del Cl^- transcelular se duplica en presencia de ADH ^{72, 62}. Además, el consumo de oxígeno de las células epiteliales del asa ascendente de Henle, como lo muestra la figura 8B, antes y después del tratamiento con ADH era el mismo en presencia o ausencia de vasopresina, lo que indicó que el incremento del transporte no implica aumento en el gasto energético de la célula .

Por otra parte Evelof y col ⁶⁴⁻⁶⁶ demostraron que cambios de la tonicidad en el medio extracelular también modulan el tipo de transporte de Na^+ electroneutro sensible a furosemida. En células aisladas del asa ascendente de Henle de médula valoraron el transporte de isótopos radiactivos ($^{22}Na^+$ y $^{86}Rb^+$) sensible a furosemida en presencia y ausencia de K^+ y observaron que en condiciones isotónicas (300mOsm) el transporte de $^{22}Na^+$ sensible a furosemida es independiente de K^+ , no así en condiciones hipertónicas. En condiciones de hipertonidad se observó que las células aumentan el transporte de Na^+ sensible

a furosemina en presencia de K^+ (figura 9), ésta dependencia de K^+ en el transporte de Na^+ fue confirmada con la captación de $^{86}Rb^+$ (figura 9). Así que, Evelof y colaboradores propusieron que en condiciones isotónicas (300 mOsm), el cotransporte activo es de $Na^+ : Cl^-$ mientras que en condiciones hipertónicas (500 mOsm) es de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$.

Las evidencias que demuestran la existencia de dos tipos de cotransporte de Na^+ sensible a furosemina en el asa ascendente de Henle no sólo fueron fisiológicas, si no también bioquímicas. Forbush III y su grupo propusieron la existencia de dos proteínas con afinidad a diuréticos de asa marcados con isótopos radioactivos ($[^3H]$ bumetanida) en las membranas de las células del asa gruesa de Henle (figura 10). En los ensayos con membranas microsomales de riñón de ratón CD-1 encontraron que la $[^3H]$ bumetanida se une en dos proteínas diferentes. Una proteína de 150 kD con alta afinidad a la bumetanida ($K_{1/2} = 0.052 \mu M$ y $B_{max} = 0.224$ pmol/mg proteína) y otra de 75 kD con baja afinidad al diurético ($K_{1/2} = 2.40 \mu M$, $B_{max} = 1.85$ pmol/mg proteína). Las curvas de unión de la $[^3H]$ bumetanida a las



Haas M. y col. Am J. Physiol. 260 (Cell Physiol. 29): C791-C804, 1991

Figura 10. A) Dos fracciones (75kD y 150kD) proteicas membranales del riñón de ratón presentan afinidad al ácido 4- $[^3H]$ benzoil-5-sulfamoil-3-(3-theniloxi) benzoico ($[^3H]$ BSTA). En la parte inferior de gráfica se muestran las bandas del Western blot realizado con anticuerpos policlonales contra proteínas con afinidad a bumetanida de células de ascitis de Erlich de ratón. B) Curvas de unión de un análogo de la bumetanida ($[^3H]$ BSTA) a las fracciones proteicas de 75 y 150 kD.

diferentes proteínas se muestran en la figura 10B. La banda de ~150 kD correspondía a la observada en el riñón canino; que en un trabajo previo, el mismo grupo de investigadores determinaron que se trataba del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ ⁷⁵. Para confirmar que la banda de 150 kD era el transportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ realizaron ensayos de unión de la [³H]bumetanida en presencia y ausencia de diferentes iones. En estos estudios observaron que la unión de la [³H] bumetanida unida a la banda de 150 kD era dependiente de la presencia de Na^+ , K^+ y Cl^- y sólo se logró desplazar la [³H]bumetanida con altas concentraciones de bumetanida no marcada en ensayos de competencia, lo que sugirió fuertemente que se trataba del transportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ ⁷⁶.

La unión de la [³H]bumetanida en la proteína de ~75 kD fue diferente a la de ~150 kD. La afinidad del diurético marcado no se afectó significativamente con cambios en las concentraciones de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- , y se necesitaron concentraciones mayores de bumetanida no marcada, a las empleadas con la banda de 150 kD, para desplazar a la [³H]bumetanida unida a la proteína de 75 kD⁷⁶.

Previamente Feit et al⁷⁷ aislaron dos proteínas de ~82 y ~39 kD con afinidad a bumetanida de células de ascitis de Erlich de ratón. Anticuerpos policlonales contra estas proteínas inhibieron los procesos de regulación de volumen celular y flujo de Cl^- en estas células cuando presentaban disminución en el volumen celular. El bloqueo de estos dos eventos lo atribuyeron a la disminución de la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ ⁷¹ y/o de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ ^{78,79}. Basándose en estas observaciones Forbush y colaboradores generaron anticuerpos policlonales contra estas proteínas, con la finalidad de identificar proteínas con afinidad a la bumetanida en el riñón de ratón con análisis de Western blot. En dicho análisis identificaron dos bandas una de 150 kD y otra de 75kD. En la parte inferior de la figura 10A se observan las dos bandas. Con las evidencias anteriores, los autores sugieren que la banda de 75 kD puede corresponder al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida⁷⁶.

A partir de estos datos se han propuesto dos modelos para explicar la regulación de los cotransportadores de Na^+ por la vasopresina y tonicidad del medio. Uno es

la formación de dímeros a partir de una misma proteína, es decir, que la proteína de ~75 kD fuera el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a furosemida, que ante el estímulo apropiado (hipertoncicidad, vasopresina) forman un dímero de ~150kD con la propiedad de transportar Na^+ , K^+ y Cl^- .

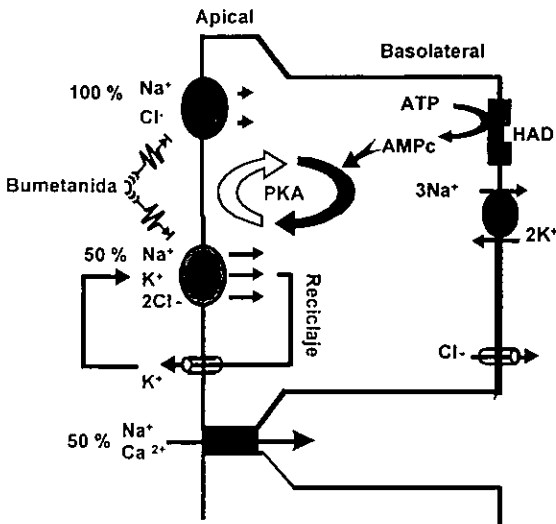


Figura 11. Fisiología molecular del asa gruesa ascendente de Henle.

Actualmente se conocen molecularmente la mayor parte de las proteínas que intervienen en el modelo de regulación del cotransporte electroneutro de Na^+ del asa ascendente gruesa de Henle (figura 11) tales como el receptor para la vasopresina⁴⁴, el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ ⁴¹, los canales apicales de potasio sensibles a ATP^{68,80}, los basolaterales de cloro^{69,70} pero el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ aún no se ha identificado molecularmente.

Propiedades y diversidad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$.

El cotransporte electroneutro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a furosemida no es exclusivo del riñón, ya que, se encuentra en diferentes tejidos de varias especies animales y es participe de una gran variedad de funciones fisiológicas vitales, entre ellas la regulación del volumen celular. Se demostró que en diferentes tipos de células el cotransportador se activa cuando la célula disminuye su volumen en el momento

El otro es que el intercambio del transporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ por el de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sea por la fosforilación y defosforilación de dos proteínas diferentes; una transportadora de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, de ~150 kDa, y la otra de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ de ~75 kDa; que es regulado por la activación de la PKA.

de aumentar la tonicidad del medio ⁸¹. Esto es porque el cotransportador es una vía importante de entrada de sal, que en conjunto con otros transportadores mantienen el volumen celular. En algunas células la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ posiblemente esté involucrada en la modulación del crecimiento y desarrollo celular ^{82, 83}.

Este cotransportador media el transporte de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- a través de la membrana. El movimiento de iones puede ser hacia adentro o hacia afuera de la célula dependiendo del potencial electroquímico que tenga la membrana. En condiciones fisiológicas el transporte de los iones ocurre del medio extracelular al citoplasma de la célula. Una característica importante de este cotransporte electroneuro es la inhibición de su función por los diuréticos de asa derivados del ácido 5-sulfamoylbenzoico tales como: (en orden creciente de potencia de inhibición) el ácido 3-amino-4-fenoxy-5-sulfamoylbenzoico, p-metoxybenzometanida, furosemida, bumetanida y benzometanida, aunque el potencial inhibitorio de estas drogas en el transporte de Na^+ varía significativamente entre los tejidos y las especies ⁸³.

La estequiometría $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ del cotransportador fue determinada por Geck ⁷¹ en células de ascitis de Ehrlich; la misma estequiometría se presenta en otras células, con excepción del cotransporte existente en el axón de calamar que presenta una estequiometría de $2\text{Na}^+:1\text{K}^+:3\text{Cl}^-$ ^{33,84}. Por otra parte la afinidad del cotransportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ por la [^3H]bumetanida es diferente en diversos tejidos, por ejemplo la $K_{1/2}$ de afinidad de [^3H]bumetanida en membranas crudas del riñón de perro fue $0.05 \mu\text{M}$, mientras que la $K_{1/2}$ en las células de ascitis de Ehrlich fue de $8.7 \mu\text{M}$ ⁸⁵. Estas fueron las primeras evidencias para proponer la existencia de varias isoformas del cotransportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. ^{86,87}.

El cotransporte electroneuro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ pertenece al grupo de transportadores activos secundarios, por lo que el transporte de los iones no depende directamente del consumo de moléculas de alta energía (ATP), sino del gradiente electroquímico que genera la bomba de Na^+/K^+ . Sin embargo; es necesario el consumo de moléculas de ATP para la fosforilación de proteínas que

modulan la función del transporte, incluyendo a los cotransportadores de sodio electroneutros ^{88,89}.

Generalmente el proceso de regulación aguda de los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ es por medio de mecanismos de fosforilación/defosforilación de proteínas. Este hecho se respalda por la presencia de varios sitios potenciales de fosforilación de serín-treonincinasas para las proteincinasas C y/o proteincinasa A en los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$, principalmente en las regiones carboxiterminales ^{39,86}. Además Lytle et al ⁹⁰ con anticuerpos específicos para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ basolateral (CSB2) de la glándula rectal de tiburón, aislaron un péptido que se fosforila durante la activación de la PKA con agonistas del AMPc o cambios en la osmolaridad, lo que sugiere que posiblemente la fosforilación directa del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ basolateral es necesaria para incrementar la actividad del transporte de Na^+ electroneutro sensible a diuréticos de asa.

Por otra parte Hass et al. ⁹¹ demostraron que la fosforilación de una proteína de ~170 kDa, identificada con anticuerpos monoclonales para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ de la línea celular T84 de intestino, se estimula por la reducción del cloro intracelular ($[\text{Cl}^-]_i$) y por la disminución del volumen celular. Estos dos eventos incrementan la actividad del cotransportador, lo que sugiere que la fosforilación regula la función del cotransportador y es dependiente de la concentración intracelular de cloro.

Existen varios factores que regulan la función del cotransportador electroneutro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ basolateral en diferentes células (tabla 2). Entre ellos se encuentran: sales mercuriales ⁹², cambio de volumen celular ⁹³, prostaglandinas E_2 ⁹⁴, factores de crecimiento epidermal ⁹⁵, factor de crecimiento nervioso, hormonas como norepinefrina ⁹⁶, calcitonina ⁹⁷, angiotensina II ⁹⁸, vasopresina ⁹⁹, péptido natriurético atrial ¹⁰⁰ y agonistas de los receptores β adrenérgicos ⁴². Todos estos factores modulan la actividad del cotransporte a través de señales de transducción citoplasmáticas, en donde diversas cinasas afectan el estado de fosforilativo del cotransportador ⁸⁸.

Aunque existen algunas excepciones, diversos estudios sugieren que la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ se activa por los mecanismos de fosforilación de la vía de la proteínacina A (PKA) ^{98,101,102} y se inhibe por la activación de vía de la proteínacina C (PKC) ^{98,102-104}. En algunos sistemas el GMPc actúa como un modulador tanto positivo como negativo del transporte dependiendo del tipo de célula ^{102,105}. Se piensa que los procesos de desfosforilación de los cotransportadores están implicados en la disminución de la actividad de la proteína, pero aún no se han identificado fosfatasas ni se ha descrito alguna vía metabólica específica en el mecanismo de regulación del transporte por defosforilación ⁸⁸.

Como se observa en la tabla 2, algunos componentes del citoesqueleto son importantes en la regulación de la actividad del cotransporte, y posiblemente sean parte de las señales de transducción que activan al cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ durante los cambios de volumen, como es el caso de miosina y F-actina. La inhibición de la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina (MLC), con inhibidores de la cinasa específicos para estas proteínas (ML-7, ML9) e inhibición de la miosina-ATPasa con butanedionemoxima (BDM), atenúa la secreción de Cl^- mediada por AMPc en células T84. Además la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida también fue bloqueada por ML-9 y BDM, lo que sugiere, que la fosforilación de las cadenas de miosina es crucial para la activación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ basolateral ¹⁰⁶. En el caso de la F-actina, se observó que su desensamblaje, usando citocalasina D, activa al transportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ de las células T84 en condiciones de hipotonidad y lo inhibe en condiciones hipertónicas. En cambio cuando se utilizó un adaptador (phalloidina) para el ensamblaje de la F-actina ⁹³ sucedió lo contrario.

El volumen celular también juega un papel importante en la actividad del cotransportador de Na^+ sensible a bumetanida. En condiciones de hipotonidad se reduce la función del transportador mientras que en condiciones de hipertonicidad se activa. Las señales de transducción que se llevan a cabo estos cambios en el transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ por la modificación del volumen celular no se conocen ^{83,88}. Sin embargo, Lytle ¹⁰⁷ propuso la existencia de una proteínacina

sensible a volumen, contrasportador-cinasa (CT-cinasa), la cual regula la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ de los glóbulos rojos de pato.

Lytle determinó que la actividad de la CT-cinasa incrementa cuando el volumen celular disminuye, mientras que la actividad decrece en el momento que el volumen celular aumenta o en la presencia de estaurosporina o N-etilmaleimida. La actividad de esta cinasa no se afectó por la norepinefrina o sales de fluoruro. Por otra parte, observó que el efecto inhibitorio de la función de CT-cinasa por la hipotonicidad se revirtió gradualmente con inhibidores de las fosfodiesterasas, como la caliculina A. Este mismo autor determinó que el incremento de volumen celular, el AMPc, la fluorodina y la caliculina A, aumentan la actividad y fosforilación en sitios comunes de serinas y treoninas del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ basolateral ¹⁰⁸.

Por otra parte, Klein et al. ¹⁰⁹ con ensayos de geles de cinasas, utilizando una proteína de fusión del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ basolateral, identificaron una proteína de 45 kDa en extractos de células endoteliales aórticas, que a su vez fosforila la región amino terminal de la proteína de fusión del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (aminoácidos 1-278), pero no la región carboxiterminal (aminoácidos 759-1212). Esta proteíncinasa se activó en hipertonicidad y con el factor de necrosis tumoral. Usando anticuerpos para la cinasa c-Jun NH_3 terminal (JNK) se determinó que la proteína de 45kDa inmunoprecipita junto con los anti-JNK, con ello determinan que la cinasa sensible a volumen que regula al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ basolateral es JNK y posiblemente sea la CT-cinasa propuesta por Lytle .

Además de las vías metabólicas de fosforilación y defosforilación de las proteínas, como mecanismo de regulación del cotransporte de Na^+ sensible a bumetanida, existen evidencias de que la concentración intracelular de cloro modula directamente la actividad del cotransportador ^{81,82,93,125-128}. Esta sensibilidad al cloro interno en el incremento de la función del cotransporte de sodio no parece ser resultado directo de las fuerzas electroquímicas. Se propone aunque es difícil de demostrar, que la modulación es por efecto cinético dado a la afinidad y

Tabla 2. Regulación del cotransportador de Na-(K)-Cl.

Estímulos	Mensajero	Efecto	Tipo de célula	Referencia
Volumen	PKC	Activación	Ehrlich	110
Volumen	?	Activación	Células endoteliales de cerebro de rata	
Volumen	?	Activación	Células PC12	95
PGE ₂	AMPC-PKA	Activación	Osteoblastos	
?	AMPC-PKA	Activación	Glándula rectal de tiburón	113
Norepinefrina	AMPC-PKA	Activación	Células parafaríngeas de palatroides	
Carbacol	AMPC-PKA	Activación	Glándula labial humana	114
?	AMPC-PKA	Activación	Glándulas salina aviar	115
?	AMPC-PKA	Activación	mensajal de rata	116
Calcitonina	AMPC-PKA	Activación	Ascendente de hienle	
Calcitonina	AMPC-PKA	Activación	NPCE fetales humanas	118,119
-	PKC	Activación	Células mensajales de rata	119
-	PKC	Inhibición	Células endoteliales bovinas	99
-	PKC	Inhibición	Osteoblastos	112
-	PKC	Inhibición	NPEC ciliar ocular	118
-	PKC	Inhibición	PEC fetal humano	120
-	PKC	Inhibición	Células T84	121
-	GMPc	Activación	mensajal de rata	111
ANP	GMPc	Inhibición	Miocitos ventriculares de conejo	122
NGF	?	Activación	Células PC12	95
Endotelina	?	Activación	Células endoteliales de cerebro de rata	111
Angiotensina	Ca	Activación	Célula mensajal de rata	116
Vasopresina	Ca	Activación	Células endoteliales bovinas	99
Bradícinina	Phoc/Ca	Activación	Células endoteliales bovinas	
Bradícinina	Phoc/Ca	Activación	Células de Ehrlich	110
-	PP2c	Activación	Células de parafaríngeas de rata	
-	RFI	Activación	Células PC12	
-	PPI	Activación	Células endoteliales de cerebro de rata	111
VIF	-	Activación	Células de tiburón de rata	
Estrés oxidativo	-	Inhibición	CEV pulmonares	123
?	F-actinas	Inhibición	CEV	

selectividad de los dos sitios de unión para el cloro demostrados por Hedge y Palfrey¹²⁹ o de la existencia de un sitio interno de unión del cloro que modifica al cotransportador por sí mismo y que juega un papel importante en el acoplamiento de iones para la regulación del transporte.

Mecanismos de regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida apical (CSB1)

La reabsorción de NaCl en el asa ascendente de Henle por el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ apical (CSB1), se regula por diversos factores que se mencionan en la tabla 3. Entre ellos se encuentran la vasopresina que induce aumento de los niveles de AMPc intracelular, el cual por la vía de la PKA incrementa la actividad del cotransportador^{56,98,130} en contraste con otros factores como a las prostaglandinas tipo 2 (PGE_2)^{131,132} y calcio extracelular en la cara basolateral^{133,134} que disminuyen la actividad del CSB1. Ambos factores activan la vía de transducción de señales de las proteínas Gi^{105,134}. Ricarddi y colaboradores identificaron y localizaron molecularmente al sensor de Ca^{2+} extracelular renal del asa ascendente de Henle^{43,135}. Estos autores propusieron que la concentración alta de calcio de la cara basolateral disminuye la función del CSB1 a través del sensor de calcio, por medio de dos vías de señales de transducción que modulan la función de CSB1. 1) la vía de la fosfolipasa-2 (PLA_2) que activa a la vía del ácido araquidónico (AA) que produce metabolitos generados por el citocromo P450-AA (20-HETE), los cuales bloquean la actividad de la bomba de Na^+/K^+ y del CSB1^{98,136,137} y 2) el bloqueo de la vía de la PKA por la inhibición de la síntesis de AMPc por la adenilciclasa, lo cual impide el incremento de la actividad de CSB1¹³⁴.

Cualquier componente implicado en la maquinaria de absorción de sodio dentro del asa de Henle es un elemento potencial para la regulación del cotransporte de sodio. Por ejemplo, dosis farmacológicas de mineralocorticoides activan el transporte de sodio del asa ascendente de Henle, por el efecto que tienen sobre la bomba de Na^+/K^+ ¹³⁸, de forma contraria el factor de necrosis tumoral (TNF) media

el transporte de sodio del asa ascendente de Henle por la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ^{102,139}.

La vasopresina como se explicó anteriormente activa directamente al cotransportador de $\text{Na}-\text{K}-2\text{Cl}$ de asa ascendente de Henle, en contraste con los metabolitos de la vía del ácido araquidónico con el citocromo P450 que inhiben al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ ^{136,137}.

Tabla 3 Control del transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en el asa ascendente de Henle

Estimulación		Inhibición			
Hormona	Especie	Referencia	Hormona	Especie	Referencia
ADH	ratón	105	PGI ₂	ratón	94,109
β -adrenérgicos	ratón	140	Factor natriurético auricular (ANF)	rata	141
Calcitonina	ratón	140	Factor de necrosis tumoral (TNF)	ratón	142
Hormona paratiroidea (PTH)	ratón	140	Calcio extracelular	rata	139
Insulina	rata	143	Adenosina	conejo	137,144
Mineralocorticoides	ratón	138	Adenosina	ratón	105
			Adenosina	conejo	144,145
				rata	146

Biología molecular de los cotransportadores electroneutros de Na^+ .

La identificación molecular de los cotransportadores electroneutros se realizó en dos especies marinas, el lenguado de invierno y el tiburón. A partir de los DNAC aislados de dichas especies se aislaron e identificaron sus homólogos de mamíferos. Gamba y colaboradores ⁴¹ utilizaron la estrategia de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus leavis* para aislar el DNAC que codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CSTf1) de la vejiga urinaria del lenguado de invierno *Pseudopleuronectes americanus* (3.7 Kb). Simultáneamente Xu J y colaboradores ⁸⁶ analizaron una librería de DNAC de la glándula rectal del tiburón *Squalus acanthias* con anticuerpos que identifican a una proteína de 195 kD que se une a la [³H]benzometanida, de la cual aislaron un DNAC de ~4.8 Kb, que codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ basolateral (NKCC1 o CSB2).

Las nomenclaturas NKCC1 (cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$) o CSB2 (cotransportador sensible a bumetanida) son utilizadas en la literatura para nombrar al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ basolateral. Para su análogo apical se emplea NKCC2 y CSB1. La razón de la existencia de dos nomenclaturas diferentes para un mismo cotransportador es porque dos grupos de investigadores ^{42, 89} de forma simultánea y con estrategias diferentes aislaron a los primeros integrantes de la familia de cotransportadores electroneutros. Para el presente trabajo nos referiremos al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ con la nomenclatura CSB. La identificación molecular de los primeros DNAc de los cotransportadores electroneutros dio pauta para la identificación y aislamiento de otros integrantes de la familia en diferentes especies animales, con metodologías basadas en la homología de secuencias. De esta manera, Gamba et al ³⁹ sintetizaron una sonda del CSTfl marcada con ³²P del DNAc para analizar una genoteca de RNAc de riñón de rata, de la cual aislaron dos clonas (DNAc) una de ~4.4.Kb que codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas de la corteza renal de rata (CSTr) y otra de ~4.7Kb que codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida de la membrana apical de rata (CSBr1).

El CSB2 de mamíferos lo aisló Delpire y colaboradores ⁸⁷ a partir de una línea celular de túbulos colectores de médula interna del ratón (IMCD), con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores (*primers*) degenerados a partir de las regiones de alta homología entre las clonas de CSTfl, CSBr y CSTr. Por otra parte Payne y colaboradores ¹⁴⁷ a partir de sondas del CSB2 de la glándula rectal de tiburón, aislaron e identificaron a su homóloga apical de riñón de conejo (CSB1) e identificaron tres isoformas del CSB1 (CSB1-A, CSB1-B y CSB1-F). Las tres isoformas se generan a partir de empalme alternativo de exones de un cassette de tres exones mutuamente excluyente, cada exón contienen 96 pb diferentes que codifican para 32 aminoácidos de la segunda región transmembrana ¹⁴⁷. Poco después Igarashi empleó estos DNAc para clonar los análogos de riñón de ratón ¹⁴⁸.

La identificación molecular de los cotransportadores electroneutros de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ (KCC) la iniciaron Gillen y colaboradores ¹⁴⁹ por medio de análisis de la base de

datos del *Gene Bank* del proyecto genoma humano. Estos autores compararon secuencias (*expressed sequense tag* (ESTs)) de humano, rata y conejo con las secuencias clonadas de los cotransportadores electroneutros, y encontraron una serie de EST con homología del $\approx 20\%$ a los cotransportadores. Con estas secuencias elaboraron sondas para analizar genotecas de DNAC de riñón de rata y cerebro de conejo ¹⁵⁰. Por la baja homología que existía entre los ETS y los cotransportadores electroneutros, se consideró que se trataba de un nuevo integrante de la familia de cotransportadores. Así, lograron aislar un DNAC de ~ 3.8 Kb que codificó para el cotransportador electroneutro de $K^+ : Cl^-$ de rata (KCCr) y conejo (KCCrb) y otro de ~ 5.6 Kb, el cual denominaron KCC2, con localización exclusiva en cerebro. La familia ha crecido con la reciente clonación KCC3 y KCC4 de ratón y humano por Mount et al ¹⁵¹, quienes con la metodología computacional de análisis de ESTs y la técnica de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* lograron aislar dos DNAC que codifican para proteínas de 1083 y 1150 aminoácidos, que correspondían KCC3 y KCC4 respectivamente. Por la baja identidad ($\sim 20\%$) que presentan los KCC con respecto a los otros integrantes de la familia, dividimos a la familia en dos subfamilias, la transportadora $K^+ : Cl^-$ y la transportadora $Na^+ : (K^+) : Cl^-$.

La familia de cotransportadores electroneutros de cloro

Actualmente se conocen 7 genes de la familia de los cotransportadores electroneutros (CST, CSB2, CSB1, KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4) localizados en diferentes cromosomas (ver tabla 4). Entre ellos guardan un grado importante de identidad en la secuencia de aminoácidos y en la topología. Las diferencias que presentan cada uno de los grupos son el número y tipo de iones que transportan, su localización en la membrana (cara apical o basolateral), así como la sensibilidad a los diuréticos ^{88,89,152} (figura 12 y tabla 4).

Como observamos en la tabla 4, se han predicho pesos moleculares entre 110-150 kDa para los integrantes de la familia. Todos los transportadores presentan sitios potenciales de N-glicosilación y altos pesos moleculares en los análisis de

Western blots, realizados con anticuerpos específicos para cada cotransportador, lo que sugieren que todos los transportadores sean proteínas glicosiladas ^{88,89,152}.

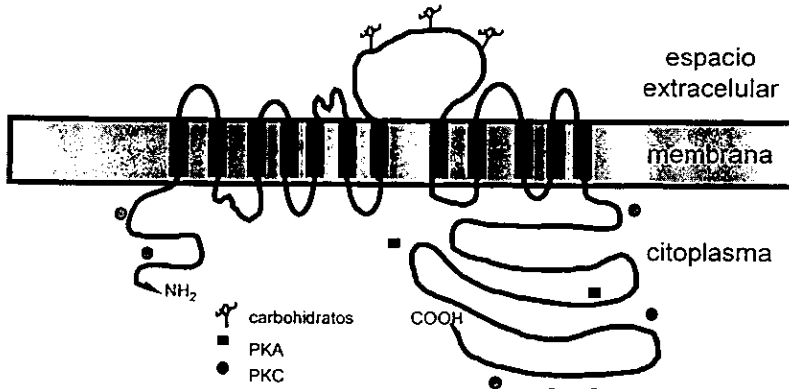


Figura 12. Topología de los cotransportadores electroneutros de cloro, sodio y/o potasio sensibles a diuréticos

La estructura primaria y secundaria de los cotransportadores se dedujo a partir del análisis de la secuencia de bases del DNAC y del análisis de hidrofobicidad, con los cuales se determinó que la topología de los cotransportadores se basa en doce regiones transmembranales, flanqueadas por dos regiones hidrofílicas amino y carboxi terminal, ambas de posible localización intracelular (figura 12) ^{88,89,152}.

La identidad entre las secuencias de la subfamilia de Na⁺:(K⁺):Cl⁻ es de 45-50%, que se presenta principalmente en las regiones transmembranales y carboxiterminal ^{88,89,152}.

La figura 13 muestra un árbol filogénico entre los diferentes integrantes de la familia de los cotransportadores electroneutros de cloro y en la tabla 4 se muestra la información de la descripción básica de estos grupos y los nombres originales para sus DNAC y proteínas.

Es interesante notar que entre las secuencias de los diferentes integrantes de cada grupo de cotransportadores el porcentaje de identidad es elevado, a pesar de provenir de diferentes especies de animales. Por ejemplo, entre el cotransportador de Na⁺:Cl⁻ sensible a tiazidas de la vejiga urinaria de teleosteo y del riñón de humano existe 62% de identidad en la secuencia de aminoácidos;

Tabla 4. Clasificación de los genes que codifican a los diferentes cotransportadores electroneutros sensibles a diuréticos

Función primaria	Sensibilidad a diuréticos	Nombre original	Tipo de donde fue aislado	Número de aminoácidos (peso molecular)	Localización (órgano)	Ref.
Cotransportador de Na:Cl apical	Tiazida	CSTfl	Vejiga urinaria de langosta de invierno	1023 112 kDa	16	41
		CSTr	Riñón de rata, humano, ratón	1002 110 kDa		39
Cotransportador de Na:K:2Cl apical	Diuréticos de asa (furosemida, bumetanida)	CSB1 NKCC2 (isoformas A/B/C/F)	Riñón de rata Riñón de humano, ratón	1095 120 kDa 1099 120 kDa		
		CSB2	Células IMCD3 de ratón	1205 130 kDa		87
Cotransportador de Na:K:2Cl basolateral	Diuréticos de asa (furosemida, bumetanida)	NKCC1	Glándula rectal de tiburón	1192 130 kDa	15	86
Cotransportador de K:Cl basolateral	Furosemida	KCC1	Riñón de conejo humano, rata	1085 120 kDa		
Cotransportador de K:Cl basolateral	Furosemida	KCC2	Cerebro de rata	1116 124 kDa	20	150
Cotransportador de K:Cl basolateral	Furosemida	KCC4	Riñón de ratón y humano	1083 115kDa	5	151
Cotransportador de K:Cl basolateral	Furosemida	KCC3	Músculo de Humano, ratón	1150		151
		KCC3	Células epiteliales de venas umbilicales humanas	1099 120 kDa	15	153

entre el cotransportador de $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : \text{Cl}^-$ apical del riñón de rata, ratón y conejo se presenta 90% de identidad ^{88,89,152}. La identidad que guardan entre sí los tres KCC1 clonados (humano, rata y conejo) es de 97%.¹⁵¹

A pesar de que los diversos grupos, pertenecientes a la misma subfamilia, provienen de genes diferentes, la identidad de secuencias entre ellos es alta, incluso con algunas secuencias de organismos inferiores. Sin embargo la identidad que presentan las dos subfamilias de los cotransportadores electroneutros de cloro es de 20%. Por ejemplo la identidad que existe entre CST vs CSB2 es de 46-52%; CST vs CSB1 es de 47-50%; CSB2 vs CSB1 es de 59-61%; KCC1 vs KCC2 es de 67%. CSBr presenta 37%, 17%, y 16% de identidad con secuencias de *Manduca sexta* (insecto), *Caenorhabditis elegans* (nemátodo) y *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), respectivamente. Por esta propiedad, se propone que los cotransportadores electroneutros de los vertebrados, provienen de un gen ancestral expresado en eucariontes primitivos y que son proteínas esenciales para la vida ^{88,89,152}

Es interesante resaltar que entre los miembros de la familia de los cotransportadores existen moléculas que aparentemente son muy similares en

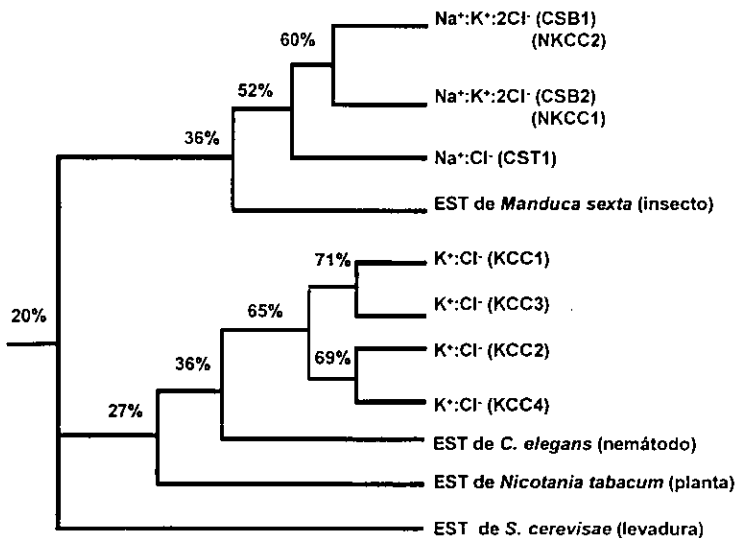


Figura 13. Árbol filogenético de los cotransportadores de cloro, sodio y/o potasio electroneutros sensibles a diurético

estructura y estequiometría en el transporte iónico. Sin embargo guardan características propias en función y localización tisular, como es el caso los CSB basolateral y apical que son codificados por genes diferentes y se localizan en cromosomas diferentes (5 y 15 respectivamente)⁸⁷. Lo mismo sucede con KCC1 y KCC2 que se localizan en los cromosomas 16 y 20 respectivamente, además KCC1 se localiza en varios tejidos mientras que KCC2 es exclusivo de cerebro^{149,154}. Por otra parte la diversidad de los cotransportadores aumenta por los procesos de empalme alternativo genes, como es el caso del CSB1 demostrado por Payne¹⁴⁷ al reportar variaciones en los procesos de empalme alternativo de exones del CSB1 del riñón de conejo. La identidad que guardan las tres isoformas de CSB1 (NKCC2A, NKCC2B y NKCCF) es de 96%.

Localización de las proteínas y transcritos de los cotransportadores electroneutros de Na-(K)-Cl (CSB).

Xu et al⁸⁶ buscaron la presencia del CSB2 aislado de la glándula rectal de tiburón en otros tejido, con análisis de Northern blot. Este grupo encontró un transcrito de 7.4 Kb en cerebro, intestino, riñón, hígado, testículos y branquias, y en el riñón un pequeño transcrito de ~5.2 Kb. La ubicuidad del CSB2 también la demostró Delpire et al⁸⁷ con análisis de Northern blot con sondas realizadas a partir del CSBm2 clonado de una línea celular del túbulo colector de médula interna del ratón (mIMCD-3). En este análisis al igual que el realizado por Xu, se observaron transcritos en diferentes órganos como son en riñón, glándula salival, estómago, colon, corazón, pulmón, testículos, cerebro y músculo esquelético, así como en diversas líneas celulares en donde previamente se conocía la expresión del CSB2 (MEL, T84 y MDCK).

La ubicuidad de CSB2 contrasta con la localización tejido específico de CSB1, presente exclusivamente en el riñón^{39,86}. Con la técnica de hibridación *in situ*. Gamba y colaboradores³⁹ observaron que los transcritos del CSB1 se expresan en medula externa y corteza a lo largo de rayos cortico-medulares, lo que hace consistente el modelo de expresión de este cotransportador en el asa ascendente gruesa de Henle medular y cortical. La localización apical del CSB1 la

confirmó Kaplan y colaboradores ¹⁵⁵ empleando anticuerpos en contra de la proteína del CSBr1 en análisis inmunohistoquímicos. En estos estudios observaron que CSB1 se encuentra en la cara apical de las células epiteliales de los túbulos ascendentes gruesos medulares (AAHM) y corticales (AAHC). El mismo grupo observó en análisis de Western blot una banda de aproximadamente de 150 kD; este tamaño es concordante con la banda encontrada en los experimentos de unión por fotoafinidad de proteínas al [³H] BSTBA en el riñón de perro y de ratón.

Por otra parte Igarashi et al ¹⁴⁸ demostró que las tres isoformas del CSB1 se distribuyen de manera diferencial a lo largo de la médula, con análisis de Northern blot e hibridización in vitro en cortes de tejido renal con sondas específicas para cada isoforma del CSB1 (A, B y F). En estos estudios la isoforma CSB-F se localizó en medula externa, la isoforma CSB-B únicamente en corteza y la isoforma CSB-A se encontró tanto en corteza como en medula. Estas observaciones concuerdan con los estudios de Yang et al ¹⁵⁶ con la técnica de PCR en nefrona única. Estos investigadores demostraron que las isoformas F, A, B se distribuyen en forma diferencial a lo largo del asa ascendente de Henle. La isoforma B se localiza exclusivamente en el asa ascendente gruesa de Henle cortical y segmentos del asa contenidos en la mácula densa, la isoforma F se localiza en el asa ascendente gruesa de Henle medular y la isoforma A se encuentra en las tres secciones antes mencionadas.

Los estudios de localización junto con los ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*, sugieren fuertemente que el cotransportador de sodio localizado en la región apical es el cotransportador de Na⁺:K⁺:Cl⁻ y es el que se encarga de absorber el NaCl del asa ascendente gruesa de Henle ³⁹. A diferencia de la isoforma análoga de membrana basolateral (CSBm2), ya que participa en la secreción de fluidos y/o de sal, en células no polarizadas como las musculares o glóbulos rojos. Así que la isoforma basolateral tiene un papel importante en la regulación del volumen celular. Por otra parte Kaplan y colaboradores ¹⁵⁷ con anticuerpos en contra del CSBm2, localizaron la proteína en el riñón de ratón, empleando análisis de inmunofluorescencia y en análisis de Western blot en tejidos

renales. En este último estudio localizaron dos bandas una de ~140 Kd y otra de ~150, las cuales fueron más abundantes en la papila renal que en corteza y médula externa. Con el análisis de inmunolocalización confirmaron la expresión de la proteína del CSBm2 en la cara basolateral del epitelio del túbulo colector de medula interna así como en epitelio papilar, en la arteriola aferente y posiblemente en estructuras representativas del mesangeo glomerular; todo esto sugiere que el CSB2 tiene un papel importante en la secreción de sal y ácidos; además es posible que sea parte de los mecanismos de señalización entre la mácula densa y la arteriola aferente y a la larga sea parte en los procesos de regulación de la presión arterial.

Enfermedades hereditarias relacionadas a los transportadores electroneutros de Na-(K)-Cl

Simon D y colaboradores ^{158,159} demostraron que mutaciones en los genes de CSB1 y CST humanos son causa de dos enfermedades hereditarias recesivas de alcalosis hipocalémica, conocidas como síndrome de Bartter y síndrome de Gitelman, respectivamente ¹⁵⁹

El síndrome de Bartter fue descrito por Bartter en 1962 ¹⁶⁰, con pacientes que presentaban las siguientes características clínicas: depresión de volumen, retraso mental, retraso de crecimiento, hipotensión, debilidad muscular, apoplejía y parestesia (ardor, hormigueo), actividad elevada de la renina plasmática e hiperaldosteronismo, alteración del metabolismo de las prostaglandinas E2, aumento de la concentración en plasma del factor natriurético auricular, anomalía en la función plaquetaria e insensibilidad a los efectos vasoconstrictores de la angiotensina II y norepinefrina. Pero hay diferencias entre los casos observados, una de ellas es la hipocalciuria e hipomagnesemia en un grupo de pacientes y la hipercalciuria o normocalciuria con niveles normales de magnesio en otro grupo ^{160,161}

La enfermedad puede presentarse en periodos neonatales, con una marcada depresión de volumen intravascular atribuido al gasto de sal. Otras pueden desarrollar apoplejías, tétanos, debilidad muscular o parestesia atribuida a la

hipocalcemia metabólica. Algunos pacientes pueden presentar dolores en las articulaciones con condrocalcinosis (acumulación de sales de calcio en las articulaciones) y en otros casos llegan a presentar nefrocalcinosis (piedras renales) ^{160,161}

La variedad en las características fisiológicas de la enfermedad, generó una clasificación basada en la cantidad de calcio en la orina y se divide en dos grupos. Los pacientes que presenten hipocalciuria son referidos con el síndrome de Gitelman y con hipercalciuria como síndrome de Bartter. Ambos síndromes se presentan en diferentes edades, el síndrome de Bartter se presenta antes de los 5 años a diferencia del síndrome de Gitelman que aparece en la vida adulta ^{160,161}.

Por otra parte Simons y colaboradores ^{162,163} demostraron que el síndrome de Bartter es una enfermedad hereditaria heterogénea, es decir, más de un gen es causante de la enfermedad. En el grupo de familias con síndrome de Bartter que estudió este grupo de investigadores, no sólo encontraron mutaciones en el gen del CSB1 sino también en los canales de cloro basolateral (CLCNKB), y canales de K⁺ (ROMK), lo que resalta el papel fundamental del reciclaje de K⁺ en la cara apical de las células epiteliales y la secreción de cloro por la cara basolateral para la adecuada función del asa ascendente de Henle.

Sin embargo, aún existen pacientes afectados con el síndrome de Bartter que no mostraron alteraciones en alguno de estos genes, lo que sugiere que existen otros genes que están implicados en la fisiopatología de la enfermedad ¹⁶¹. Otros transportadores candidatos a ser responsables de esta enfermedad pueden ser el KCC4 y el cotransportador de Na⁺:Cl⁻ sensible a furosemida del asa de Henle; este último no se ha identificado molecularmente.

Recientemente Takahashi N et al. ¹⁶⁴ crearon un modelo de estudio el síndrome de Bartter, al crear ratones knockout para el gen de CSB1. Los ratones CSB1^{-/-} presentaron características clínicas semejante a los del síndrome de Bartter, como son la severa poliuria y alteraciones en la concentración de electrolitos, insuficiencia renal, depleción del volumen extracelular, deshidratación, concentración elevada de renina plasmática y retraso en el crecimiento. Los ratones mueren a la segunda semana de nacidos; en este estudio intentaron

rescatar a los ratones $CSB^{-/-}$ tratándolos con indometacina (inhibidor de la síntesis de las PGE_2), que es un tratamiento empleado en humanos que padecen esta enfermedad. Con el tratamiento logran que los animales sobrevivan 10 meses, pero con severas alteraciones renales (hidronefrosis).

JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Los estudios de Evelof et al ⁶⁶ y Sun et al ⁵⁶ demostraron la existencia de dos tipos de transporte electroneutro de Na^+ sensible a furosemida en el asa gruesa ascendente de Henle: el de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$ y el de $Na^+ : Cl^-$, los cuales se regulan por cambios en la tonicidad del medio extracelular y presencia de la vasopresina. Estos estudios sugerían que los diferentes transportes son producidos por dos proteínas diferentes o por un único transportador que sufre cambios estructurales, de forma tal, que cambia la estequiometría del transporte ante las modificaciones de la osmolaridad del medio o en presencia de la vasopresina.

Las primeras evidencias de que los diferentes transportes eran dos proteínas diferentes se reportan en los trabajos de Haas et al ⁷⁶, al identificar dos proteínas (75kD y 150 kD) que se unen a derivados de la bumetanida. Este grupo proponen que la proteína de 150 kD es el transportador de $Na : K : 2Cl$ y la de 75 kD el cotransportador de $Na^+ : Cl^-$ (ver sección de fisiología del transporte de Na^+ en el asa de Henle, paginan 15-21).

Por otra parte Gamba et al ⁴¹, con análisis de Northern blot realizados con una sonda marcada con ³²P de un integrante de la familia de los cotransportadores electroneutros de Na^+ sensible a diuréticos tipo tiazida (CSTfl), demostraron la existencia de dos transcritos en la fracción de RNAm de la médula externa en el riñón de ratón, con pesos moleculares de ~4.6 y ~3.3 Kb (C-9 y C-4, ver figura 14).

Los estudios anteriores, junto con la presencia de los dos transcritos (C9 y C4), sugerían fuertemente que los transportes de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$ y $Na^+ : Cl^-$ sensibles a bumetanida son dos proteínas transportadoras independientes. Posiblemente el transcrito de 4.6 Kb, por analogía a los transportadores clonados previamente de riñón de rata y conejo, codifique para el cotransportador de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$ de ratón,

rescatar a los ratones CSB^{-/-} tratándolos con indometacina (inhibidor de la síntesis de las PGE₂), que es un tratamiento empleado en humanos que padecen esta enfermedad. Con el tratamiento logran que los animales sobrevivan 10 meses, pero con severas alteraciones renales (hidronefrosis).

JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Los estudios de Evelof et al ⁶⁶ y Sun et al ⁵⁶ demostraron la existencia de dos tipos de transporte electroneutro de Na⁺ sensible a furosemida en el asa gruesa ascendente de Henle: el de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ y el de Na⁺:Cl⁻, los cuales se regulan por cambios en la tonicidad del medio extracelular y presencia de la vasopresina. Estos estudios sugerían que los diferentes transportes son producidos por dos proteínas diferentes o por un único transportador que sufre cambios estructurales, de forma tal, que cambia la estequiometría del transporte ante las modificaciones de la osmolaridad del medio o en presencia de la vasopresina.

Las primeras evidencias de que los diferentes transportes eran dos proteínas diferentes se reportan en los trabajos de Haas et al ⁷⁶, al identificar dos proteínas (75kD y 150 kD) que se unen a derivados de la bumetanida. Este grupo proponen que la proteína de 150 kD es el transportador de Na:K:2Cl y la de 75 kD el cotransportador de Na⁺:Cl⁻ (ver sección de fisiología del transporte de Na⁺ en el asa de Henle, paginan 15-21).

Por otra parte Gamba et al ⁴¹, con análisis de Northern blot realizados con una sonda marcada con ³²P de un integrante de la familia de los cotransportadores electroneutros de Na⁺ sensible a diuréticos tipo tiazida (CSTf), demostraron la existencia de dos transcritos en la fracción de RNAm de la médula externa en el riñón de ratón, con pesos moleculares de ~4.6 y ~3.3 Kb (C-9 y C-4, ver figura 14).

Los estudios anteriores, junto con la presencia de los dos transcritos (C9 y C4), sugerían fuertemente que los transportes de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ y Na⁺:Cl⁻ sensibles a bumetanida son dos proteínas transportadoras independientes. Posiblemente el transcrito de 4.6 Kb, por analogía a los transportadores clonados previamente de riñón de rata y conejo, codifique para el cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ de ratón,

mientras que, el transcrito de 3.3 Kb codifique para un nuevo integrante de la familia de los cotransportadores electroneutros, el transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida. Para comprobar esta hipótesis se aislaron los DNAs de C9 y C4 con la estrategia de homología de secuencias y se realizó la caracterización funcional de ambas clonas con la metodología de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*.

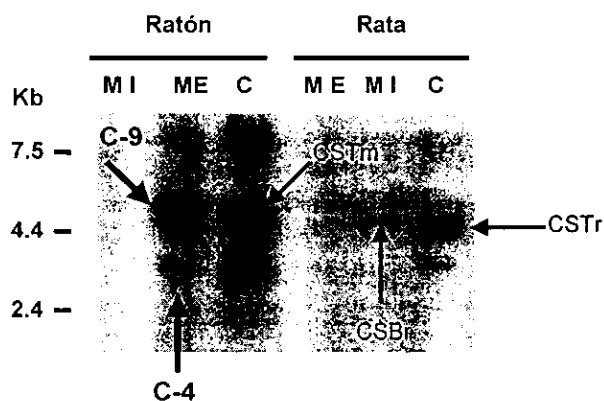


Figura 14. Northern blot de RNAm de riñón de rata ratón. MI médula interna, ME= médula externa, C= corteza

HIPÓTESIS

En el asa ascendente de Henle del riñón de ratón existen dos isoformas del cotransportador de sodio sensible a diuréticos de asa (CSB). El transcrito de 3.3 Kb (C4), que se observó en el análisis de Northern blot con la sonda del CSTfl, probablemente codifique para el cotransportador de Na^+Cl^- y el transcrito de 4.6 Kb (C9) corresponda al transportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos de regulación de la actividad funcional de dos isoformas de gen de cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida del ratón (CSBm).

Objetivos Particulares

- Aislar e identificar molecularmente a los transcritos de 4.6 y 3.3 Kb que reconoce la sonda del CSTfl.
- Determinar las características funcionales de las isoformas CSBm1-4 y CSBm1-9.
- Caracterizar el efecto regulador y propiedades funcionales de la interacción entre las isoformas CSBm1-4/ CSBm1-9

HIPÓTESIS

En el asa ascendente de Henle del riñón de ratón existen dos isoformas del cotransportador de sodio sensible a diuréticos de asa (CSB). El transcrito de 3.3 Kb (C4), que se observó en el análisis de Northern blot con la sonda del CSTfl, probablemente codifique para el cotransportador de Na^+Cl^- y el transcrito de 4.6 Kb (C9) corresponda al transportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos de regulación de la actividad funcional de dos isoformas de gen de cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida del ratón (CSBm).

Objetivos Particulares

- Aislar e identificar molecularmente a los transcritos de 4.6 y 3.3 Kb que reconoce la sonda del CSTfl.
- Determinar las características funcionales de las isoformas CSBm1-4 y CSBm1-9.
- Caracterizar el efecto regulador y propiedades funcionales de la interacción entre las isoformas CSBm1-4/ CSBm1-9

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Aislamiento y secuenciación de las clonas de DNAc.

A partir de una genoteca de DNAc de riñón de ratón (CD1) se identificaron dos clonas del gen del CSB1, que se denominaron clona 4 (C4) y clona 9 (C9). Estas clonas fueron identificadas después de analizar la genoteca con una sonda marcada con ^{32}P de la región BamH1-BamH-1 (del nucleótido 1194 al 2543) del CSTfl. Las dos clonas se secuenciaron completamente en ambas direcciones con un kit de la Secuenasa (US Biochemical) y secuenciador automático (Applied Biosystems model 373A) (ver metodología apartado 1). De la secuenciación se determinó que C4 esta compuesta por 2968 nucleótidos y C9 de 4616 nucleótidos. Las regiones 5' no transcritas de los dos DNAc son idénticas, aunque C4 se extiende 22 bases más adelante de la región 5' de C9. El codón de iniciación ATG en C4 se localiza en el nucleótido 202 y en C9 se localiza en el nucleótido 180. Ambas clonas contienen un marco único de lectura abierta. En el caso de C4 es de 2310 nucleótidos (770 aminoácidos) mientras que C9 tiene 3285 nucleótidos (1095 aminoácidos). Los primeros 209 codones de ambas clonas codifican para aminoácidos idénticos, con excepción del codón 11 que codifica una histidina en C9 y una prolina en C4. Los últimos 165 nucleótidos de la zona codificante de C4 son diferentes a los de C9. La región 3' no transcrita (UTR) de C4 y C9 son de 445 y 1130 bases respectivamente, ambas contienen la señal de poliadenilación en el extremo 5'.

La estructura primaria y secundaria de las proteínas que codifican las clonas C4 y C9 se determinó a partir de la lectura y análisis del DNAc con el *software* GENWORKS. Ambas proteínas conservan la topología de los miembros de la familia de cotransportadores de catión-cloro. Tanto C9 como C4 presentan un dominio central de 250 aminoácidos con 12 dominios hidrofóbicos potenciales para las regiones transmembranales, flanqueados por los dominios hidrofílicos carboxi y amino terminal. C9 y C4 son idénticos en los primeros aminoácidos pero no en el extremo carboxiterminal. El extremo carboxiterminal de C9 presentó una longitud de 457 aminoácidos en contraste con C4 que fue de 132 aminoácidos, es

A

1 MSVSIPSNSV PSSASRFQVH VINEGHGSAA AVGDSADPPH YEETSFGDEA QNRLRI FRP
 61 GNQECYDNFL QTGE AKTDT TFHAYDSHTN TYYLQTFGHN TMDAVPKIEY YRNTGSVSGP
 121 KVNRPSSLEI HEQLAKNVTV APGSADRVAN GDGMPGDEQA ENKEEDMTGV VKFGVWKGVL
 181 TM1 VRCMLNIWGV MLFIRLSWIV GEAGIGTM2LGVL IILLSTMVTS ITGLSTSAIA TM4TNGFVRGGGA
 241 TM3YYLISRSLGP EFGGSIGLIF AFANAVAVAM YVVGFAETVV DLLKESDSMM VDPTNDIRII
 301 GSITVVILLG ISVAGMEWEA KAQVILLVIL LIAIANFFIG TVIPSNNEKK SRGFFNYQAS
 361 IFAENFGPSF TKGEGFFSVF AIFFFPAATGI LAGANISGDL EDPQDAIPRG TMLAIFITTV
 421 TM7AYIGVAICVA ACVVRDATGS MNDTIVSGMN CNGSAACGLG YDFSRCQHEP COYGLMNNFO
 481 TM8VMSMVSFGFGP LITAGIFSAT LSSALASLVS APKVFOALCK DNIFKGLQFF AKGYGKNNP
 541 TM9LRGYFLTFVI AMAFILIAEL NVIAPILSNF TM10FLASYALINE SCFHASYAKS PGWRPAYGIY
 601 TM11NMWVSLFGAI LCCAVMFVIN WWAAVITYVI ELFLYIYVTY KKPVDVNWSS TQALSYSVAL
 661 DNALELTVE DHVKNERPQC IVLTGGPMTR PALLDITHAF TKNSGLCICC EVFVGPRLKC
 721 TM12VKEMNSGMK KQAWLIKNI KAFYAABAAD CFRDGVRSLL QASGLGRMKP NTLVIGYKKN
 781 WRKAPLSELE NYVGIHDAF DFEIGVVIVR ISQGFDISPV LQVQDELEKL EQERLALAEA
 841 IKDNECEEGK GGIRGLFKKA GKLNITKPAP KKGGNISSIQ SMHVGEFNQK LVEASAQFKK
 901 KOGKGTIDVW WLFDDGGLTL LIPYILTLRK KWKDCKLRIY VGGKINRIEE EKISMASLLS
 961 KERIKFADII IIGDINIKPN KE WKVFEEM IEPYRLHESH KDLTTAEKLR RE PWKITDA
 1021 TM11ELEAVKEK Y RQVRLNELLO EHSRAANLIV LSLPVARKGS IDLLYMAWL EILTKNLPV
 1081 LLVRGNHKNV LTFYS

B

661 DNALELTVE DHVKNERPQC IVLTGGPMTR PALLDITHAF TKNSGLCICC EVFWRATSS
 721 TM12GSSAFSLCSQ WVMLGGTETD HGNRKEKKRL GQEFSLKKQ TNKQCNRGCK

Figura 14: En A) se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CSBm1-9 (DNaC C9), los aminoácidos la región carboxiterminal que no presenta CSBm1-4 se encuentran subrayados. En B) se muestra la región carboxi terminal de CSBm1-4, los aminoácidos subrayados son los 56 aminoácidos únicos de CSBm1-4.

Los dominios transmembrana están marcados como TM entre las llaves rectangulares.

Los aminoácidos del cassette A de CSBm1-9A están encerrados en un rectángulo.

- ◆ posibles sitios de glucosilación de la proteína.
- posibles sitios de fosforilación para la proteínasa C (PKC).
- posibles sitios de fosforilación para la proteínasa A (PKA).

decir, C4 es 325 aminoácidos más corta que C9. Además los últimos 56 aminoácidos de C4 son diferentes a C9 (figura 15).

La secuencia que codifica para la isoforma CSBm1-9F presenta 98% y 96% de homología con el CSB de rata (CSBr-F) y conejo (CSBrab-F) respectivamente. Las secuencias del CSBm-9 y mNKCC2 (publicada previamente) ¹⁴⁸ son casi idénticas, con excepción de 49 nucleótidos dispersos en las secuencias. Siete de estos nucleótidos son cambios no conservados (11, 30, 48, 599, 773, 873 y 946), de los cuales tres están presentes en la secuencia de C4 (30, 48, y 599). Todas estas posiciones de C9, con excepción de la 873, son idénticas en el CSBr y el CSBrab. Las diferencias entre CSBm-9 y mNKCC2 se explican como polimorfismos en las diferentes cepas de ratones (CD1 y BALBc) que se emplearon para aislar el DNAC de los CSB.

De hecho, se investigó el efecto del polimorfismo del codón 11 en la función del CSBm-9, para lo cual se amplificó por RT-PCR la región de los nucleótidos 73 al 238 de C9 a partir RNA extraído de tejido renal del ratón CD1, los fragmentos obtenidos se subclonaron en el sitio Eco RV de pBluescript. Diecisiete secuencias fueron tomadas al azar y secuenciadas, ocho de estas secuencias presentaron el codón CAC (histidina) en el codón 11 y nueve presentaron el codón CCC (prolina). Se determinó el efecto de este polimorfismo en la función del cotransportador con la técnica de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* y no se encontró diferencias significativas (dato no mostrado).

Al igual que en los otros miembros de la familia, C9 presenta múltiples sitios potenciales de fosforilación para la proteínacinas C (PKC), dos en el dominio amino-terminal (Ser 57, Thr75) y cinco en el dominio carboxi-terminal (Thr 639 y 927; Ser 983, 999 y 1029). Todos estos sitios están conservados en CSBr. Por otra parte dos de los tres sitios potenciales para la proteínacinas A (PKA) en el sitios carboxi-terminal predichos en CSBrab y el CSBr también están presentes el C9 (Ser 1013 y Ser 1052). Los sitios consenso para PKA y tres de los cuatro sitios consenso para PKC de la región carboxi-terminal de C9 no están presentes en la secuencia de C4. Sin embargo, es interesante señalar que dentro de los 56 aminoácidos diferentes de C4 presenta dos sitios únicos potenciales de

fosforilación para la PKC (Ser 756 y Thr 761) y un único sitio potencial de fosforilación para PKA (Thr 761) (figura 14).

Detección y caracterización de los transcritos del CSBm

Para identificar los diferentes transcritos del CSB del riñón de ratón se realizaron análisis de Northern blot, con RNAm extraído de médula externa, con sondas específicas para cada una de las isoformas (C9 y C4) (ver metodología apartado 2). Con la sonda específica para C4 se detectaron tres transcritos: de 3.0kb, 7.4kb, y >9.0kb y con la sonda específica para C9 únicamente se detectó un transcrito de 4.6 kb (Figura 16).

En el análisis de Northern Blot con RNA extraído de varios tejidos y empleando una sonda que identifica tanto C9 como C4, se confirmó que CSBm es específico de riñón, como previamente Igarashi reportó ¹⁴⁸.

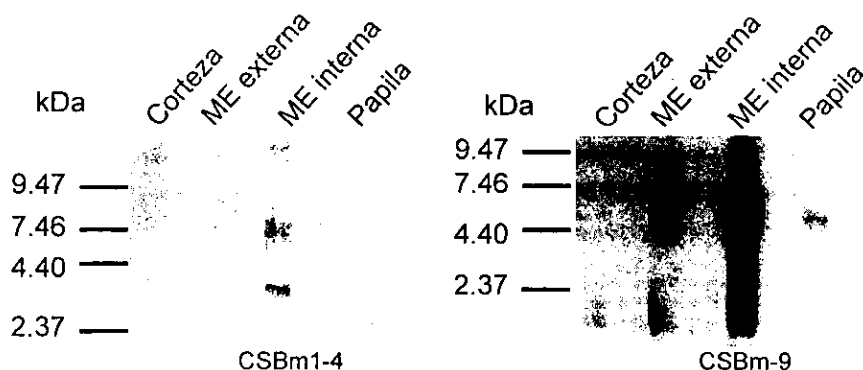


Figura 16. Análisis de Northern blot de los transcritos del CSBm1 en los diferentes secciones renales empleando sondas específicas para cada isoforma (CSBm1-9 y CSBm1-4). Se corrió 2.5 µg de RNAm en cada pozo. La membrana se hibridaron con una sonda de 382 pb en el caso de C4 y de 475 para C9. El tiempo de exposición en la autoradiografía para identificar a la isoforma CSBm1-4 fue de 45 min mientras que para la isoforma CSBm1-9 fue de toda una noche.

Las clonas que se aislaron de la genoteca de la médula externa de riñón fueron la isoforma CSBm1-4 que poseían el cassette A y la clona CSBm1-9 con el cassette F descritos por Payne ¹⁴⁷, por lo que, empleando juegos de iniciadores (*primers*) adecuados para cada isoforma y la metodología de RT-PCR (ver metodología apartado 3), se buscaron y encontraron las isoformas con el cassette A, B y F

faltantes de las isoformas de CSBm1-9 y CSBm1-4 (figura 17). Estos resultados sugirieron que la combinación de los dos tipos de empalme (5' y 3') generan seis isoformas del CSBm1, así que se buscaron y se clonaron las isoformas restantes con la técnica de RT-PCR de RNAm (ver metodología apartado 2). Las isoformas que contienen el cassette B se aislaron de RNAm de corteza, mientras que las isoformas CSBm1-4F y CSBm-9A se aislaron de RNAm de la médula renal.

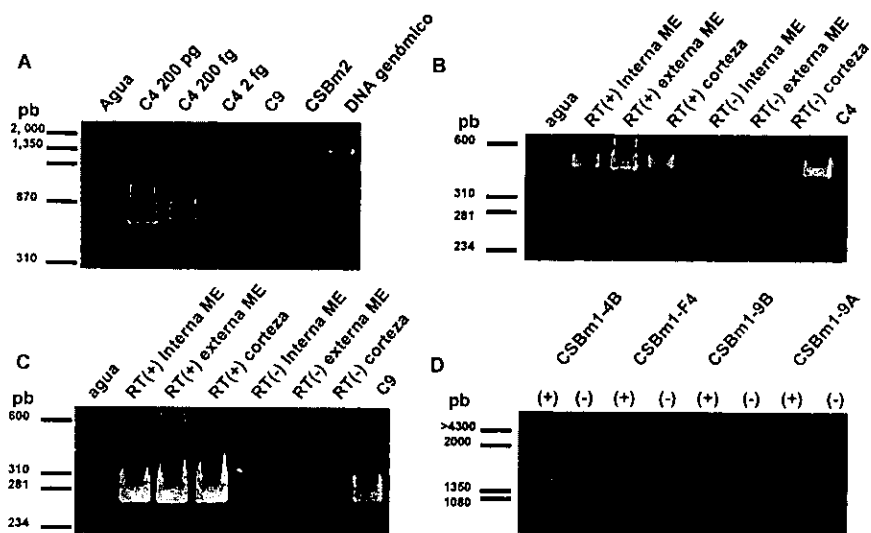


Figura 17. RT-PCR de RNA de riñón de ratón. El gel A muestra la especificidad y sensibilidad de los pares de iniciadores para C4 (S1 específico para C4 y AS1 para CSBm1), la reacción también se realizó con el DNA genómico y con el DNAc de CSBm2. El gel B es una RT-PCR con los primers específicos para C4 en donde se amplificó un producto de ≈ 510 pb en la región externa como interna de la médula externa y en corteza del riñón de ratón, RT(+)= se llevó a cabo la transcripción reversa, RT(-)= no se realizó la transcripción reversa. El gel C es una RT-PCR con los primers S2 AS2 que identifican a la isoforma C9 (producto de 278 pb). El gel D es una RT-PCR con los primers específicos para los cassettes de exones (A, B y F) de C4 y C9.

Estructura parcial del gen CSBm1.

La comparación entre el DNAc y el DNA genómico reveló la presencia de un sitio donador interno TGGTAAGAG (nucleótidos 2342-2350) en el punto de empalme alternativo de exones para generar el extremo carboxiterminal de C4 o C9. El sitio alternativo de poliadenilación para la región UTR 3' de C4 se localizó en el intrón que se encuentra entre el exón 16 y 17. (figura 18)

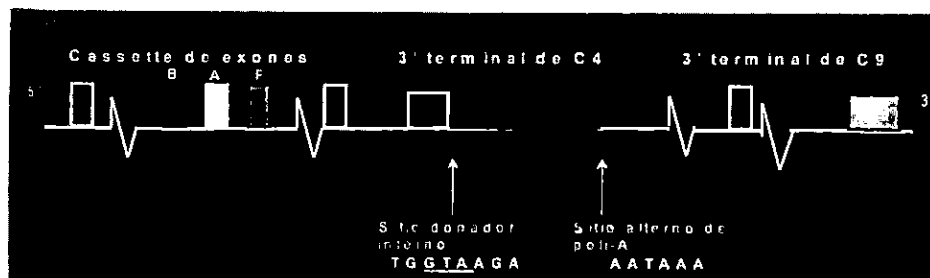


Figura 18. Representación parcial del gen del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida del riñón de ratón. En el exón 16 se localizó un sitio interno de empalme alternativo de exones que da origen al extremo 3' terminal de la clona C4 y un sitio alternativo de poladenilación entre los exones 16 y 17 (ATA).

Caracterización de las proteínas de CSBm1.

Con análisis de traducción *in vitro* (ver metodología apartado 3) de C4 y C9 identificamos proteínas con pesos moleculares de 77.4 ± 4.9 kDa y 131.1 ± 17.9 kDa respectivamente, lo que sugirió que C4 codifica para una proteína de 83kDa y C9 una proteína de 120kDa. La amplia cantidad de bandas encontradas en la electroforesis de gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de los productos de la traducción *in vitro*, también observadas en los análisis con el CSBr³⁹, indican que las proteínas posiblemente se glicosilen (figura19).

La identificación de las proteínas de las dos isoformas de CSBm en el tejido renal se realizó con análisis de Western blot con anticuerpos específicos contra cada empalme alternativo de la región carboxiterminal (CSBm1-9 y CSBm1-4). En este análisis se identificaron dos bandas de ≈ 150 kDa (149 y 142) en la fracción de proteínas de membrana de médula externa de riñón. En geles de poliacrilamida de bajo porcentaje se logró la resolución de estas dos bandas de CSBm1-9.

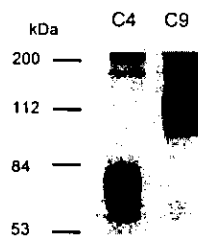


Figura 19 . Identificación de las proteínas de CSBm1 con la técnica de traducción *in vitro*, CSBm1-4 \approx 83kDa y CSBm1-9 \approx 120kDa

Probablemente la diferencia de peso molecular se deba al estado de glicosilación de las proteínas (Figura 19).

También se realizaron análisis de Western blot con anticuerpos generados con un péptido de la región única del carboxiterminal de la isoforma C4, en extractos de proteínas de riñón, músculo, corazón e hígado. Uno de los dos conejos inmunizados con el péptido de la isoforma C4 generó antisuero que reacciona con una proteína de 120 kDa, que era el peso molecular esperado para la isoforma C4 glicosilada. El anticuerpo purificado reconoce una proteína del mismo peso molecular que se encuentra tanto en corteza como en médula renal no así en

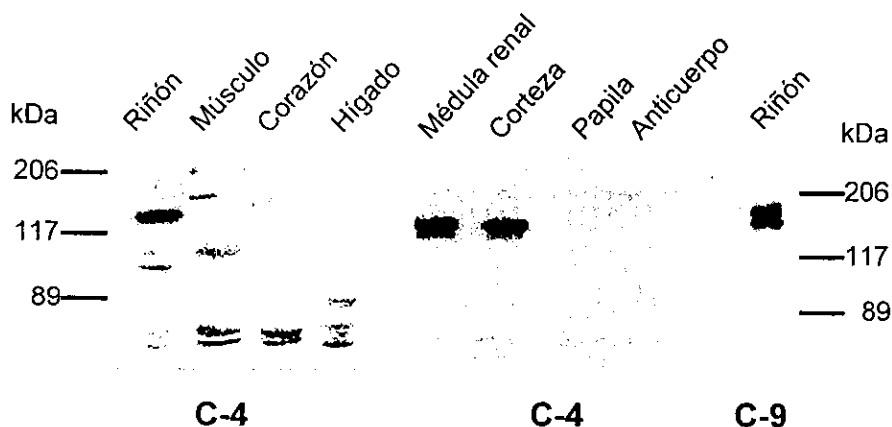


figura 20. Localización de las isoformas del CSBm1 en diferentes tejidos con la técnica de Western blot. De izquierda a derecha WB de varios tejidos incluyendo el riñón para el cual se utilizó el anticuerpo que identifica los aminoácidos 735-749 específicos de la isoforma CSBm1-4. El siguiente WB es de diferentes secciones del riñón empleando el mismo anticuerpo, el último carril se inmuno-absorbió el anticuerpo anti-C4 para determinar la fidelidad del estudio. El último WB es con anticuerpos específicos para C9

otros tejidos. La reacción fue abolida cuando se absorbe el anticuerpo con el antígeno (figura 20). Con estos estudios determinamos que la Isoforma del CSBm1-4 es una proteína exclusiva del riñón. Los pesos moleculares de las dos isoformas C9 y C4 corresponden a las proteínas de 150 kDa y 75 kDa que se unen a $[H^3]$ Bumetanida reportadas por Haas⁷⁶.

Inmunofluorescencia.

La localización de las isoformas CSBm1-4 y CSBm1-9 se valoró directamente en cortes de tejido renales mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para cada isoforma (ver metodología apartado 4). Con los anticuerpos anti-C4 se detectó la proteína CSBm1-4 en las células del asa ascendente de Henle de la médula externa (zona externa e interna) y de la corteza. Sin embargo, observamos que la reacción antígeno-anticuerpo de los estudios de inmunofluorescencia sólo ocurre en algunas células, lo que indica que la proteína CSBm-4 no se presenta en todas las células del asa de Henle. La localización heterogénea de CSBm-4 se observa especialmente en la región

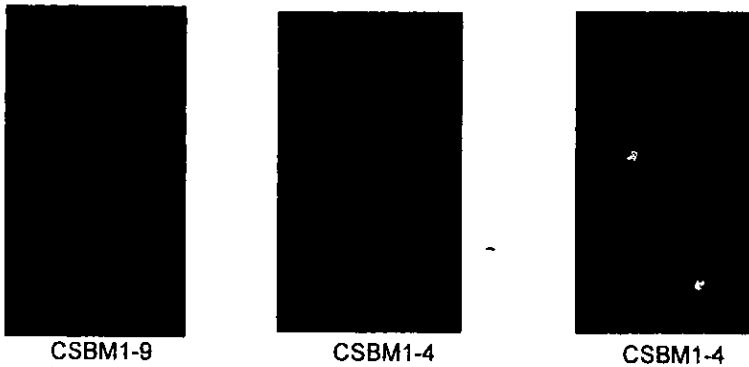


Figura 21. Inmunolocalización de las isoformas del CSBm1 en cortes de tejido renal. Para este estudio se emplearon anticuerpos específicos para cada isoforma CSBm (C4 y C9). Se observa claramente que el marcaje con anti-C9 es homogéneo en contraste con anti-C4 que mostró un marcaje heterogéneo y con una tendencia al citoplasma.

cortical del asa de Henle. Es importante hacer notar que el marcaje de la inmunofluorescencia se observa en el citoplasma, lo que da la impresión de que la proteína CSBm-4 se localiza de manera subapical. Con respecto a la localización de la isoforma CSB1m-9, en contraste con CSBm1-4, se detectó en la membrana apical de todas las células del asa gruesa ascendente de Henle. (figura 21)

Todos estos datos demuestran que en el riñón de ratón (CD1) existen seis isoformas del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ del asa ascendente de Henle

generadas por dos mecanismos de empalme alternativo de exones. Uno debido a la presencia de tres exones mutuamente excluyentes (A,B ó F) en la segunda región transmembrana y el otro a un sitio de empalme interno del exón que genera los dos posibles extremos carboxiterminales. Uno de 457 aminoácidos que corresponde a CSBm-9 y otro de 132 aminoácidos que pertenece a CSBm1-4, de los cuales los últimos 56 son diferentes a C9.

Todas las isoformas se localizan en las células de asa de Henle, pero su localización es diferente; CSBm1-9 es claramente de localización apical y está presente en todas las células, mientras que C4 es de localización subapical y heterogénea. Otra diferencia importante entre C9 y C4 son los diferentes sitios potenciales de fosforilación para PKA y PKC (figura 22).

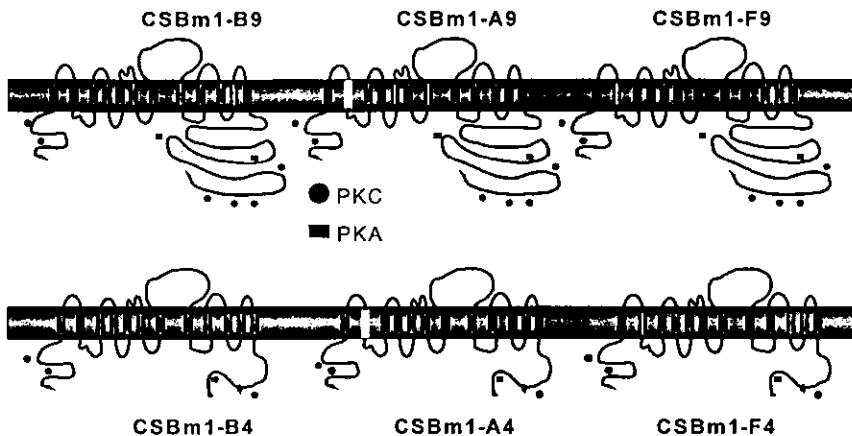


Figura 22. El empalme alternativo de exones de la región carboxi terminal y el cassette de exones (A, B y F) del gen del CSBm1 generan a 6 Isoformas del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida las cuales están formadas por 12 dominios transmembrana, región amino y carboxiterminal de posible localización intracelular. Las diferencias entre ellas son la secuencia de aminoácidos de la segunda región transmembrana y la región carboxiterminal así como los sitios potenciales de fosforilación para la PKA y PKC.

Expresión funcional del CSBm1-9 (C9) en ovocitos de *Xenopus*.

Los experimentos de expresión funcional se realizaron al cuarto día después de la inyección de los ovocitos con el RNAc de cada clona, a 32.5 °C en el momento de incubarlos con el radioactivo. El tiempo de captación de los isótopos radioactivos

($^{22}\text{Na}^+$ o $^{86}\text{Rb}^+$) fue de 30-60 minutos (ver metodología apartado 7-8). Los resultados se muestran en gráficas de barras. En el eje de la X se señalan los diferentes grupos experimentales. Cada barra son grupos de 20-25 ovocitos con diferentes tratamientos e inyectados con RNAc de las diferentes clonas o con agua. En el eje de las Y se muestran la media y error estándar de captación del isótopo radioactivo en pmol/ovocito/h de cada grupo. La valoración de las diferencias entre cada uno de los grupos se realizó con análisis de varianza

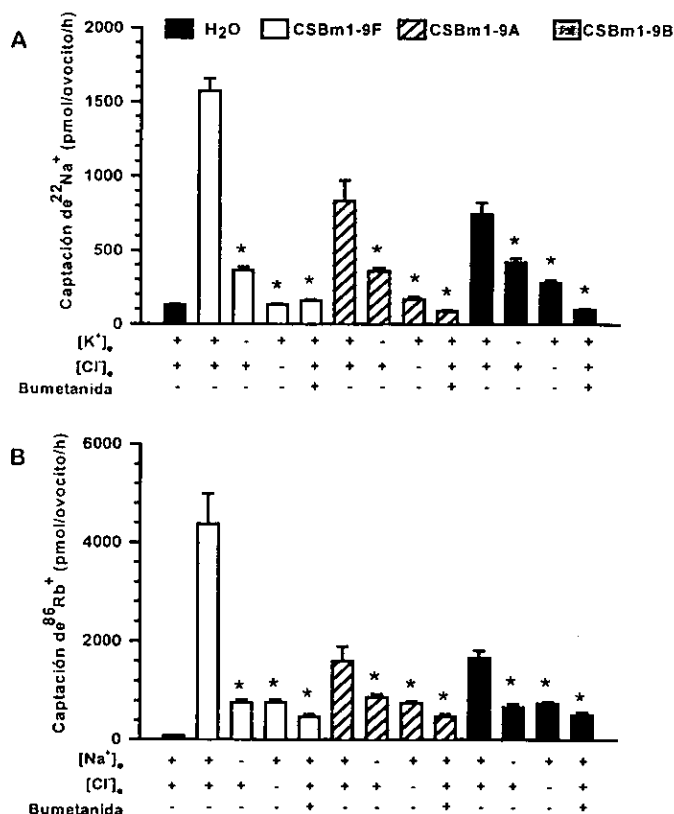


Figura 23. Expresión funcional de las isoformas CSBm1-9 A, CSBm1-9 B y CSBm1-9 F. Diferentes grupos de 20-30 ovocitos fueron incubados en presencia (+) o ausencia (-) de los iones que transportan (Na^+ , K^+ y Cl^-)

* $p < 0.001$ diferencia significativa contra los grupos que presentan los iones Na^+ , K^+ y Cl^-

(ANOVA) de una vía y de múltiple comparación, con las pruebas de corrección de Bonferroni o con el análisis de varianza por rangos de una vía de Kruskal-Wallis, con el proceso de múltiple comparación por el método de Dunn.

Los experimentos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus* inyectados con RNAc de las isoformas de CSBm1-9 (A, B y F) mostraron un claro incremento en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en comparación con los ovocitos inyectados con agua. Como se observa en la figura 23A el incremento de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ radiactivo se presenta en todas las isoformas C9 (A, B y F), la cual disminuye en ausencia de K^+ y de Cl^- y en presencia de bumetanida ($100\mu\text{M}$). En la misma figura se muestra que el ensayo de expresión funcional con $^{86}\text{Rb}^+$ de las tres isoformas de CSBm1-9, que al igual que la captación con $^{22}\text{Na}^+$, presenta un importante incremento de las captaciones del radiactivo en los grupos inyectados con CSBm1-9 con respecto al grupo inyectado con agua. Además la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ de las isoformas CSBm-9 es dependiente de Na^+ y Cl^- y disminuye en presencia de bumetanida (figura 23B). Con estos experimentos demostramos que las tres isoformas de CSBm1-9 (A, B y F) son cotransportadores de Na^+ : K^+ : 2Cl^- sensible a bumetanida.

Existen dos observaciones importantes a considerar con relación a estos resultados: 1) La captación en la isoforma C9F siempre fue mayor que en C9B y C9A y 2) en los experimentos de captación de $^{22}\text{Na}^+$ C9B sólo redujo la mitad la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ausencia de K^+ . Esto sugiere que posiblemente la segunda región transmembrana confiera diferentes propiedades en la capacidad de transporte y afinidad a los iones a las diferentes isoformas.

Estas observaciones concuerdan con la localización de las diferentes isoformas en el riñón realizadas por Igarashi et al ¹⁴⁸ con las técnicas de hibridación *in situ* y por Yang et al ¹⁵⁶ con la técnica de PCR en nefrona única. Ambos mostraron que las isoformas F, A, B se distribuyen en forma diferencial a lo largo del asa ascendente de Henle (figura 24). C9F se localiza en la región interna de la médula externa, C9A en la región externa de la médula externa y C9B muestra una localización exclusiva en la corteza renal.

Por otra parte Isenring ¹⁶⁵ demostró que en la quimera de la segunda región transmembrana, que realizaron a partir de los cotransportadores CSB_n2 y CSB_n1-A, la afinidad de los cationes y a la bumetanida fue diferente a los silvestres (CSB1-A y CSB2). Además Giménez et al ¹⁶⁶ en estudios cinéticos preliminares del transporte de Na⁺ y Cl⁻ de las tres isoformas, realizados con ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*, encontraron que el Km para Cl⁻ y Na⁺ son diferentes en cada una de ellas:

Km_{Cl⁻} CSB-B= 8.9±1 mM

Km_{Na⁺} CSB-B= 20.7±2 mM

Km_{Cl⁻} CSB-A= 44.7±4 mM

Km_{Na⁺} CSB-A= 16.5±2 mM

Km_{Cl⁻} CSB-F= 111±13 mM

Km_{Na⁺} CSB-F= 66.7±6 mM

Estos datos sugieren que las isoformas del CSB-9 juegan un papel importante en el mantenimiento del gradiente osmolar de la médula renal y la fisiología renal de sodio. Debido a que CSB-9F está expuesta a osmolaridades altas (1500 mOsm/l), por localizarse en la región interna de médula externa, es probable que C9F sea un transportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ con baja afinidad pero alta capacidad de transporte. En cambio la isoforma C9B, que se localiza en la corteza, está expuesta a osmolaridades similares al plasma (300 mOsm/l), sea un transportador de alta afinidad por los iones aunque con baja capacidad de transporte y C9A presente una afinidad intermedia. Las diferencias cinéticas de las tres isoformas

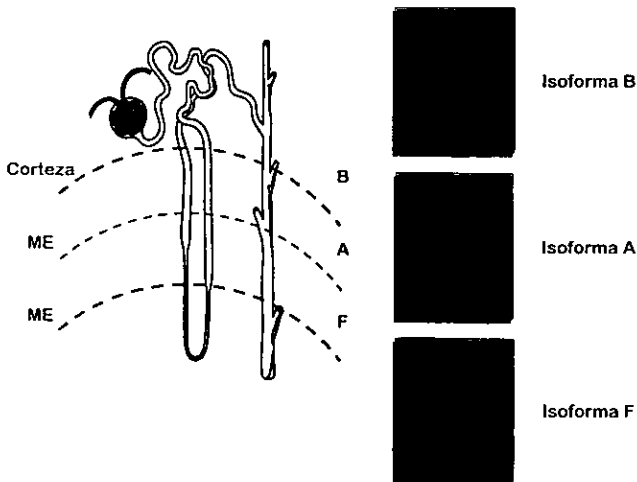


Figura 24. Igarashi y colaboradores determinaron una localización diferencial de las diferentes isoformas del CSB1 (A, B y F) en cortes sagitales de riñón, empleando análisis de hibridación *in situ* con sondas de RNA marcadas con ³²P específicas para cada isoforma. La isoforma B se localizó en corteza, la isoforma A se observó tanto en la zona externa como interna de la médula externa y la isoforma F sólo en la zona interna de la

probablemente ayuden a una rápida recuperación y/o al mantenimiento del gradiente osmolar de la médula renal durante la diuresis o la antidiuresis.

También se analizaron las isoformas C9 (A, B y F) con el polimorfismo codón 11 CCC (prolina) o CAC (histidina) y se observó que inducen un transporte de Na^+ : K^+ : 2Cl^- sensible a bumetanida (dato no mostrado).

Sensibilidad del CSBm1-9 (C9) a los diuréticos.

En los experimentos anteriores se demostró que el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con C9F es inhibido con bumetanida, por lo que se probaron otros dos diuréticos: la hidroclorotiazida y la furosemida. Como se muestra en figura 25 los grupos de ovocitos inyectados con C9F no disminuyen su captación de $^{22}\text{Na}^+$ al ser expuestos a $100\mu\text{M}$ de hidroclorotiazida, en contraste con los grupos incubados con furosemida $100\mu\text{M}$ en donde se encontró que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ disminuye a valores semejantes a los grupos inyectados con H_2O . Con estos experimentos se comprobó que C9 es el cotransportador de Na^+ : K^+ : 2Cl^- sensible a los diuréticos de asa derivados del ácido sulfamoilbenzoico (bumetanida y furosemida), pero no a los diuréticos tipo tiazidas.

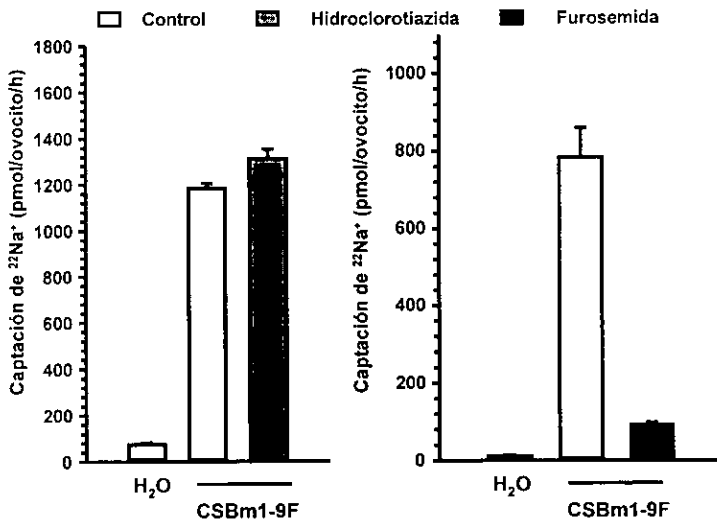


Figura 25. La captación de $^{22}\text{Na}^+$ CSB-9F no es inhibida por diuréticos tipo tiazida (barra gris), pero sí por diuréticos de asa (barra negra).

Efecto de la activación de las proteínquinas A (PKA) en la captación de ovocitos inyectados con C-9.

Está bien determinado que diferentes hormonas o factores que activan la vía de la proteínquina A (PKA) incrementan la actividad del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida del asa ascendente de Henle^{56,63,72,98,108,167-169}. Así que se estudió el efecto de la estimulación de la PKA en los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAc de la isoforma C9. La figura 26A muestra los resultados de siete experimentos en ovocitos extraídos de diferentes ranas e inyectados con RNAc de C9F. En la figura se observa que el grupo de ovocitos inyectados con C9F incrementan la captación de $^{22}\text{Na}^+$ que es abolida por la presencia de bumetanida, pero no es afectada con la presencia de estimuladores de la PKA como es el AMPc ($\text{N}^6\text{-2' O}$ Dibutilil adenosin 3'-5' monofosfato cíclico 1mM) más un inhibidor de las fosfodiesterasas como es el isobutililmetilxantina (100 μM de IBMX) (2 090 \pm 93 vs 2 102 \pm 87 pmol/ ovocito/ h; p= no significativa).

Con base en a las observaciones anteriores y con el conocimiento de que en el ovocito existen altas concentraciones de AMPc intracelular¹⁷⁰⁻¹⁷², se valoró el efecto que tiene un inhibidor específico de la PKA, como es el H89, en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con C9F. En la figura 26B se muestran

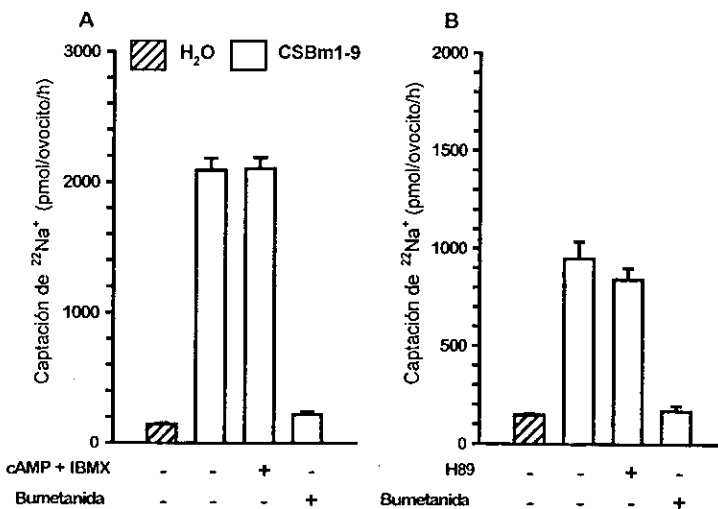


Figura 26. Efecto de la activación de la PKA en la actividad del CSBm1-9.

los resultados de tres experimentos, en donde la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con C9F expuestos con H89 20 μM no cambia (947 ± 88 vs 841 ± 57 pmol/ ovocito/ h; p =no significativa). Por lo tanto, se llegó a la conclusión que la función de CSBm1-9F expresado en los ovocitos no es afectada por la activación de la PKA inducida por AMPc-IBMX o por la inhibición de la actividad de la PKA endógena de los ovocitos con H89.

Estos resultados sugerían que el ovocito carecía de algún elemento que regula el incremento de la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ por la vía de la PKA y que está presente en las células del asa de Henle. Es poco probable que los elementos de la cascada de transducción de señales de la PKA falten en el ovocito, ya que el efecto de esta proteínacinas sobre la función en otras proteínas de la nefrona; como la acuoporina 2¹⁷³, el transportador de urea 1⁴⁴ y el canal de potasio ROMK⁶⁸; se caracterizó en ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estos estudios muestran claramente que la función de las tres proteínas incrementa cuando los niveles de AMPc aumentan.

Expresión funcional del CSBm1-4 (C4) en condiciones hipoosmóticas (150 mOsmolar).

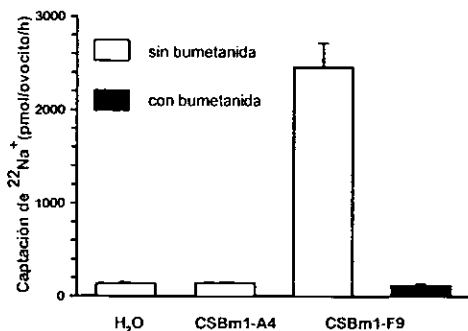


Figura 27. Expresión funcional de C4 en condiciones de 150 mOsmolar

Con las evidencias de la existencia de dos tipos de cotransporte electroneutro sensible a bumetanida en el asa de Henle (Na-K-2Cl y Na-Cl) (ver introducción), se propuso que si la isoforma CSBm1-9 es el cotransporte dependiente de potasio, posiblemente CSBm1-4 codifique para el cotransporte independiente de potasio. Sin embargo, los ovocitos inyectados con CSBm1-4 no transportaron sodio en

condiciones de 150 mOsmolar. En la figura 27 se muestra el resumen de 11 experimentos y muestra que los grupos de ovocitos inyectados con RNAc de C4 no captan $^{22}\text{Na}^+$ a diferencia de los grupos inyectados con RNAc de C9, el mismo efecto se observó en experimentos con $^{86}\text{Rb}^+$.

Expresión funcional de la coinyección de C4 con C9.

Por la ausencia de función en los ensayos de expresión funcional de C4, se trabajó otra hipótesis que ayudaría a entender la existencia de esta isoforma en riñón de ratón. Esta hipótesis proponía que la isoforma C4 tenía un efecto cooperativo o regulador sobre la función de C9, el cual probablemente favorecería que el transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ se modificara a $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$. Con este planteamiento se realizaron estudios funcionales coinyectando los dos RNAc de C9 y C4 en los ovocitos de *Xenopus laevis*. En estos estudios se observó que la coinyección C4/C9 disminuye la captación de $^{22}\text{Na}^+$ con respecto a los ovocitos inyectados con C9.

La figura 28 muestra una curva de dosis respuesta de la coinyección del RNAc de

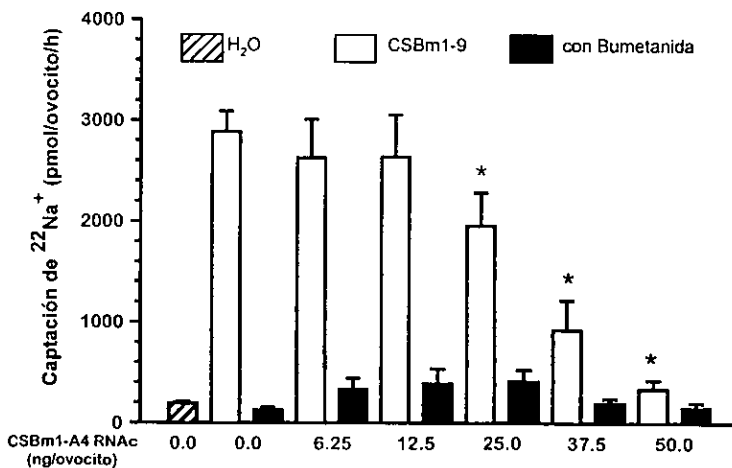


Figura 28 Curva de dosis respuesta de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en la coinyección de RNAc de C4/C9. La concentración de C9 se mantuvo constante en todos los grupos (25ng/ovocito), C4 (0-50 ng/ovocito) . * $P < 0.01$ vs control (C9 sin C4)

C9F/C4A manteniendo constante la concentración de RNAc de C9 (25ng/ovocito) y variando la concentración de RNAc de C4 (0-50 ng/ovocito). En esta gráfica se observa claramente como el incremento de la concentración del RNAc de C4 disminuye la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de forma dosis dependiente. Aproximadamente la $K_{1/2}$ de inhibición se alcanza con una concentración de C4 25ng/ovocito.

El siguiente paso fue analizar el tipo de transporte de sodio que generaba la coinyección de los RNAc de C9/C4. En la figura 29 se muestra la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los grupos de los ovocitos coinyectados con C9/C4 en presencia y ausencia de los iones Cl^- o K^+ . En esta gráfica se observa que la captación de los ovocitos coinyectados con ambas clonas disminuye significativamente en ausencia de K^+ o Cl^- en los medios de captación, así como en presencia de bumetanida 100 μM . Por lo tanto la captación de $^{22}\text{Na}^+$ que se observó en los ovocitos coinyectados C9/C4 pertenecía al CSBm1-9F. Con estos datos se demostró que C4 tiene un efecto negativo en la actividad del CSBm1-9.

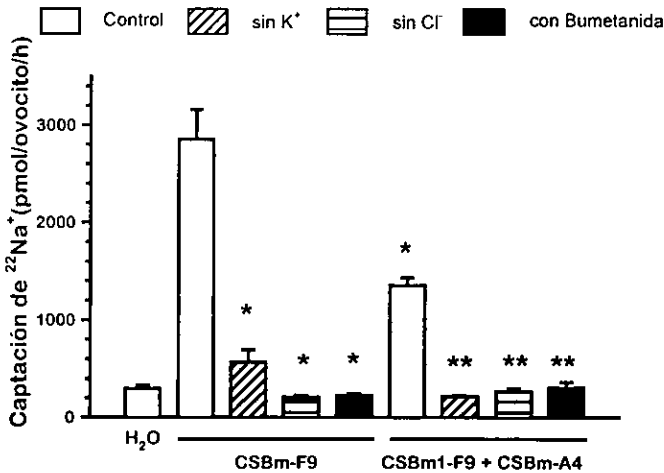


Figura 29. Dependencia de iones de la coinyección de RNAc de C4/C9. * $p < 0.0001$ vs control, ** $p < 0.001$ vs C9/C4

Se descartó que el decremento de la coinyección de los RNAc de C9/C4 fuera por una competencia de los RNAc inyectados por los ribosomas con la coinyección de CSBm1-9 con RNAc's no relacionados a los cotransportadores (renina y un canal de K^+). Estos ensayos de expresión funcional mostraron que el efecto de la coinyección entre C9F/C4A no es por competencia de ribosomas, ya que los ovocitos coinyectados con C9/renina y C9/ canal de K^+ no redujeron la captación de $^{22}Na^+$ como ocurrió con la coinyección de C9/C4 (C9= $2\,122 \pm 80$ vs C9/renina= $1\,759 \pm 308$ y C9/ canal de K^+ = $1\,918 \pm 145$ pmol/ ovocito/ h; p= no significativa). (Figura 30).

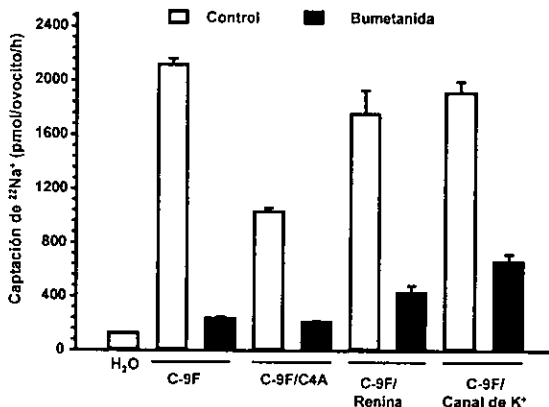


Figura 30. La coinyección de RNAc de C9 con otros RNAc no relacionados a la familia de cotransportadores (renina, canal de K^+) no afecta la función de CSBm1-9
* $p < 0.0001$ C9 vs C9/C4

También se valoró que efecto de la segunda región transmembrana en la coinyección C9/C4. La figura 31 muestra que las coinyecciones C9A/C4A, C9F/C4F y C9B/C4B presentaron una disminución en la captación de $^{22}Na^+$ con respecto a los ovocitos inyectados únicamente con C9, situación muy

parecida a la coinyección C9F/C4A. Por lo que se concluyó que la segunda región transmembrana no tiene efecto en la captación de sodio en los ovocitos coinyectados con C9/C4.

Como se demostró anteriormente, el tratamiento con AMPc-IBMX en ovocitos inyectados con C9 no tiene efecto en la captación de $^{22}Na^+$ (figura 26), Situación que no concuerda con lo reportado en la literatura. Esta observación junto con el hecho de que los ovocitos inyectados con C4 no induzcan captación de $^{22}Na^+$, pero sí presente un efecto negativo sobre la función de C9 nos hizo proponer que posiblemente la activación de la PKA tuviera un efecto regulador en la captación

de $^{22}\text{Na}^+$ en la coinyección C9F/C4A, así que se valoró el efecto del AMPc-IBMX en los ovocitos coinyectados con C9F/C4A. En la figura 32 se resumen 7 experimentos del efecto de la activación la PKA (AMPc) en grupos de ovocitos inyectados con RNAc de C9F y coinjectado RNAc C9F/C4A. En esta figura se observa que la reducción en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en el grupo C9F/C4A se revierte parcialmente cuando los grupos de ovocitos fueron expuestos a AMPc-IBMX (1023 ± 62 vs 1514 ± 97 pmol/ovocito/h $p < 0.001$). Con estos resultados se demuestra que el efecto inhibitorio de C4 sobre la actividad de CSBm1-9 es parcialmente revertido con la activación de la PKA con AMPc-IBMX, lo que explicaría porque no observamos el incremento de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos que únicamente son inyectados con CSBm1-9.

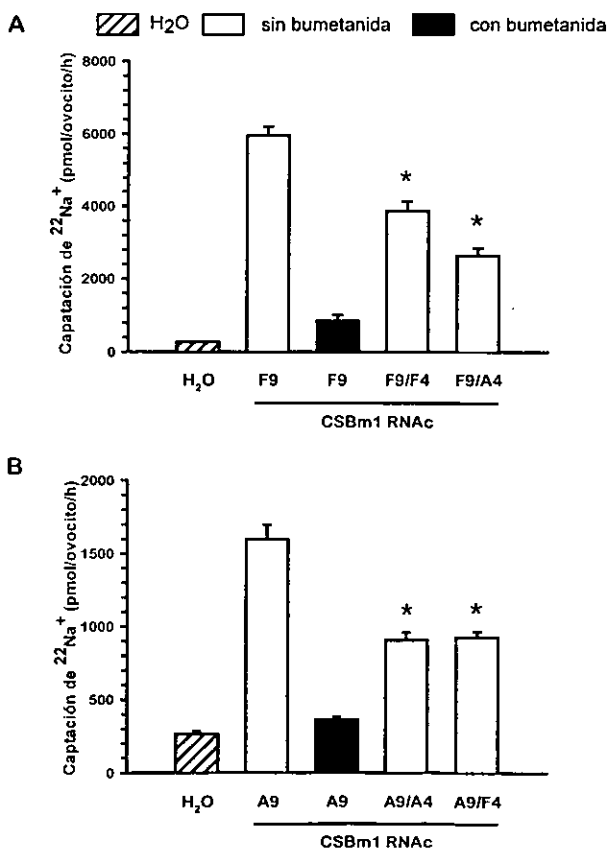


Figura 31. El efecto negativo de C4 en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos coinyectados con C9 es independiente de la segunda región transmembrana (A, B y F.). * $P < 0.001$ vs control CSBm9F o CSBm 9A

Considerando los datos de expresión funcional de la coinyección de C9/C4, junto con el hecho de que ambas isoformas coexisten en las células del asa de Henle (ver análisis de inmunofluorescencia) y de que C4 presenta una aparente localización subapical. Se propuso que la función de los CSB posiblemente se regule a través del movimiento de vesículas de transporte.

Por otra parte, los hallazgos antes mencionados y de la observación de que CSBm1-4 no se presente en todas las células del asa de Henle, especialmente en la corteza renal, son elementos de discusión que explicarían por que la ADH no incrementa la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en la asa ascendente de Henle cortical, pero sí en la asa ascendente de Henle medular⁷ y el argumento sería:^{45,73} que el incremento de la función de CSBm1-9 por la actividad de la PKA sólo sucede cuando coexiste con la isoforma corta (C4), por lo que proponemos que el efecto que tiene la PKA sobre la función de los transportadores posiblemente sea inducir el movimiento de vesículas de transporte que contengan

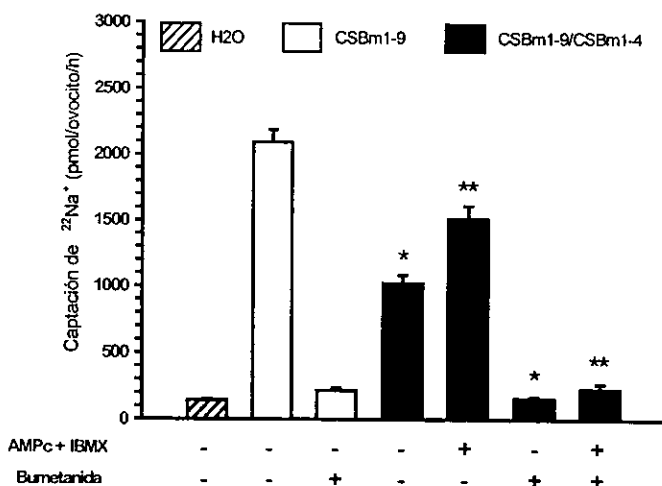


Figura 32. El efecto negativo de C4 sobre la actividad de C9 es parcialmente revertido con la activación de la PKA (AMPC-IBMX). * $p < 0.001$ vs C9 control, ** $p < 0.001$ vs C9/C4 control

homodímeros de C9 ($\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$) hacia la membrana, éstos homodímeros reemplazan a los heterodímeros de C4/C9 y/o homodímeros de C4 ($\text{Na}^+:\text{Cl}^-$), localizados en la membrana, los cuales son introducidos al citoplasma en vesículas de transporte por efecto de la PKA. Otra posibilidad sería que la activación de la PKA induzca cambios estructurales en los heterodímeros C9/C4 ($\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$) de tal forma que permita un transporte de iones más eficiente.

Esta hipótesis correlaciona con las observaciones de Moore et al ¹⁷⁴, quienes con estudios de cross-linker recientemente demostraron que CSB2 forma dímeros. Por otra parte, Nielsen et al ¹⁷⁵ con análisis de inmunohistoquímica y microscopía electrónica en células de asa ascendente de Henle, demostraron que el CSB1r se localiza en vesículas intracelulares.

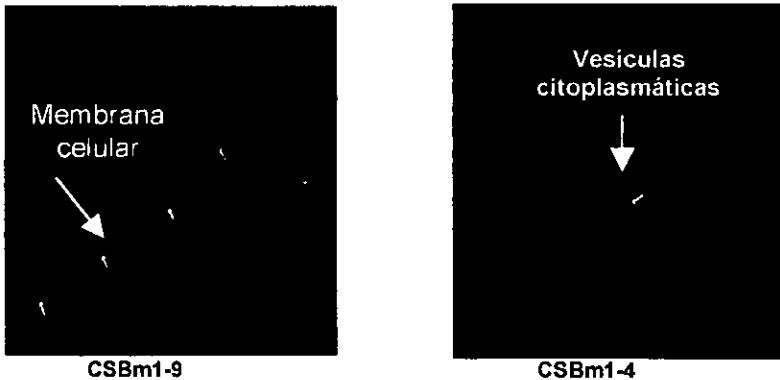


Figura 33 inmunofluorescencia en cortes de ovocito de *Xenopus laevis* con anticuerpos específicos para cada isoforma del CSBm1 en condiciones de 150 mOsm.

Para confirmar nuestra propuesta, se determinó la localización de las isoformas del CSB1m en los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el RNAc de C9 y C4, con análisis de inmunofluorescencias utilizando anticuerpos específicos contra CSBm1-4 y CSBm1-9. En este estudio se observó que la proteína de CSBm1-4 no está presente en la membrana, pero sí en vesículas de transporte en el citoplasma, en contraste con la proteína CSBm1-9 que se localiza en la membrana plasmática (Figura 33). Con estos datos se explicaría por que la isoforma CSBm1-

4 en condiciones de 150 mOsmolar no es capaz de transporta $^{22}\text{Na}^+$, debido a que no llega a la membrana. Este dato correlaciona con la localización subapical de CSBm1-4 en el análisis de inmunofluorescencia en el asa ascendente de Henle.

Activación de CSBm1-4 en medios con tonicidades menores de 100 mOsmolar.

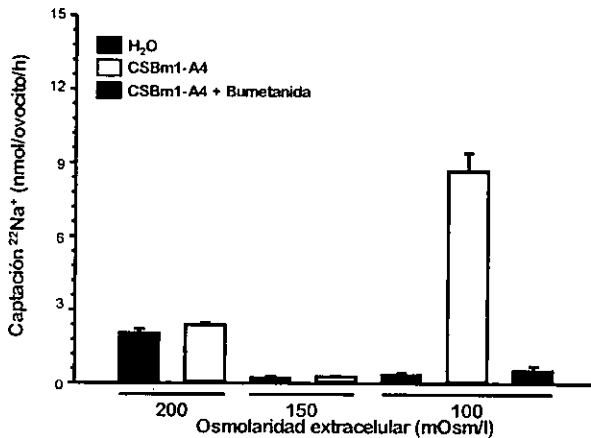
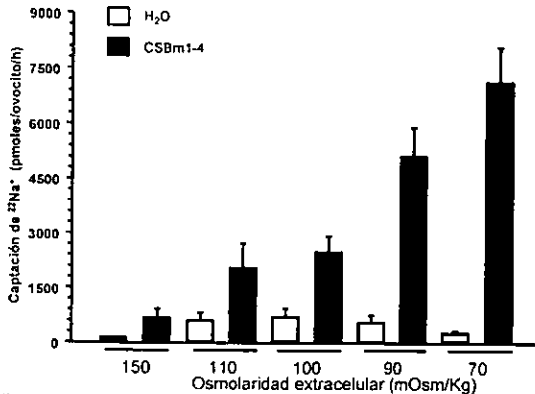


Figura 34. Efecto de la tonicidad en la función de la isoforma CSBm1-4

Las evidencias de que la estructura primaria y secundaria de las proteínas CSBm1-4 y CSBm1-9 son idénticas en las regiones transmembrana y amino terminal, además el hecho de que la proteína CSBm1-4 se

sintetiza en los ovocitos y de que se mantiene en vesículas membranales; indicaban que CSBm1-4 posiblemente fuera una proteína transportadora de sodio, pero en las condiciones en las que se realizaron los ensayos de expresión funcional no eran las adecuadas para que CSBm1-4 llegara a la membrana y funcionara como un transportador de sodio. Por esta razón se buscaron las condiciones adecuadas para inducir la llegada de C4 a la membrana del ovocito. Tomando en cuenta, que uno de los factores reguladores de la función del CSB son los cambios de volumen celular, además que el cambio de transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ a $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ en las células del asa de Henle ocurre cuando disminuye la tonicidad del medio ^{65,66}, se valoró la función de la isoforma C4 en tonicidades menores de 150 mOsmolar con la finalidad de incrementar el volumen celular del

ovocito y tratar de inducir la actividad de CSBm1-4, con la hipótesis de que C4 codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida.



B

Figura 35. La captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con la isoforma CSBm1-4 aumenta conforme disminuye la tonicidad del medio

115 pmol/ovocito/h), la cual es atribuida al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ endógeno de los ovocitos. Estas captaciones se pierden en los grupos incubados en 150 mOsm, debido a que el CSB2 (cotransportador endógeno) disminuye su función cuando se incrementa el volumen celular (236 ± 63 vs 284 ± 48 pmol/ovocito/h). Sin embargo, en las condiciones de 100 mOsm se observa captación de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a bumetanida en los ovocitos inyectados con RNAc de C4, no así en los ovocitos control (H_2O). La captación observada fue de ~48 veces mayor que el grupo de agua (8685 ± 737 vs 181 ± 35 pmol/ovocito/h). Con este estudio se demostró que CSBm1-4 es un transportador de sodio. Los siguientes estudios fueron para caracterizar el transporte.

Se realizó una curva de tonicidad (200-70 mOsm) mostrada en la figura 35. En la curva se observa que conforme disminuye la tonicidad del medio la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de ovocitos inyectados con RNAc de C4 incrementa, no así en los ovocitos inyectados con H_2O . Al graficar el número de veces que incrementa la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de los ovocitos inyectados con C4 con respecto a los ovocitos inyectados con H_2O se observó que la función de CSBm1-4 presenta un comportamiento

En la figura 34 se observan las captaciones de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con RNAc de C4 e incubados a diferentes tonicidades. En la figura se muestra que los ovocitos inyectados con agua y con RNAc de C4 e incubados en soluciones con una osmolaridad de 200 mOsmoles presentan una captación semejante de $^{22}\text{Na}^+$ (2061 ± 176 vs $2391 \pm$

lineal con una $r^2=0.96$ (figura 36), lo que demuestra que la función del CSBm1-4 es dependiente de la tonicidad y/o cambios en el volumen celular. El comportamiento lineal de la función del CSBm1-4 al modificar la tonicidad del medio indica que la máxima actividad del cotransportador se alcanza en tonicidades menores a 70 mOsmoles.

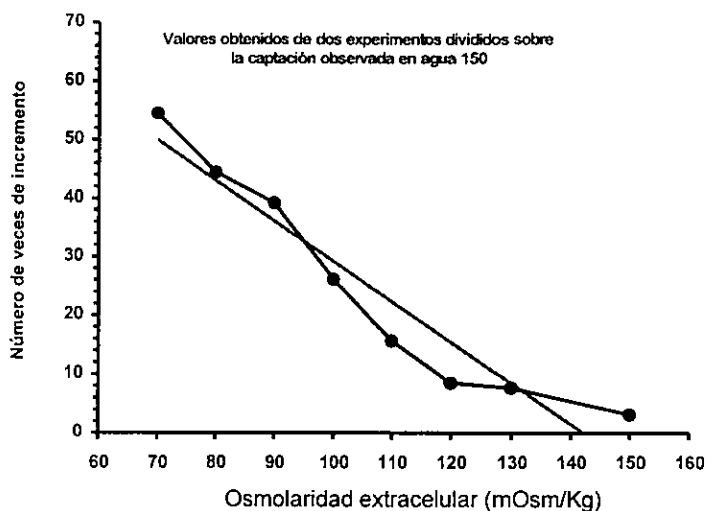


Figura 36. Efecto de la tonicidad en la actividad de C4.

Al determinar que CSBm1-4 funciona en condiciones hipotónicas, se realizó un análisis de Inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para C4 en los ovocitos de *Xenopus* para localizar a la proteína CSBm1-4 en dos tonicidades diferentes. En este estudio encontramos que los ovocitos expuestos en 200 mOsm/Kg la proteína CSBm1-4 permanece en el citoplasma en vesículas de transporte, en contraste con los ovocitos que fueron incubados en 80 mOsm/Kg en donde la proteína se encuentra en la membrana celular y poco en el citoplasma, esto indicó que las vesículas que contenían a los cotransportadores migraron a la membrana en el momento en que disminuye la tonicidad o aumenta el volumen celular. Aún en esta tonicidad existen vesículas en el citoplasma; lo que explicaría porqué la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de la curva de tonicidad de los ovocitos inyectados

con C4, antes mencionada, no llega a la meseta de activación máxima, porque faltan transportadores por llegar a la membrana celular (figura 37).

Lo siguiente fue valorar la captación de $^{22}\text{Na}^+$ y sensibilidad a la bumetanida de las tres isoformas de CSBm1-4 (A, B y F) en condiciones de 100mOsm/Kg. Como lo muestra la figura 38, los ovocitos inyectados con RNAc de las tres isoformas de CSBm1-4 incrementan la captación de $^{22}\text{Na}^+$ con respecto a los grupos control (H_2O). El incremento de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de las tres isoformas disminuye en presencia de bumetanida 100 μM .

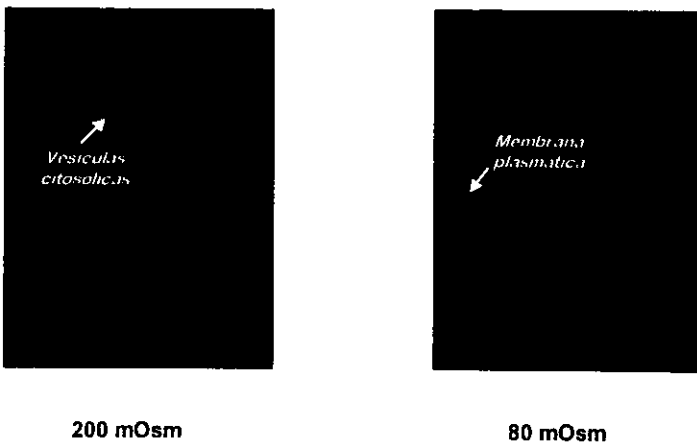


Figura 37. Localización de la isoforma CSBm1-4 en ovocitos de *Xenopus* en 200 mOsm y 80 mOsm (Imagen 200X).

Al determinar que las tres isoformas de CSBm1-4 inducen un transporte de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a bumetanida, el siguiente paso fue determinar la dependencia iónica de este tipo de transporte. La figura 39 muestra que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de C4 (3670 ± 592 vs $\text{H}_2\text{O} = 52 \pm 10$ pmol/ovocito/h) en condiciones de 100 mOsm disminuye en presencia de bumetanida (998 ± 293 pmol/ovocito/h, $p < 0.0002$) que es dependiente a la presencia de cloro (1297 ± 289 pmol/ovocito/h, $p < 0.0005$) pero independiente a K^+ (2876 ± 438 pmol/ovocito/h, $p = \text{No significativo}$).

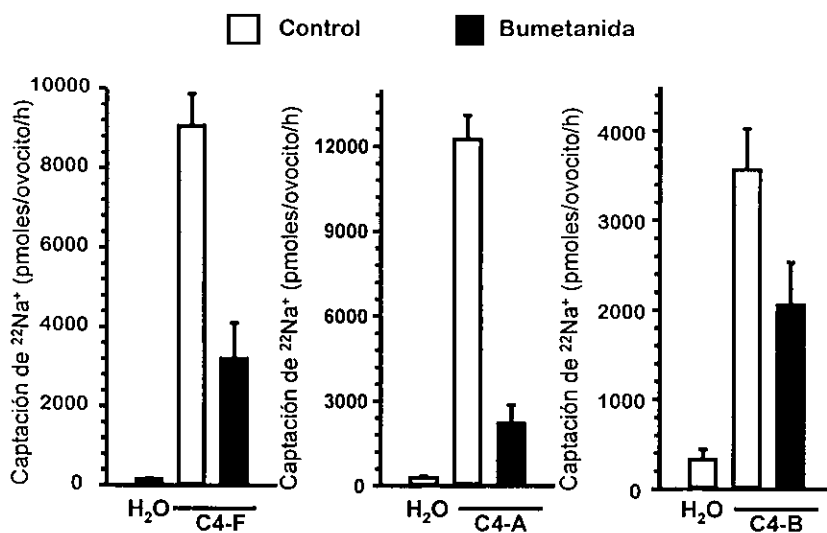


Figura 38. Las tres isoformas (A,B y F) del CSBm1-4 son transportadores de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a bumetanida e hipotonicidad dependiente.

La independencia de K^+ de la función de CSBm1-4 se confirmó con ensayos de expresión funcional con $^{86}\text{Rb}^+$. En la figura 40 se compara la captación de $^{22}\text{Na}^+$ y de $^{86}\text{Rb}^+$ de ovocitos inyectados con C4. Ambos ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones experimentales (100 mosm/Kg, 40mM de Na^+ , 10mM de K^+ , 50mM de Cl^-), la única modificación fue el isótopo con el cual se valoró el transporte. En la gráfica 40A se observa que los ovocitos inyectados con C4 incrementan la captación de $^{22}\text{Na}^+$, con respecto a los ovocitos control (H_2O). Esta captación de $^{22}\text{Na}^+$ disminuye con la presencia de bumetanida, en contraste con la gráfica 40B que no muestra la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ de los ovocitos inyectados con CSBm1-4, lo que indicó que CSBm1-4 no transporta de K^+ pero sí Na^+ . Con estos datos proponemos que la isoforma CSBm1-4 se activa cuando hay un incremento del volumen celular y que es un transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida.

Por otra parte se valoró el efecto de la activación de la PKA sobre la función de CSBm1-4. En la gráfica 41 se muestra el efecto del AMPc y de la IBMX en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con C4. En este estudio se encontró que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con C4 disminuye en presencia de un activador de la PKA (AMPc) y/o un inhibidor de las fosfodiesterasas (IBMX). El efecto de la adición de AMPc 1mM sobre la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de los ovocitos inyectados con CSBm4 es de una ligera disminución (19%) pero no tiene significancia estadística (6611 ± 700 vs 5293 ± 663), en contraste con el efecto del IBMX que reduce 50% la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con CSBm4 (3585 ± 487 pmol/ovocito/h vs control de C4, $p < 0.01$). Cuando ambos compuestos se agregaron al medio de incubación, el decremento de la captación de Na^+ es de 70% (2080 ± 514 pmol/ovocito/h, $p < 0.01$), lo que indica que el mantenimiento del estado fosforilativo de CSBm1-4 y/o elementos que permiten la llegada a la membrana de vesículas de transporte que contengan a CSBm1-4 impiden la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida.

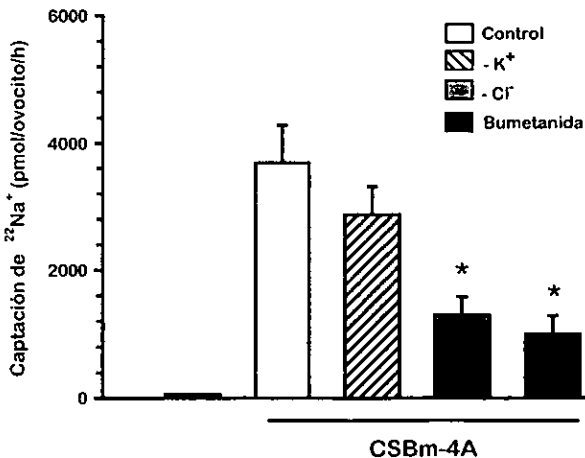


Figura 39. C4 en 100 mOsmolar funcionan como un cotranspotador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a diuréticos de asa.
* $p < 0.05$

El efecto inhibitorio del AMPc en la función de CSBm1-4, concuerda con el efecto que tiene el tratamiento con AMPc-IBMX en la recuperación de la función de CSBm1-9 en los ovocitos coinyectados con C9 y C4 (figura 32).

Por último se caracterizó la sensibilidad a la bumetanida sobre la función de C4, con una curva de dosis respuesta que se muestra en la figura 42. La curva de inhibición de bumetanida de C4, en condiciones de 100 mOsm/Kg es muy parecida a la de inhibición de C9, en condiciones de 150mOsm/Kg. La concentración media de inhibición de la bumetanida sobre la función tanto del CSBm1-4 como del CSBm1-9 en 150 Osmolar fue de $\sim 10^{-6}$ M. Estos datos contradicen lo reportado por Hass⁷⁶ en los experimentos de unión de [H^3]bumetanida a proteínas de membrana del asa de Henle. En este trabajo mencionan que la proteína de 75 kDa (peso que correspondería al CSBm1-4) es de baja afinidad por la bumetanida ($K_{1/2} = 2.40 \mu M$, $B_{max} = 1.85 \text{ pmol/mg proteína}$) con respecto a una proteína de 150 Kd ($K_{1/2} = 0.052 \mu M$ y $B_{max} = 0.224 \text{ pmol/mg proteína}$), que correspondería al peso molecular de CSBm1-9 (figura 10). Sin embargo, es importante marcar que estos datos muestran la capacidad que tiene

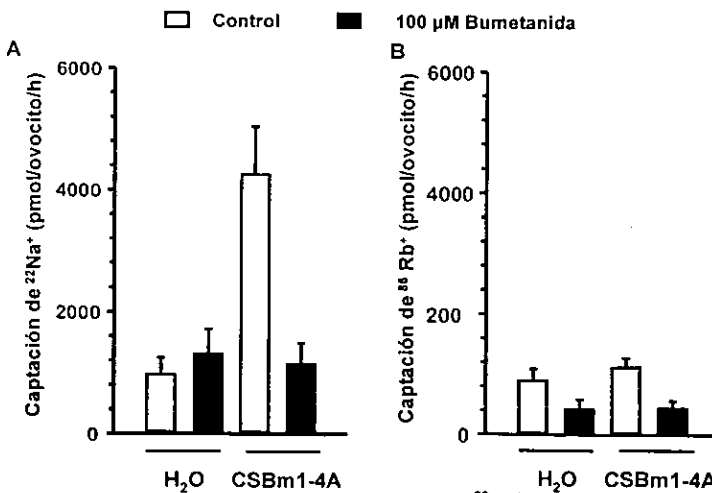


Figura 40. C4 en 100 mOsmolar induce la captación de $^{22}\text{Na}^+$ (A) pero no de $^{86}\text{Rb}^+$ (B).

la bumetanida de unirse al transportador, lo que no quiere decir que su capacidad de afectar la actividad de la proteína sea igual, por lo que es importante realizar otros experimentos para confirmar los datos obtenidos y correlacionarlos con lo observado por Hass.

Considerando todos los datos de expresión funcional obtenidos en el presente trabajo junto con las evidencias fisiológicas de la presencia de dos cotransportadores de Na^+ sensibles a bumetanida de asa ascendente de Henle^{56,66,76}, proponemos que el transportador activo en el asa de Henle, cuando la médula renal está hipertónica, es la isoforma CSBm1-9 ($\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$), mientras que la isoforma CSBm1-4 ($\text{Na}^+:\text{Cl}^-$) se mantiene en citoplasma en vesículas membranales.

Es importante mencionar que cuando ocurre la diuresis, la médula renal pierde el gradiente hipertónico (figura 6). En estas condiciones, como lo propone Evelof^{64,66}, las células del asa de Henle se encuentran en un ambiente hipotónico relativo como consecuencia de esto se induce un incremento del volumen celular. Probablemente el incremento de volumen y/o la dilución de algún elemento del citoplasma (ejemplo: $[\text{Cl}^-]_i$) promuevan el movimiento de las vesículas de

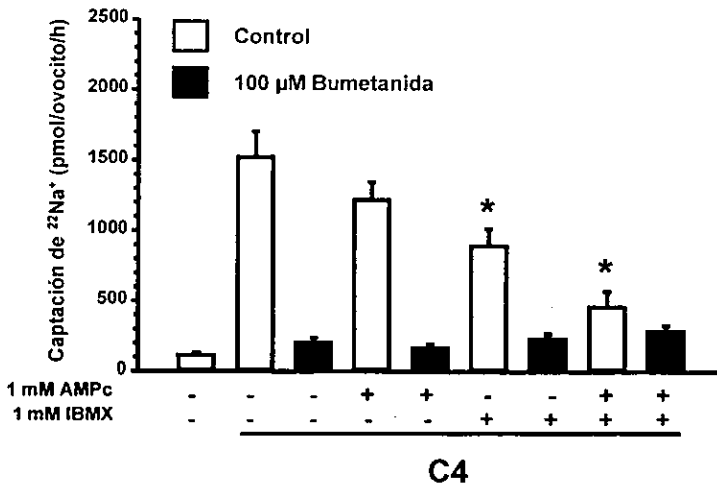


Figura 41. La activación de PKA con AMPc-IBMX inhibe la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con RNAc de C4. * $p < 0.01$ vs C4 control

transporte que contienen a la isoforma CSBm1-4 hacia la membrana así como la función de proteína, de esta manera cambia el tipo de transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ a $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$. Posiblemente el cambio de transporte mantiene la reabsorción de NaCl en el asa de Henle, que es importante en esta zona (20% de NaCl del filtrado glomerular), de esta manera se evita la pérdida de NaCl . Además contribuye a la recuperación del gradiente osmolar por la entrada de osmolitos (NaCl), aunque disminuida en contraste con CSBm1-9, pero no favorece la reabsorción de agua debido a la pérdida del gradiente osmolar.

La localización de la isoforma CSBm1-4 en el análisis de inmunofluorescencia no sólo mostró a la proteína en el asa ascendente gruesa de Henle sino también en el asa ascendente delgada, en contraste, con CSBm1-9 que sólo se localiza en el asa ascendente gruesa. Este dato es interesante porque existe una controversia acerca de la presencia o no de un transporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ en esta región de la nefrona ^{8,9,53,176,177}. Hay que señalar que esta es la zona más hipertónica de la médula renal, lo que nuevamente nos hace suponer que el estímulo para que funcione CSBm1-4 es por un aumento del volumen celular, debido a un

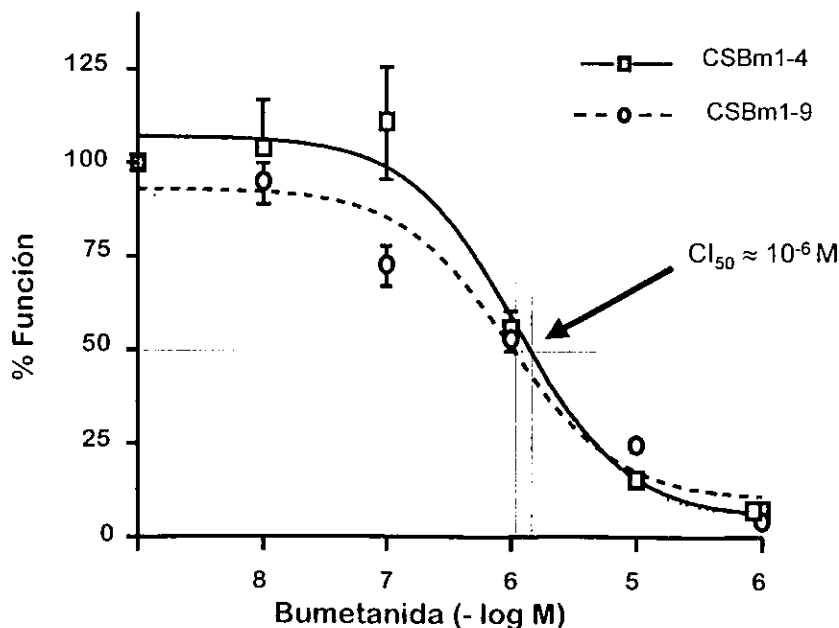


Figura 42. Curva dosis inhibitoria de bumetanida sobre la función de C9 en 150 mOsmolar y C4 en 100mOsmolar.

decremento de la tonicidad del intersticio medular (hipotonicidad relativa).

Posiblemente los factores que activan o desactivan la función de CSBm1-4 en los decrementos de tonicidad del medio sean cambios en el volumen de las células epiteliales, por medio de elementos del citoesqueleto que regulen señales de transducción involucradas en el movimiento de vesículas de transporte a la membrana y/o la función del CSBm1-4. Esto lo proponemos porque se demostró que elementos del citoesqueleto como la F-actina⁹³ y la miosina¹⁰⁶ regulan la función de CSB2. Otro factor que probablemente regule la función de CSBm1-4 sea la disminución de la concentración de algún elemento en el citoplasma, como es el caso del Cl⁻ intracelular^{93,126-128}

Lang y col¹⁶⁶ demostraron la existencia de una treonin-serincinasa (sgk) en varios tejidos entre ellos el riñón, que incrementa su transcripción con cambios en la tonicidad del medio isotónico a hipertónico, esta cinasa estimula la actividad de los canales epiteliales de Na⁺ sensibles a amilorida (ENAC)^{178,179}. Lang recientemente demostró que sgk incrementa la función de CSBm1-9¹⁸⁰. Por estas observaciones suponemos que posiblemente existan cinasas que en condiciones de hipotonicidad regulen la actividad de CSBm1-4.

La hipótesis de que los cambios en el gradiente osmolar y la disminución de la concentración de iones de la médula como posibles factores que activen al CSBm1-4 se apoya en los trabajos realizados por Matsumura et al⁵⁴, Watts B et al¹⁸¹, Capasso et al¹⁷³, que se explican a continuación.

Matsumura et al con estudios de microperfusión *in vitro* y midiendo el potencial transepitelial valoraron la permeabilidad del cloro de las asas ascendentes delgadas de Henle de ratones knockout para gen CLCK. En estos estudios se encontró que la modificación de la concentración de cloro de 145 mM a 14.5 mM de la solución en la que fueron incubados los túbulos, que representaría al intersticio medular; incrementan significativamente el potencial transepitelial de 0.00±0.2 mV a 36.7±0.7 mV de los túbulos de los ratones CLCK1^{+/+}, situación que no sucede en las asas de los ratones CLCK1^{-/-} (0.1±0.1 mV a 6.2±1.1 mV). Además, los ratones CLCK1^{-/-} presentan síntomas parecidos a la diabetes insípida,

por lo que, se considera que este canal es importante en la conservación del gradiente osmolar de la médula renal.

Watts B et al ¹⁸¹ con análisis de microperfusión *in vitro* estudiaron el efecto de la hipotonicidad sobre la actividad del intercambiador de Na^+/H^+ que se localiza en la luz del asa de Henle. En este estudio demostraron que la actividad del intercambiador de Na^+/H^+ incrementa cuando las asas de Henle son sumergidas en soluciones hipotónicas, sin embargo, el aumento de la actividad del intercambiador de Na^+/H^+ no ocurre cuando la solución hipotónica es perfundida en la luz de los túbulos renales; lo que sugiere que el estímulo que induce el aumento de la actividad del intercambiador debe presentarse en el intersticio medular, no así en la luz de los túbulos. Si consideramos que la cara apical de las células del asa ascendente gruesa de Henle es impermeable al agua en contraste con la cara basolateral que permite la entrada de agua a las células, entonces, el estímulo que activa al intercambiador de Na^+/H^+ podría ser los cambios en el volumen celular. El intersticio medular tiene contacto directo con la cara basolateral de las células del asa de Henle, así que, posiblemente cambios en la tonicidad del intersticio medular, como ocurre en la diuresis, modifiquen la actividad del intercambiador de Na^+/H^+ .

Capasso et al ¹⁷³ valoraron el transporte de HCO_3^- y Cl^- con estudios de microperfusión del asa de Henle *in vivo* en ratas a las que se les indujo decremento de la osmolaridad de la médula renal, por medio de la infusión intravenosa con una concentración importante de manitol (18%) o soluciones hipotónicas. En el estudio observaron que la disminución del gradiente osmolar de la médula renal incrementa el transporte de HCO_3^- y Cl^- .

Estos estudios demuestran que el decremento de la osmolaridad de la médula renal es un estímulo importante para que varios sistemas de transporte incrementen su función, probablemente con la finalidad de restablecer el equilibrio osmolar de la médula renal y/o evitar la pérdida de iones que mantienen la homeostasis del organismo, posiblemente CSBm1-4 sea uno de estos sistemas de transporte que se activan por cambios de la osmolaridad en la médula renal.

CONCLUSIONES

- Las seis isoformas CSBm1-9 (A, B y F) y CSBm1-4 (A, B y F) provienen del mismo gen y son resultado de dos mecanismos de empalme alternativo de exones que codifican para la segunda región transmembrana y carboxi terminal. Ambas proteínas se localizan exclusivamente en riñón.
- Las tres isoformas del CSBm1-9 codifican para proteínas de 1095 aminoácidos (150 KDa) que en condiciones isotónicas e hipotónicas moderadas actúan como cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ sensible a diuréticos de asa. La activación de la PKA no ejerce efecto alguno en la función de la isoforma CSBm1-9.
- Las tres isoformas del CSBm1-4 codifican para una proteína de 770 aminoácidos (120KDa) que no presenta función alguna en medios extracelulares isotónicos o moderadamente hipotónicos; sin embargo, las tres isoformas actúan como cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ en condiciones de hipotonicidad extrema.
- La activación de la PKA disminuye la función de la isoforma CSBm1-4.
- La clona 4 ejerce un efecto negativo sobre la función del CSBm-9, el cual es parcialmente revertido con la activación de la PKA (AMPc). La activación de la PKA no tiene efecto directo en la actividad CSBm-9, por lo tanto proponemos que el mecanismo de activación del CSBm-9 por la vía de la PKA (ADH) es por la liberación del efecto negativo causado por la isoforma reguladora CSBm1-4.
- La isoforma CSBm1-4 posiblemente juegue un papel importante en el mantenimiento de la hipertonicidad de la papila medular renal, así como en la recuperación de NaCl en el asa de Henle en el momento que se presenta la diuresis.

Con la información obtenida en el presente trabajo, junto con lo que se conoce sobre la fisiología renal del transporte electroneutro de sodio en el asa ascendente gruesa de Henle (ver introducción página 15), proponemos los siguientes modelos para explicar los mecanismos de regulación de los transportadores de Na^+

electroneutros sensibles a diuréticos de asa por la ADH y cambios en la tonicidad del medio.

ADH

Nuestro modelo esta basado en los siguientes puntos: 1) existen diversos estudios que demuestran que el $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ presente en el asa gruesa de Henle incrementa su función en presencia de la ADH; 2) Sun et al ⁵⁶ demostraron la presencia de un transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a furosemida en túbulos perfundidos con medios carentes de K^+ y sin vasopresina, el cual desaparece en presencia de la ADH; 3) en nuestras observaciones encontramos que la isoforma CSBm1-9 es un transportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ y que la isoforma CSBm1-4 es un transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, ambos transportadores son sensibles a bumetanida; 4) el CSB1 es capaz de formar dímeros; 5) observamos que activadores de PKA inhibe el transporte de Na^+ generado por CSBm1-4 no así el transporte de Na^+ de CSBm1-9 y 6) el efecto

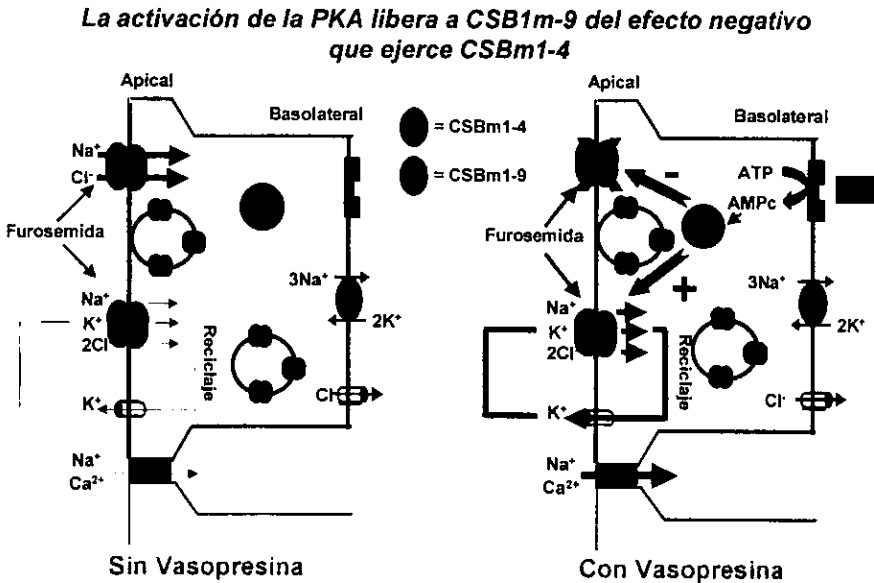


Figura 43. Fisiología del transporte de sodio electroneuro sensible a furosemida del Asa Ascendente Gruesa de Henle

que tiene la activación de la PKA sobre la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos coinyectados con CSBm1-4/CSBm1-9 es de incrementar la captación de $^{22}\text{Na}^+$.

En base a estos datos, proponemos que en ausencia de ADH la isoforma CSBm1-9 se localiza en la membrana de las células epiteliales en forma de heterodímero con la isoforma CSBm1-4, por lo que la cantidad de Na^+ transportado es menor, por el efecto negativo que ejerce CSBm1-4 sobre CSBm1-9, en contraste con el homodímero de CSBm1-9, que es más eficiente. Si homodímeros de CSBm1-4 se localizan en la membrana el transporte que generan es de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$. En cambio en presencia de ADH (antidiuresis) se induce un incremento la actividad del transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ (CSBm1-9), por la activación de a la PKA. Posiblemente el aumento en la función del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sea por cambios conformacionales en la estructura del heterodímero CSBm1-9/CSBm1-4, dados por la fosforilación directa de las proteínas, lo que facilita el incremento de la función de CSBm1-9 y/o el movimiento de vesículas de transporte hacia la membrana que contengan a los homodímeros de CSBm1-9, de tal forma que las vesículas de transporte que contengan al CSBm1-9 llegan a la membrana y son insertadas en ella, al mismo tiempo que promueven la endocitosis de los heterodímero CSBm1-9/CSBm1-4 en vesículas de transporte. Este intercambio vesicular aumenta el número de homodímeros CSBm1-9, por lo tanto el transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ incrementa. Por otra parte el transporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ dado por CSBm1-4 es bloqueado, ya sea porque la fosforilación directa de la proteína inhiba su función o porque es expulsada de la membrana e introducida al citoplasma en vesículas de transporte (figura 43).

Cambio de tonicidad

El aumento o disminución del volumen celular de las células epiteliales del asa de Henle modifica el tipo de transporte de la siguiente manera: En condiciones hipertónicas (disminución de volumen celular) el transporte activo en las células epiteliales es el de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ (CSBm1-9), mientras que la isoforma CSBm1-4 se mantiene en vesículas en el citoplasma. Cuando por alguna razón fisiológica existe una disminución del gradiente osmolar del intersticio medular, como es el

caso de la diuresis, trae como consecuencia un aumento en el volumen de las células epiteliales del asa ascendente de Henle. Este aumento de volumen celular favorece que excita un proceso de exocitosis y endocitosis de vesículas de transporte que contengan las diferentes isoformas de CSBm1, de manera tal que las vesículas que contengan a la isoforma CSBm1-4 llegaran a la membrana y los transportadores tipo CSBm1-9 serán introducidos a la célula en vesículas de transporte. Este movimiento de proteínas transportadoras en la membrana promueve el cambio del tipo de contranporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ al cotransporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida, con la finalidad de que la medula renal mantenga la entrada de NaCl , pero sin la entrada de agua en los túbulos colectores por la pérdida del gradiente osmolar de la médula renal y la ausencia de la ADH (Figura 44).

El cambio de tonicidad modifica la dependencia de K^+ en el transporte de Na^+ del CSBm1

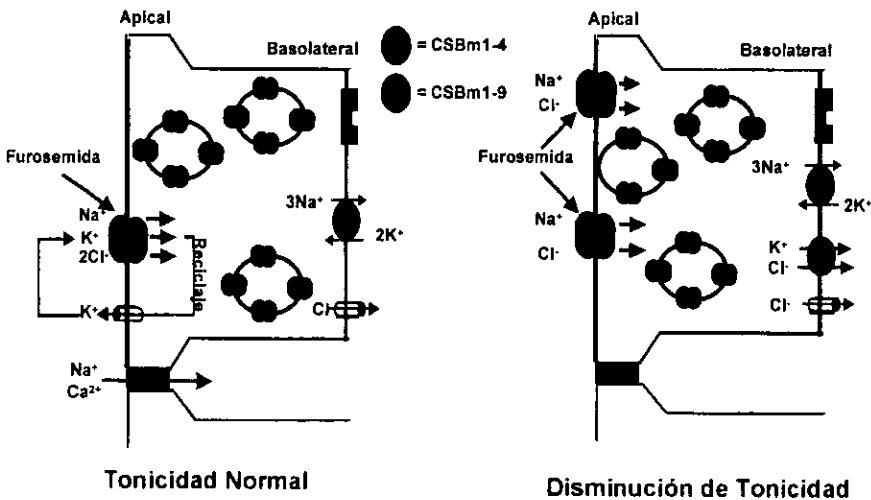


Figura 44. Fisiología del transporte de sodio electroneutro sensible a furosemida del Asa Ascendente Gruesa de Henle

Para finalizar, el presente trabajo abrió una nueva visión sobre la fisiología del transporte de sodio electroneutro renal, así como, una serie de preguntas en el

ámbito de estructura y función de las isoformas CSB1. Algunas de estas preguntas son:

- ✓ ¿La región carboxiterminal de las isoformas CSBm1 está regulando la llegada de las mismas a la membrana citoplásmica? ¿Cuales son los mecanismos y/o elementos moleculares necesarios para que se de este movimiento de proteínas?
- ✓ ¿Es real la formación de heterodímeros CSBm1-9/CSBm1-4? ¿Cuáles son los cambios en la estructura de la proteína o en su entorno que incrementan su función en presencia de ADH?
- ✓ ¿Cuál es la estructura cuaternaria de estos transportadores que les confiere la propiedad de responder de diferente manera dependiendo de las condiciones de su entorno?, ¿Cambia el número y tipo dímeros (C4,C9) dependiendo del tipo y aumento del transporte que generen?
- ✓ ¿Será CSBm1-4 el transportador de Na:Cl responsable de mantenimiento del gradiente osmolar en el asa ascendente delgada de Hele?
- ✓ ¿En el riñón humano existe la isoforma CSBm1-4? Si es así ¿Mutaciones en el análogo humano de CSBm1-4 son causantes del síndrome de Bartter o diabetes insípida?
- ✓ ¿Qué papel juegan los sitios potenciales de fosforilación para PKA y PKC en la función de los diferentes cotransportadores?

La respuesta de estas preguntas, nos permitirá entender mejor el papel que juegan las isoformas CSB1 en el mantenimiento del gradiente osmolar de la médula renal y en la recuperación del NaCl para la regulación del volumen de los líquidos corporales, así como, los problemas fisiopatológicos que se generan con la alteración en la estructura de las isoformas del cotransportador electroneutro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetida apical.

METODOLOGÍA (apartados)

1.- Secuenciación y aislamiento del DNAc.

El aislamiento de las clonas del CSBm se realizó a partir de una librería direccional de DNAc entre 3 -6 Kb de la médula externa del riñón de ratón (CD-1) construida en pSPORT1 (SuperScript, BRL). Para la cual se aisló RNA poliadenilado con el método de isotiocianato de guanidina. Se seleccionó el RNAm con columnas de oligo-dT-celulosa (tipo Pharmacia). Las colonias fueron analizadas rápidamente (screened) con una sonda marcada con ³²P de la región Bam H1-BamH1 (nucleótidos 1194-2543) del CSTfl a una astringencia moderada. Diecisiete colonias fueron aisladas. Se extrajo el DNA plasmídico, las clonas obtenidas se clasificaron por el número de bases, se mapearon con enzimas de restricción y se secuenciaron completamente con el kit versión 2.0 de la Secuenasa (US Biochemica) con un secuenciador automático Applied Biosystems model 373A (Biopolymer Sequencing facility, Howard Hughes Medical Institute, Harvar Medical School). Para el análisis de secuencia de nucleótidos y aminoácidos se realizó con el software GENEWORKS (Intelligenetics, versión 2.3.1) y el programa pBLAST.

2.- Análisis de Northern blots y RT-PCR

Se extrajo RNA de diferentes tejidos de ratón (CD-1 y C57BL/6J), se seleccionó el RNAm de corteza, médula externa, médula interna del riñón de ratón con columnas con resina de oligo(dT) (Oligotex, Quiagen). Este RNA se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (2.5µg de RNAm o 10µg de RNA total por pozo). Se transfirió el RNA a una membrana de nylon(Stratagene) y se realizó la hybridización con sondas específicas para C9 y C4 en condiciones de alta astringencia (50°C en una solución de hibridación compuesta por solución salina citratada (SSCP) 4X, 40% de formamida, 4X de solución de Denhardt's y 0.1% SDS y 200 µg de DNA de esperma de salmón, las membranas fueron lavadas dos veces por 20 minutos a temperatura ambiente en SSCP 2X y 0.1% de SDS y dos veces por una hora a 65 °C en 0.5 X SSCP y 0.1% de SDS.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

79

Las subclonas y fragmentos de restricción de C4 y C9 para generar las sondas fueron las siguientes: Un fragmento de 365pb que flanquean los sitios de restricción HindIII-ApaI (nucleótidos 1284-1649 de C9 y 1306-1671 de C4), el cual se utilizó como sonda común para identificar a las dos isoformas (C9 y C4). Para realizar la sonda específica de C9 se utilizó un fragmento de 475pb que flanquean la enzima de restricción SacI-SacI (nucleótidos 3293-3768 de C9); la sonda específica para identificar C4 fue a partir de un fragmento de 382 pb (nucleótidos 2530-2912). Los fragmentos se amplificaron con PCR y subclonadas el pBluescript. Se realizó de forma individual para cada sonda un análisis de Southern blot a alta astringencia con las clonas CSB1 y CSB2 para verificar su especificidad.

Se realizó análisis de RT-PCR a partir RNA de riñón con pares de iniciadores (*primers*) específicos para C9 y C4, los *primers* sentidos fueron diseñados de una zona común entre las dos secuencias mientras que los antisentidos fueron la región 3' terminal de cada clona. El par de *primer* específicos para C4 fueron:

Secuencia sentido S1: 5'-GACAACGCTCTGGAATTAACC-3'

Secuencia antisentido AS1: 5'-GTCTGCTTCCTTCTCGTTGG-3'

El producto amplificado corresponde a los nucleótidos 2182-2692 de C4 (510 pb).

Los *primers* específicos para amplificar C9 fueron:

Secuencia sentido: S2 5'-GTGCATTGTCTTAACAGGCG-3'

Secuencia antisentido AS2: 5'-GTGTTTGGCTTCATTCTCCC-3'

El producto amplificado corresponde a los nucleótidos 2216—2494 de C9 (278 pb). El RNA total (200ng/ por reacción de PCR) de riñón de ratón fueron transcritos de forma reversa (de RNA a DNA) con iniciadores de oligo (dT). Para la reacción de PCR se utilizó Taq polimerasa (Stragene) y un termociclador PTC-100 programable (MJ Reserch), utilizando 30 ciclos de temperaturas, la temperatura de desnaturalización fue de 92°C por 2 minutos, la temperatura de anidación fue de 54 °C por 1 minuto y de amplificación fue de 72 °C por 1min. Las condiciones para el buffer de los *primers* se optimizaron empleando como templete al DNac de las clonas y el sistema de buffer de Opti-Primer (Stratagene), el cual varía en la concentración de Mg²⁺ y K⁺ y pH. Para llevar acabo la PCR con el par de

iniciadores S1/AS1 el buffer que se empleó fue el No.5 (10mM tris, pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂ y 25 mM KCl) y 5% de formamida. Para llevar acabo la PCR con los *primers* S2/AS2 se empleó el buffer 10 (100 mM Tris, pH 9.2, 1.5 MgCl₂ y 75 mM KCl). Los productos de PCR con los primers específicos C9 y C4 fueron subclonados dentro del sitio EcoR-V de Bluescript.

Las clonas con el cassette B no se identifico en ninguno de los DNAC obtenidos. Así que se clonó de la corteza renal por RT-PCR, usando un par de *primers* que amplificaron los nucleótidos 746-996 de C9. Los productos de PCR fueron subclonados dentro del sitio de restricción Eco RV del vector pBluescript y analizados rápidamente (*screened*) by PCR con un primer sentido (primer S3) específico para el cassette A; tres clonas que no tenían el cassette A fueron secuenciadas en ambas direcciones.

Para determinar si el empalme alternativo del cassette de los tres exones de la región 5' ocurre independientemente del empalme que genera el extremo 3' de C9 y C4, se realizaron RT-PCR con *primers* sentido que identifican el cassette de exones y *primers* antisentido que se anida en la región 3' terminal de C4. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo como se describió anteriormente, con excepción a que se utiliza la polimerasa *Taq extender* (Stratagene) y el producto de la RT tratado con poly(A) (20ng/reacción de PCR) se utilizo como templete y los tiempos de amplificación se incrementaron a 1.5 min. Los *primers* que se utilizaron para cada exón del cassette fueron:

S3; específico para el exón A 5'-CATGGTAACCTCTATCACGGG-3'

S4; específico para el exón B 5'-GTGTGATTATCATCGGCTTAGC-3'

S5; específico para el exón F 5'-ATCATCATTGGCCTGAGCG-3'

El primer AS2 se utilizó como primer antisentido específico para C9. Los productos de PCR que se generan con este juego de primer es de 1.7 kb. Para amplificar a C4 se utilizó otro primer que anida más cerca de la región 5' de C4 que el primer AS1, ya que con este se obtenian productos muy pequeños.

AS3; específico para C4 5' CCATGGGTATCTTCTGTGCC-3'

Los productos de PCR que se obtuvieron con el juego de *primers* específicos para cada isoforma (A,B y F) y el de C4 (AS3) generaron productos de 1.6 kb. Las

condiciones del buffer para la PCR se optimizaron con los DNAs que se aislaron para los estudios de expresión funcional. La PCR con el par de *primers* S4/AS3 se optimizó con el buffer 5 de Stragene (ver atrás). El buffer óptimo para la PCR con los pares de *primers* S5/AS3 y S4/AS2 fue el buffer 9 (10 mM Tris, pH de 9.2, 1.5mM de MgCl₂ y 25 mM de KCl) y par los *primers* S3/AS2 fue el buffer 10. Para realizar la PCR con los pares de *primers* S4/AS3, S5/AS3 y S4/AS2 se adicionó 5% de formamida a la reacción. Las bandas amplificadas con RT-PCR fueron subclonadas en el sitio Eco RV del vector pBluescript.

3.- Caracterización de las proteínas de CSB1m.

1µg de DNA linearizado (CSB1-4A y CSB1m-9F) fue traducido *in vitro* usando lisado de reticulocitos de conejo junto con la RNA polimerasa T7 (TNT T7, promega) y [³⁵S] metionina por 1h a 30 °C. Las proteínas fueron corridas en un gel de SDS-PAGE (10% polyacryl-amida) junto con marcador de proteínas de bajo y alto peso molecular (Bio-Rad, Hercules, CA).

Además se realizó un análisis de Western blot con proteínas de membrana de médula externa empleando anticuerpos específicos para cada empalme alternativo de la región carboxiterminal (CSB1m-9 y CSB1m-4). Para identificar a C9 se utilizó el anticuerpo específico de CSBr contra un fragmento de la región carboxi terminal (834-900 aminoácidos) previamente caracterizado¹⁵⁴, el fragmento proteico que reconoce el anticuerpo presenta 94% de homología entre C9 y CSB1r¹⁵⁴ y no esta presente en la proteína C4. El anticuerpo específico para C4 se generó por inmunización de conejos con un péptido acetil-CGTEDTHGNRKEKKR (aminoácidos 735-749 de CSBm1-4)) purificada por HPLC. Este péptido es único para C4 y no presenta ninguna homología con alguna otra proteína de la base de datos de proteínas BLAST search. Para el aislamiento de las proteínas de membrana, fueron disecados y homogenizados riñones de ratón (CD1 y C57Bl/6J) en 9 volúmenes de buffer para homogenizados (0.32 mM de sacarosa, 5mM Tris y 2 mM EDTA, pH7.5 más inhibidores de proteasas) en frío (4°C), los homogenados se centrifugan a 3,000g por 10 min. El sobrenadante fue subsecuentemente centrifugado a 100,000g a 4°C por 30 min, después se

resuspendió el botón con el buffer de homeganización. Las proteínas de membrana fueron corridas en un gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS al 6% y transferidas a una membrana de difluoro-polivinilideno en 25 mMTris-HCl, 192 mM de glicina y 25% de metanol. Se realizó el análisis de Western blot con los anticuerpos antes descritos y el complejo antígeno-anticuerpo se visualizó empleando una técnica de quimioluminiscencia (ECL System, Amersham Life Science).

4.- Inmunofluorescencia.

Los riñones de los ratones (CD-1 y C57BL/6J) fueron procesados para el análisis de inmunofluorescencia de la siguiente manera. Para identificar C4 se utilizaron anticuerpos fluorescentes específicos para esta proteína en tejido renal profundido con PBS y 4% de paraformaldehído. Los tejidos disecados fueron tratados con 2% de Triton X-100 (para el análisis con el anticuerpo contra C4) y 1% de SDS (para el análisis con el anticuerpo contra C9) en PBS durante 5 minutos para exponer los sitios en donde se encuentra el antígeno. Los tejidos disecados fueron incubados en 1% de BSA/PBS/ 4% Seablock (Searun Holdings Arudel, ME) por 30 minutos a temperatura ambiente. Con suave agitación son incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-C4 (1:100) o con el anticuerpo anti-C9 (1:2,000) diluido en 15 BSA/PBS/4%SeaBlock. Los cortes fueron lavados con PBS/2.8% NaCl de un lavado con PBS, después fueron incubados con un anticuerpo anti-conjugado Alexa 594(1,2,000), después los cortes fueron lavados nuevamente con PBS/ NaCl 2.8% y montados con el medio de montaje Vectashiel (Vector Labs, Burlingame) diluido en partes iguales con 0.3M Tris a pH= 8.8. Las preparaciones se examinaron en un microscopio Nikon Eclipse 800 y las imágenes se generaron usando un sistema para imágenes de video Optronics(OEI-750) e impresas en una impresora de color Tektronix Phaser 450.

5.-Inmunohistoquímica.

Los cortes de riñones después del lavado de bloqueo con 1%BSA/PBS/4% SeaBlock fueron tratados con avidina-biotina por 30 minutos a temperatura

ambiente usando un kit de Vector Labs, el anticuerpo se agregó una noche anterior y se incubó a 4°C. Después de la incubación con avidina-biotina se lavaron los cortes a temperatura ambiente con PBS/2.8% de NaCl, seguidos de un lavado con PBS, después se incubaron con el anticuerpo biotinilado (1:200) para conejo. Los cortes fueron incubados con Vectastain ABC peroxidasa por 1h seguida de dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Las muestras fueron reveladas con el kit Vector sustrato de diaminobenzina y montadas con Aquapolymount (Polysciences, Warrington, PA). Las preparaciones se examinaron en un microscopio Nikon Eclipse 800 y las imágenes se generaron usando un sistema para imágenes de video Optronics(OEI-750) e impresas en una impresora de color Tektronix Phaser 450.

6.- Localización cromosómica y caracterización genómica de las clonas

Se utilizaron primer de la región 3' no transcrita (UTR) del DNAC de C9 para realizar el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena única (SSCP) entre las cepas de ratones.

Con el par de primers S65'-GGTATTAACCCATGCTTTACAG-3' y AS4 5'-GGCATATGTTGACTCTTTGGG-3' se amplifican los nucleótidos 4359-4546 del CSB1m-9F para identificar polimorfismos entre las cepas de ratones C57BL/6J y C3H/FeJ, a partir del DNA de una serie de ratones consanguíneos.

Para determinar el empalme alternativo de exones de la región 3' terminal de C4, se caracterizó el segmento genómico correspondiente al gen CSB1. Tres fragmentos de PCR, que se sobrelapan, fueron generados del DNA genómico que codifica el exón que da origen a la región 3' de C4, así como los dos intrones que lo flanquean. Los tres fragmentos fueron subclonados en el sitio Eco R V de pBluescrip y secuenciados. El exón de la región 3' de C4 también fue secuenciado y las uniones intrón/exón, este procedimiento se realizó en ambas cepas de ratones.

7.- Generación de DNAc y RNAc de CSBm1 para los análisis de expresión funcional.

Las isoformas aisladas de la genoteca de la médula externa del riñón de ratón fueron CSBm1-4A y CSBm1-9F, a partir de estas se obtuvieron las isoformas CSBm1-4F y CSBm1-9A intercambiando los cassettes A y F, empleando las enzimas de restricción con sitio único en las clonas Nsi I (en los nucleótidos 752 de CSBm1-4A y 730 de CSBm1-9F) y Bsm I (nucleótidos 1837 de CSBm1-4A y 1859 de CSBm1-9F). Las isoformas con el cassette B se generaron a partir de la amplificación del cassette B con PCR (318 nucleótidos). Los productos de la reacción fueron digeridos con las enzimas Nsi I y Afl I (que corta a CSBm1-4A en el nucleótido 1049) y ligados en los mismos sitios de CSBm1-4A, se secuenciaron los DNAc, entre los sitios de restricción antes señalados para verificar la fidelidad de la PCR. Para formar a la isoforma CSBm1-9B se genero a partir de inserción del cassette B en los sitios de restricción Bsm I y Nsi I del DNAc de CSBm1-9F. Todas las isoformas se encuentran insertadas en el vector pSPORT 1. Para realizar el estudio en la función de los cotransportadores del polimorfismo CCC-CAC (prolina-histidina) que identificado en el exón 11, se intercambio este segmento de CSBm1-9A, CSBm1-9B y CSBm1-9F por el de CSBm1-4A, cortando los sitios de restricción Nsi I y Kpn I este último se localiza en el sitio 5' de multiplecorte de pSPORT 1.

Se transformaron células E. Coli DH5 α con los diferentes DNAc de los CSBm1-4 y CSBm1-9 (insertados en pSPORT), las bacterias fueron sembradas en el medio LB para obtener y aislar una buena cantidad del DNA plasmídico con la técnica Mediprep o Maxiprep (ver metodología de expresión funcional). Después de obtener el DNAc plasmídico se digiere con la enzima de restricción Xba I (ver metodología de expresión funcional) para linearizar al DNAc de forma direccional (3'→5') para sintetizar RNAc con la polimeraza T7. El RNAc es sintetizado con la técnica de transcripción *in vitro* con alguna de las metodologías descritas en metodología. Se valora la calidad y cantidad del RNAc sintetizado corriendo 1-2 μ l de muestra en un gel de agarosa al 1%(ver metodología de preparación de geles) con la finalidad de valorar su integridad. En el gel se debe de observar bandas de

≈ 4.5 Kb si se corre el RNAc de la isoforma C9 y ≈3 Kb si es el RNAc de C4, la cantidad del RNAc se calcula con la lectura obtenida de una dilución 1/250 de la muestra con agua (2μl de RNAc/ 498 de H₂O) en un espectro de absorbancia en la longitud de onda de 260λ, considerando que 1 densidad óptica equivale a 50 mg de RNA, se realizan los cálculos convenientes para calcular la cantidad de RNAc obtenido. La pureza del material se obtiene con la relación 260λ/280λ. una relación mayor de 0.7 se consideró como RNA de buena calidad.

8.- Expresión funcional.

El RNAc obtenido se inyecta en los ovocitos de *Xenopus laevis* (Carolina Biological Suply, Buelington, NC y Nasco, Atkinson, MI) seperados y desfuliculados (ver metodología de preparación de ovocitos). A cada ovocito se le inyecta aproximadamente 25ng/ovocito de RNAc. Los ovocitos inyectados son incubados durante cuatro días en ND96+Gentamicina+ piruvato (ver metodología de preparación de ovocitos) para la traducción del RNAc inyectado.

La expresión funcional de las isoformas CSBm1 se llevó a cabo con los isótopos radioactivos ²²Na⁺ o ⁸⁶Rb⁺ (ver metodología de captaciones), para cada grupo experimental se emplearon de 20 a 30 ovocitos, sometidos en un periodo de 40 minutos (soluciones 100m Osm/Kg) o 60 min (soluciones 200-150 mOsm/Kg) en soluciones de precaptación (ver preparación de soluciones) y de 30min a 1 h en soluciones de captación con 2.5 μCu/ml de ²²Na⁺ y 10 μCu/ml ⁸⁶Rb⁺ sometiendo a cada grupo a diferentes condiciones experimentales. Los ovocitos fueron lavados en solución de captación fría (sin ²²Na⁺ o ⁸⁶Rb⁺ y a 4 °C), después que cada ovocito se colocó en los viales con SDS 10% y líquido de centelleo, se contó cada vial en un contador de radiaciones β (Beckman 2100) previamente programados para los isotopos ²²Na⁺ o ⁸⁶Rb⁺. Se realizó un análisis estadístico con las CPM (cuentas por minuto) previamente transformadas a pmol/ovocito/h de ²²Na⁺ y de ⁸⁶Rb⁺ de cada ovocito contado. La significancia estadística esta definida con una p< 0.05, los resultados están representados en barras que representan el promedio de la captación de los 20-30 ovocitos de cada grupo ± el error estándar. La significancia de las diferencias entre cada grupo se realizó con estudios de

ANOVA de una vía y de múltiple comparación con las pruebas de corrección de Benferroni o con el análisis de varianza por rangos de una vía de Kruskal-Wallis con el proceso de múltiple comparación por el método de Dunn, si era necesario.

METODOLOGÍA (Expresión funcional)

Preparación de células competentes mediante cloruro de rubidio

Soluciones:

- A. 10 mM MOPS, pH 7.0
10 mM Cloruro de Rubidio

- B. 100 mM MOPS, pH 6.5
50 mM Cloruro de Calcio
10 mM Cloruro de Rubidio

Medio LB

10g de triptona-B
5g de extracto de levadura
10g de NaCl

1. Preparar las soluciones A y B un día antes de iniciar la preparación las células competentes y filtrarlas antes de usarlas.
2. Inocular 5 ml de medio LB con una colonia bacteriana (DH5 α , etc.) o con 10 μ l del stock de glicerol. Incubar toda la noche a 37°C con agitación constante (~125 rpm).
3. Inocular 20 ml de medio LB con 200 μ l del cultivo bacteriano del paso 2.
4. Crecer las células hasta alcanzar un valor O.D.₆₀₀ entre 0.3 – 0.5 (~ 2 a 3 hrs a 37°C, ~125 rpm).
5. Centrifugar las células por 5 min a 4,000 rpm a 4°C en un tubo estéril.
6. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de solución A (fría sobre hielo). Llevar las células a un volumen final de 10 ml con la solución A. Centrifugar las células por 5 min a 4,000 rpm a 4°C.
7. Decantar el sobrenadante. Resuspender las células en 1 ml de solución B (fría sobre hielo) y llevar las células a un volumen final de 10 ml con solución B.
8. Incubar en hielo por 30 min. Centrifugar las células por 5 min a 4,000 rpm a 4°C.
9. Decantar el sobrenadante y secar el tubo perfectamente. Muy suavemente resuspender las células en 2 ml de solución B.
10. Hacer alicuotas de las células de 200 μ l y agregar 10% de glicerol (estéril) 20 μ l. Congelar a las células en hielo seco y guardar a – 80°C (estables de 5 a 6 semanas).

Protocolo de transformación de células competentes.

1. Se toman 50 μ l de células competentes con cloruro de rubidio y se colocan en un tubo ependorf de 1.5 ml.
2. Se agrega 1 μ l de DNA (vector-clona) a una concentración de 50 ng/ μ l
3. Se incuban 30 minutos en hielo (4 °C)
4. Incubar a 42 °C durante 80-90 segundos
5. Incubar en hielo 2 minutos.
6. Agregar 400 μ l de medio LB estéril sin ampicilina
7. Incubar a 37 °C a 225 rpm durante 1h
8. Vaciar todo el contenido de tubo en una caja petri con LB agar con ampicilina (100 μ g/ml).
9. Incubar toda la noche a 37 °C.
10. Las colonias obtenidas se siembran en medio LB con ampicilina, se extrae el plásmido con la técnica de Gene-Clean (miniprep) para mapear la clona con enzimas de restricción. Corroborada la secuencia de la clona deseada se prepara una buena cantidad de DNAC para la síntesis *in vitro* del RNAC con la técnica de Maxi-Prep.

Gene-Clean (Miniprep)

1. Tomar 1 ml de cultivo bacteriano y centrifugarlo en una pico fuga a 10 000 rpm.
2. Tirar el sobrenadante y resuspender con agitación en el vortex
3. Agregar 100 μ l de solución I. Agitar bien pero sin el vortex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente
4. Agregar 200 μ l de solución II, mezclar por inversión e incubar 5 minutos en hielo.
5. Centrifugar 10' en frio, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Agregar 1 ml de etanol 100% (temperatura ambiente) incubar 2 minutos a TA.
7. Centrifugar 5min
8. Sacar todo el sobrenadante y secar 3 min al vacio.
9. Resuspender el precipitado en 100 μ l H₂O grado biología molecular.
10. Agregar 2.5 volúmenes (250 μ l) de NaI 6 M y 5 ml de sílica.
11. Agitar en vortex e incubar 15 minutos a temperatura ambiente agitando la muestra cada 2 minutos.
12. Centrifugar por 1 minuto y tirar el sobrenadante.
13. Lavar 2 veces con 500 μ l y una vez con 300 μ l de *New solution* en cada lavado se vortexea y se centrifuga 30 segundos tirando el sobrenadante.
14. Tirar todo el sobrenadante, secar ligeramente al vacio.
15. Agregar 20 μ l de H₂O biología molecular, incubar 5 minutos a 50-55 °C
16. Centrifugar por 1 minuto a temperatura ambiente y transferir los 20 μ l del sobrenadante a otro tubo.
17. Centrifugar nuevamente unos segundos y juntar todo en un tubo nuevo, guardar el producto a -20 °C

Solución I

5ml glucosa 1M
 2ml EDTA 0.5 M
 2.5ml Tris 1M a pH8
 90 ml H₂O

esterilizar la solución por filtración.

Solución II

Preparar en fresco
 1ml SDS al 10%
 7ml H₂O BM

Solución III

29.45 g Acetato de amonio
 11.5 ml ácido acético glacial
 88.5ml H₂O.

esterilizar la solución por filtración.

MAXI-PREP.

1. Se crecen la cepa de *E. coli* DH5 α , transformadas con la clona deseada (C9 o C4) en 2ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/ml.
2. Los 2 ml se sembraron en 500 en medio LB- Ampicilina 100 μ g/ml durante toda la noche a 250 rpm para acondicionar un medio aerobio.
3. Centrifugar los medios cultivados en ultracentrifuga en frascos de Beekman de 500 ml a una velocidad de 8000 rpm a 4°C durante 10 min (rotor JA-10.)
4. Tirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 15 ml de solución de resuspensión de las células (Solución I). Ayudarse con un palillo de 12 pulgadas para resuspender el pellet y una buena agitación. Es importante que esté muy bien resuspendido para obtener la mayor cantidad de plásmido.
5. Adicionar 15 ml de solución de lisis (Solución II) y mezclar por inversión. Evitar la agitación drástica con el vortex . La lisis de las células se completa cuando la solución comienza a verse viscosa ~ 20 min de incubación (todo el procedimiento es en hielo).
6. Adicionar 15 ml de solución de neutralización e inmediatamente mezclar por inversión varias veces.
7. Centrifugar a 8000 rpm durante 15 min a 4°C.
8. Filtrar el sobrenadante en un filtro Miracloth o en papel filtro Whatman No. 1 GFA o GFC en un frasco graduado para medir el volumen.
9. Transferir el sobrenadante dentro de frascos de centrifuga.
10. Adicionar 0.5 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y mezclar por inversión.
11. Centrifugar a 8000 rpm por 15 min a 22 – 25 °C
12. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet de DNA en 2 ml de buffer TE. En este paso puede ser que no se observe el pellet.

Purificación del plásmido.

Se requiere una fuente de vacío para llevar a cabo el procedimiento.

1. Adicionar a la solución que contiene el DNA bacteriano 10 ml de resina de purificación de DNA Maxi-preps Wizard.(promega)
2. Para cada maxi-prep usar una maxi columna Wizard. Insertar la punta de la maxi -columna en la fuente de vacío.
3. Transferir la mezcla DNA/resina dentro de la columna. Aplicar el vacío para comprimir la mezcla en la maxi-columna.
4. Cuando se haya transferido toda la mezcla DNA/resina en la maxi-columna, adicionar 13 ml de solución de lavado de columna en la botella que contenía la mezcla DNA/resina. Homogeneizar y rápidamente vaciarlo en la maxi-columna.
5. Aplicar vacío para drenar la solución de lavado en la maxi-columna.
6. Adicionar nuevamente 12 ml de solución de lavado en la maxi-columna y aplicar vacío para drenar la solución de lavado.
7. Adicionar 5 ml de etanol 80% a la maxi-columna y aplicar vacío para drenar el etanol.
8. Secar con vacío ~1 min.
9. Colocar la maxi columna en un tubo de 50 ml y centrifugar a 2500 rpm durante 5 min.
10. Remover la maxi-columna y descartar tanto el tubo como el líquido. Colocar la columna en la fuente de vacío para residuos y secar la resina drenando durante 5 min. Sacar la columna de la fuente de vacío y colocarla en otro tubo de 50 ml.
11. Colocar 1.5 ml de agua BM o buffer TE (precalentado a 65 – 70 °C) en la columna y esperar 1 min. Eluir el DNA por centrifugación a 2500 rpm durante 5 min.
12. Eliminar la columna y el DNA plasmídico se guarda a –20 °C.
13. Leer el DNA en el espectrofotómetro para conocer la cantidad obtenida.
14. Para corroborar que el DNA obtenido es el deseado realizar un mapa de restricción.

Para realizar la transcripción *in vitro* de RNAc de las clonas que se emplearon en este trabajo previamente se linearizaron con la enzima Xba I que se encuentra en la región 3' de las diferentes clonas, lo que permite tener la región de la T7 polimerasa disponible para sintetizar el RNAc. Tanto las clonas C9 como las C4 se encuentran insertadas en el plásmido pSPORT entre Not I y Sal I con la dirección 3'→5' respectivamente.

Técnica para cortar DNAc con enzimas de restricción.

1. Agregar 1-2 µg de DNAc en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml.
2. 3 µl del buffer 10X de la enzima correspondiente.
3. Antes de agregar la enzima es importante aforar la reacción a 30 µl, contando el volumen que ocupará la enzima. Si no se realiza esto se corre el riesgo de que la enzima se desnaturalice. Las enzimas de restricción se conservan en

50% de glicerol y para que la reacción se lleve a cabo en la reacción debe de tener menos del 10% de glicerol, por lo tanto en términos generales por cada μl de enzima se agrega $10 \mu\text{l}$ de reacción.

4. Agregar $2 \mu\text{l}$ de enzima (20U).
5. Incubar 1h o más a 37°C en caso de XbaI. Los tiempos y temperaturas de incubación varían del tipo de enzima que se emplee para la digestión.
6. Agregar $70 \mu\text{l}$ de agua biología molecular y realizar una extracción con fenol/(cloroformo- alcohol isoamílico (24:1)) en una reacción 1:1 con respecto a la muestra.
7. Tomar la parte acuosa, que se encuentra en la fase superior de la extracción $\approx 95 \mu\text{l}$, tratando de no tomar la fase orgánica.
8. A la fase acuosa recuperada se le agrega $45 \mu\text{l}$ de acetato de amonio y 3 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el DNAc linearizado.
9. Guardar mínimo 2h en el refrigerador de -20°C .
10. Centrifugar durante 30 minutos en frío (4°C) en una ultramicrocentrifuga a 14000 rpm.
11. Separar la fase orgánica del precipitado con una micropipeta de $1000 \mu\text{l}$ con mucho cuidado procurando no tocar el fondo del tubo.
12. Realizar un lavado con etanol al 70%.
13. Centrifugar nuevamente durante 15 minutos en frío (4°C) en una ultramicrocentrifuga a 14000 rpm.
14. Separar la fase orgánica del precipitado con una micropipeta de $1000 \mu\text{l}$ con mucho cuidado procurando no tocar el fondo del tubo.
15. Secar el precipitado en un leofilizador automático.
16. Agregar agua biología molecular aproximadamente de 6-10 μl dependiendo de la técnica que se emplee para la síntesis del RNAc.

Durante la elaboración del presente trabajo se realizaron cinco tipos de técnicas para la síntesis de RNAc *in vitro* para estandarizar la técnica, las cuatro técnicas son muy eficientes aunque varían en el costo y calidad dependiendo del kit que se emplee. Por lo que la técnica que actualmente utilizamos en el laboratorio es mMessage mMachinE T7 de Ambion que ha resultado ser un Kit de muy buena calidad aunque su costo es relativamente más elevado que el resto de las técnicas. Las cinco técnicas se describen con detalle más adelante.

Todo el trabajo debe realizarse bajo condiciones libres de RNAsas. El material que se utilice debe ser nuevo, limpio y esteril.

1.- Transcripción *in vitro* de RNA complementario con RNA polimerasa.

En un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml agregar los siguientes reactivos

1. $10 \mu\text{l}$ del template de DNA previamente linearizado (1-3 μg)
2. $10 \mu\text{l}$ de buffer de transcripción (Stratagene)
3. $2 \mu\text{l}$ de mezcla de rNTPs (10 mM de rATP, rCTP, rUTP y 1mM de rGTP)
4. $1 \mu\text{l}$ de CAP ($m^7\text{G}(5')\text{ppp}(5') \text{G}$) (10nM).

5. 3.75 μl de *dithiothreitol* (DTT).
6. 0.25 μl de T7 RNA polimerasa (25U).
7. Aforar la mezcla a un volumen de 50 μl antes de agregar la enzima RNA polimerasa
8. Incubar 10 minutos a 37°C.
9. Agregar 0.5 μl de rGTP (10mM).
10. Incubar 10 min a 37 °C.
11. Agregar 0.5 μl de rGTP (10mM).
12. Incubar 10 min a 37°C.
13. Agregar 100 μl de agua HPLC. o tratada con DEPC
14. Extraer con fenol-cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1) en una reacción 1:1 con respecto a la muestra.
15. Centrifugar 3 min a 13000 rpm en frío (4 °C) .
16. Tomar \approx 145 μl de la parte acuosa de la mezcla de extracción (el resto se desecha).
17. Precipitar con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2.
18. Agregar 3 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C
19. Guardar a 20 °C durante toda la noche.
20. Se centrifuga el RNAc durante 30 min. a 13000 rpm se elimina todo lo que se pueda de etanol (dejar aproximadamente 100 μl).
21. Se lava con etanol al 70 % (20 °C) con \approx 500 μl .
22. Retirar el etanol liofilizar la muestra.

2.- Síntesis de RNAc *in vitro* con la técnica de Boehringer Mannheim.

En un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml agregar los siguientes reactivos:

1. 10 μl templete de DNA previamente linearizado (1-3 μg).
2. 2 μl de buffer suplementado 10X (0.4 Tris-HCl, pH=8 (20°C), 60mM MgCl₂ 100 mM de DTT, 20 mM de espermidina)
3. 2 μl de mezcla de rNTPs (10 mM de rATP, rCTP, rUTP, rGTP)
4. 1 μl de CAP (m⁷G(5')ppp(5') G) (10nM).
5. 2 μl de inhibidor de RNAsa
6. 2 μl de enzima RNA polimeras T7 (40U)
7. Aforar la reacción a 20 μl .
8. Incubar la mezcla de reacción a 37 °C durante 1h.
9. Para detener la reacción se adiciona 2 μl de EDTA (0.2M, pH=8) y/o calentar la reacción a 65 °C. (opcional)
10. El DNAc se remueve con 20U de DNAsa I libre de RNAsa, se incuba durante 15 minutos a 37 °C.
11. Se afora la reacción a 100 μl y se continua con el paso 14 de la técnica 1 de la síntesis *in vitro* del RNA.

3.- Protocolo de Maniatis para la síntesis de RNAc *in vitro*.

Agregar los siguientes componentes a temperatura ambiente en el orden señalado en un tubo para microcentrifuga de 1.5ml.

1. 1-5 μg del templete de DNAc en un volumen menor de 5 μl .
2. 5 μl de DTT (100mM)
3. 2.5 μl suero de albumina bovina (2.5mg/ml).
4. 2.5 μl de mezcla de ribonucleótidos 5mM (rATP, rUTP, rCTP)
5. 2.5 μl de rGTP.
6. 5 μl de análogo de CAP (mGpppG) 0.5mM.
7. 5 μl de buffer de transcripción 10X (Tris-HCl 400mM pH=7.5 a 37°C, 60 mM MgCl_2 , 20 mM de espermidina, 50 mM de NaCl).
8. 2 μl de inhibidor de RNAsas.
9. 1.5 μl RNA polimerasa (10-15 U/ μl).
10. Mezclar los reactivos con un gentil movimiento del tubo tratando de no producir burbujas, si es necesario se centrifuga para eliminarlas.
11. Se incuba la reacción durante 1h. a 37 °C.
12. Se elimina el templete de DNAc con 20U de DNAsa I libre de RNAsa, se incuba durante 15 minutos a 37 °C.
13. Se afora la reacción a 100 μl y se continua con el paso 14 de la técnica 1 de la síntesis *in vitro* del RNA.

4.- Síntesis de RNAc con la técnica de CAP SCRIBE T7 de Lakeside.

En un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml agregar los siguientes reactivos:

1. 4 μl del buffer 5X del Kit Cap-Scribe.
1. 10 μl DNAc linearizado (1-2 μg).
2. 1 μl DTT.
3. 1 μl de inhibidor de las RNAsas.
4. 1 μl de H₂O grado biología molecular.
5. 2 μl T7 RNA polimerasa (20 U/ μl).
6. Centrifugar brevemente e incubar a 37 °C durante una 1h.
7. Adicionar 2 μl de 0.2M EDTA, pH=8 y colocarlo en el hielo para detener la reacción.
8. Agregar 14 μl de acetato de amonio y 100 μl de etanol absoluto frío (4°C)
9. Incubar la reacción a temperatura ambiente por 30 min.
10. Centrifugar y lavar el botón con etanol al 70% frío y centrifugar nuevamente.
11. Secar el botón y disolverlo en 25 μl de agua esteril libre de RNAsas.
12. Alicuotizar el RNA y almacenar a -70 °C.

5.- Síntesis de RNAc *in vitro* con el kit mMESSAGE mMACHINE T7 de Ambion.

1. A 15µl de cDNA (1- 2 µg) linearizado añadir los siguientes componentes que vienen en el kit:
 - 2µl de buffer 10x de transcripción
 - 10µl de la mezcla 2x de ribonucleótidos
 - 1µl de GTP
 - 2µl de la mezcla 10x de enzima T7
2. Incubar durante dos horas a 37°C
3. Agregar 1µl de DNAsa libre de RNAsas
4. Incubar durante 15 min a 37°C
5. Agregar 115µl de agua del kit y 15µl de acetato de amonio, agitar en el vortex (el volumen final es de 150µl)
6. Extraer en fenol-cloroformo, agitar en el vortex y centrifugar
7. Precipitar con 150µl de isopropanol e incubar a -20°C una noche
8. Centrifugar 20 min a 4°C
9. Lavar con etanol 80% frío y centrifugar 5 min a 4°C
10. Quitar el exceso de etanol y liofilizar ~ 1 min
11. Resuspender en 20µl Tris 1mM

Preparación de fenol saturado.

1. Fundir el fenol en baño María a 65 °C.
2. Agregar 20 ml de fenol fundido y 20 ml de una solución Tris 0.5 M a pH=8.0 en un vaso de precipitados de 100ml, agitar durante 15 minutos con un magneto horneado previamente en un agitador magnético, tapado completamente el vaso para precipitados con papel para aislarlo de la luz y evitar la descomposición del fenol. Para evitar la oxidación del fenol se agrega 0.1% de hidroxiquinoleína.
3. Detener el agitador durante 15 minutos para permitir que la fase orgánica se separe de la acuosa.
4. Extraer la fase superior que es el Tris (fase acuosa) con una pipeta volumétrica de 10ml con mucho cuidado evitando tomar el fenol (fase orgánica).
5. Agregar 20 ml de Tris 0.1M a pH=8 al fenol, agitar nuevamente durante 15 minutos.
6. Retirar el Tris como lo indican los pasos 3 y 4.
7. Agregar 2 ml de tris 0.1M a pH=8.
8. Guardar el fenol a 4 °C.

Por lo general el fenol permanece estable durante un mes después empieza a decaer su eficacia.

Preparación de gel de agarosa al 1% para muestras de DNA.

1. Pesar 0.4g de agarosa y agregar 40 ml de TAE 1X

2. Calentar la mezcla durante 50 segundos en el horno de microondas para disolver la agarosa.
3. Vaciar la agarosa cuando este una temperatura promedio de 50 °C en la cámara de electroforesis previamente preparada con el peine y artefactos necesarios para preparar el gel.
4. Cuando se haya solidificado la agarosa se retira el peine de la caja de electroforesis y se llena con el buffer TAE 1X.
5. Se cargan los pozos con 8 μ l de la muestra previamente preparada con el buffer de carga.
6. Se conectan los electrodos de manera tal que el polo negativo siempre quede en la parte superior del gel y el polo positivo en la parte inferior, para que las muestras corran a través del gel considerando que el DNA esta cargado negativamente por los grupos fosfato que tiene la molécula. El DNA se corre a 60 voltios.
7. Para teñir el gel se coloca en un recipiente que contenga 7 μ l bromuro de etidio (1mg/ml) en 200 ml. de agua durante 10 minutos, hay que tener mucha precaución en el manejo del bromuro de etidio ya que carcinogénico así que su manejo requiere estrictamente de guantes y bata. El gel se lava en agua durante 15 minutos y se observa en una lampara de luz U.V.

Preparación de las muestras de DNA.

- 1 μ l de muestra de DNA (1 μ g/ μ l).
- 9 μ l H₂O.
- 2.5 μ l buffer comercial para DNA (loading buffer).

Preparación de gel de agarosa para RNA.

1. Se pesa 0.4mg de agarosa y se agregan 34 ml de H₂O.
2. Calentar la mezcla durante 50 segundos en el horno de microondas para disolver la agarosa.
3. Cuando la agarosa disuelta llegue a 50 °C se agregan 4 ml de MOPS 10X y 2ml de Formaldehido.
4. Vaciar la agarosa en la caja de electroforesis, cuando se solidifique la agarosa se retira el peine de la caja de electroforesis y se llena con MOP 1X.
5. Se cargan los pozos con 8 μ l de la muestra previamente preparada con el buffer de carga.
6. Se conectan los electrodos de manera tal que el polo negativo siempre quede en la parte superior del gel y el polo positivo en la parte inferior, para que las muestras corran a través del gel considerando que el RNA esta cargado negativamente por los grupos fosfato que tiene la molécula. El RNA se corre a 75 voltios.

Preparación de las muestras de RNA.

Por cada μ l de muestra se agrega.

- 1 μ l de muestra (1 μ g/ μ l).
- 5 μ l de Formamida.

- 1µl de MOPS 10X
- 2µl de formaldehído.
- 1µl de loading buffer
- 0.15 µl de Bromuro de etidio.

Extracción y preparación de ovocitos de *Xenopus laevis*

- 1.- Anestesiarse una rana por inmersión en tricaina al 0.17% (ácido etil éster 3-aminobenzoico)
- 2.- Hacer una pequeña incisión en la parte inferior del abdomen.
- 3.- Exponer el ovario y cortar suficientes lóbulos para obtener los ovocitos necesarios, colocar los lóbulos en una caja petri con una solución hipotónica sin calcio suturar la herida incluyendo el peritoneo interno con seda de #5.
- 4.- Preparar una solución de colagenasa con una concentración de 2mg/ml con el medio ND96 sin calcio.
- 5.- Cortar los lóbulos en pequeños racimos y colocarlos en la solución de colagenasa, incubarlos durante una hora en agitación moderada.
- 6.- Eliminar la solución de colagenasa por decantación y hacer tres lavados con el medio ND 96 sin calcio a los ovocitos con una ligera agitación para eliminar los residuos de colagenasa, en esta operación se logran separar los ovocitos de los racimos.
- 7.- Examinar los ovocitos en un microscopio estereoscópico, seleccionar y eliminar los ovocitos que se hayan muerto con el tratamiento antes mencionado.
- 8.- Por lo general la mayoría de los ovocitos aunque se lograron separar conservaron la folicula, la cual debe ser retirada con unas pinzas muy finas bajo el microscopio estereoscópico.
- 9.- Incubar los ovocitos durante toda la noche a 18°C en ND96 con 2.5 mM de piruvato de sodio y 5mg/ml de gentamicina.
- 10.- Los ovocitos se inyectan 50nl con el RNAc de las clonas a estudiar (C9 ó C4) a una concentración de 50 µg/µl (25ng/ovocito) con un microinyector.
- 11.- Los ovocitos son incubados durante tres días en un medio de ND96 que contenga 2.5 mM de piruvato de sodio y 5 mg/ml de gentamicina y un día con una solución libre de cloro (isetionato de sodio), para permitir la transcripción del RNAc inyectado

Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAc de transcritos in vitro de las clonas C9, C4.

- 1.- En caja petri de 35 X 10 mm se incuba en cada pozo de 20-30 ovocitos durante 60 minutos en solución hipotónica (150 mOsm/Kg) o isosmótica (200 mOsm/Kg) o 40 minutos en soluciones 100 mOsm/Kg sin cloro ni potasio (Gluconatos ver solución de preincubación) con 1mM de ouabaina y 100 µM de amilorida con la finalidad de inhibir la actividad de la bomba de Na^+/K^+ y canales de Na^+ sensible a amilorida respectivamente. A los grupos de ovocitos control de bumetanida se adiciona al medio 100 µM de este diurético para evaluar la captación de $^{22}\text{Na}^+$ que es sensible a bumetanida. En esta parte también se incuban los ovocitos con las

diferentes drogas que se necesiten probar (AMPc, IBMx, H89, etc), las concentraciones empleadas están más adelante.

2.- Incubar por 60 minutos en la solución de captación con o sin iones (Cl^- y K^+) con osmolaridades de 150 y 200 mOsm/Kg o 30 minutos en soluciones con osmolaridad menor a 100 mOsm/Kg o. A estas soluciones se les agrega 1mM de ouabaina, 100 μM amilorida y si son grupos control 100 μM de bumetanida u otra droga para el estudio deseado, con 2.5 μCi de $^{22}\text{Na}^+$ a una temperatura de 37 °C

3.- Lavar cinco veces en la misma solución de captación correspondiente a cada osmolaridad empleada sin $^{22}\text{Na}^+$ y fría (4 °C)

4.- Transferir cada ovocito con una pipeta pasteur a tubos de centelleo con 350 μl de SDS al 10%. Asegurar que el ovocito sea lisado por el SDS.

5.- Agregar 3.0 ml de líquido de centelleo y contar las emisiones de cada tubo en un contador (para conocer la actividad específica en cada grupo preparar tres alícuotas con 10 μl de líquido de captación cada una.

Concentración de las drogas a utilizarse:

DROGA	[inicial]	PM	PREPARAR EN DMSO
Ouabaina	10^{-1}	728.8	22 mg/300 μl
Bumetanida	10^{-2}	364.4	1.09 mg/300 μl
Amilorida	10^{-1}	266.1	2.66 mg/100 μl
Hidroclorotiazida	10^{-2}	297.7	1.0 mg/300 μl
Isobutirilmetilxantina (IBMX)	10^{-2}	222.3	2.22 mg/100 μl
N6-2 O Dibutiriladenosina			
3'-5'Monofosfato cíclico.	10^{-2}	491.4	50 mg/100 μl
H89	1.9×10^{-3}	519.3	1mg/1ml en H_2O / etanol (1:1)

Preparación de soluciones.

ND 96. (200 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
96	NaCl	1	96
2	KCl	1	2
1.8	CaCl_2	0.1	18
1	MgCl_2	0.33	3.3
5	HEPES	1	5

ND 96 sin calcio. (200 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
96	NaCl	1	96
2	KCl	1	2
1	MgCl ₂	0.33	3.3
5	HEPES	1	5

Isetionato de sodio. (200 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar 500 ml de solución.
96	Isetionato de sodio	polvo	7.9 gr
2	Gluconato de K ⁺	1	1
1.8	Gluconato de Mg ⁺	.5	1
1	Gluconato de Ca ²⁺	.1	9
5	HEPES	1	2.5

Solución de captación completa. (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
62	NaCl	1	62
10	KCl	1	10
1.8	CaCl ₂	0.1	18
1	MgCl ₂	0.33	3.3
5	HEPES	1	5.0

Solución de captación sin Cl⁻ (gluconato) (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
62	Gluconato de Na ⁺	1	62
10	Gluconato de K ⁺	1	10
4.6	Gluconato de Ca ²⁺	0.1	46
1	Gluconato de Mg ²⁺	0.5	4
5	HEPES	1	5

Solución de captación sin K⁺ (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
62	NaCl	1	62
10	NMD-Cl	1	10
1.8	CaCl ₂	0.1	18
1	MgCl ₂	0.33	3.3
5	HEPES	1	5.0

Solución hipotónica sin Cl⁻ ni K⁺ (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
75	Gluconato de Na ⁺	1	62
4.6	Gluconato de Ca ²⁺	0.1	46
1	Gluconato de Mg ²⁺	0.5	4
5	HEPES	1	5

Agustar las soluciones a pH= 7.4 con NaOH

Solución de captación completa. (70-200 mOsmolar) para hacer los estudios de efecto de la tonicidad en el transporte se utilizó como base la siguiente solución y la osmolaridad se ajusto variando la concentración de sacarosa.

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
25	NaCl	1	25
3	KCl	1	3
1.8	CaCl ₂	0.1	18
1	MgCl ₂	0.33	3.3
5	HEPES	1	5.0
0,10,20,30,40,80,130	sacarosa	1	0, 10, 20, 30, 40, 80, 130

Solución de captación sin Cl⁻ (gluconato) (70 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
25	Gluconato de Na ⁺	1	25
3	Gluconato de K ⁺	1	3
4.6	Gluconato de Ca ²⁺	0.1	46
1	Gluconato de Mg ²⁺	0.5	4
5	HEPES	1	5

Solución de captación sin K⁺ (70 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
25	NaCl	1	25
3	NMD-Cl	1	3
1.8	CaCl ₂	0.1	18
1	MgCl ₂	0.33	3.3
5	HEPES	1	5.0

Solución hipotónica sin Cl⁻ ni K⁺ (70-200 mOsmolar) solución de precaptación

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
25	Gluconato de Na ⁺	1	25
6	Gluconato de Ca ²⁺	0.1	60
1	Gluconato de Mg ²⁺	0.5	4
5	HEPES	1	5
0,10,20,30,40,80,130	sacarosa	1	0, 10, 20, 30, 40, 80, 130

Agustar las soluciones a pH= 7.4 con NaOH

Captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAc de transcritos *in vitro* de las clonas C9, C4 u otras.

- 1.- Incubar los ovocitos durante 60 minutos en una solución hipotónica sin cloro y potasio con 1mM ouabaina, con 10 mM de bario para bloquear a los canales de K^+ .
- 2.- Lavar los ovocitos en la solución similar a la que se empleara para captación.
- 3.- Se colocan en la solución de captación completa o sin iones (Na^+ o Cl^-) con 1mM de ouabaina y 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^{86}\text{Rb}^+$
- 4.- Lavar los ovocitos cinco veces con la solución que se utiliza en la captación pero sin $^{86}\text{Rb}^+$ y a 4 °C.
- 5.- Transferir cada ovocito con una pipeta Pasteur a tubos de centelleo con 350 μl de SDS al 10%. Asegurar que el SDS rompa al ovocito.
- 6.- Agregar 1 ml de liquido de centelleo y contar las emisiones de cada tubo en un contador, para conocer la actividad especifica en cada grupo se preparan tres alícuotas con 10 μl de liquido de captación cada una.

Medio hipotónica sin Na^+ ni K^+ (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
75	NMDG-Cl	1	75
1.8	CaCl_2	0.1	18
1	MgCl_2	0.33	3.3
5	HEPES/Tris	1	5

Llevar la solución a pH=7.4 con NMDG-OH

Medio hipotónico para la captación de Rb^+ (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
58	NaCl	1	58
1.8	CaCl_2	0.1	18
1	MgCl_2	0.33	3.3
10	BaCl_2	1	10
2	KCl	1	2
5	HEPES	1	5

Medio hipotónico sin Cl⁻ (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
58	Gluconato de Na ⁺	1	58
1.8	Gluconato de Ca ²⁺	0.1	18
1.0	Gluconato de Mg ²⁺	0.33	3.3
10	Sulfato Ba ²⁺	1	10
2	Gluconato de K ⁺	1	2
5	HEPES/TRIS	1	5

Llevar las dos soluciones anteriores a un pH= 7.4 con NaOH.

Medio hipotónico sin Na⁺ (150 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
58	NMDG-Cl	1	58
1.8	CaCl ₂	0.1	18
1	MgCl ₂	0.33	3.3
2	KCl	1	2
10	BaCl ₂	1	10
5	HEPES	1	5

Llevar la solución a un pH= 7.4 con KOH (1M)

Medio hipotónico para la captación de Rb⁺ (70 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
25	NaCl	1	25
1.8	CaCl ₂	0.1	18
1	MgCl ₂	0.33	3.3
10	BaCl ₂	1	10
3	KCl	1	3
5	HEPES	1	5

Medio hipotónico sin Cl⁻ (70 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
25	Gluconato de Na ⁺	1	25
1.8	Gluconato de Ca ²⁺	0.1	18
1.0	Gluconato de Mg ²⁺	0.33	3.3
5	Sulfato Ba ²⁺	1	5
3	Gluconato de K ⁺	1	3
5	HEPES/TRIS	1	5

Llevar las dos soluciones anteriores a un pH= 7.4 con NaOH.

Medio hipotónico sin Na⁺ (70 mOsmolar)

CONCENTRACION (mM)	SAL	STOCK (M)	ml para preparar un litro de solución.
25	NMDG-Cl	1	25
1.8	CaCl ₂	0.1	18
1	MgCl ₂	0.33	3.3
3	KCl	1	3
5	BaCl ₂	1	5
5	HEPES	1	5

Llevar la solución a un pH= 7.4 con KOH (1M)

BIBLIOGRAFÍA

1. Gamba G. Biología molecular de la reabsorción renal de sodio. *Rev. Invest. Clin.* **44**, 545-562 (1992).
2. Koppenn B M and Stanton B A. *Renal Physiology*. (1997).
3. Guyton A y Hall J. *Textbook of Medical Physiology*. W B Saunders Company (ed.), pp. 349-365 USA, 1996).
4. de Wardener H E. The control of sodium excretion. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **235**, F163-F173 (1978).
5. Gamba,G. Molecular biology of distal nephron sodium transport mechanisms [clinical conference]. *Kidney Int.* **56**, 1606-1622 (1999).
6. Burg,M.B. Thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int.* **22**, 454-464 (1982).
7. Hebert S C. *Handbook of Physiology: Renal Physiology*. Windhager E E (ed.), pp. 875-925 (Oxford University Press, New York, 1992).
8. Imai,M., Taniguchi,J. & Tabei,K. Function of thin loops of Henle. *Kidney Int.* **31**, 565-579 (1987).
9. Takahashi,N. *et al.* Characterization of Na⁺ transport across the cell membranes of the ascending thin limb of Henle's loop. *Kidney Int.* **47**, 789-794 (1995).
10. Loffing,J. *et al.* Localization of epithelial sodium channel and aquaporin-2 in rabbit kidney cortex. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **278**, F530-F539 (2000).
11. Marsh,D.J. Solute and water flows in thin limbs of Henle's loop in the hamster kidney. *Am. J. Physiol* **218**, 824-831 (1970).
12. Kondo,Y. *et al.* Direct evidence for the absence of active Na⁺ reabsorption in hamster ascending thin limb of Henle's loop. *J. Clin. Invest* **91**, 5-11 (1993).
13. King,L.S. & Agre,P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Physiol* **58**, 619-648 (1996).
14. Hebert,S.C. Molecular mechanisms. *Semin. Nephrol.* **19**, 504-523 (1999).
15. Fushimi,K. *et al.* Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* **361**, 549-552 (1993).

16. Nielsen, S., DiGiovanni, S.R., Christensen, E.I., Knepper, M.A. & Harris, H.W. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 11663-11667 (1993).
17. Marples, D., Knepper, M.A., Christensen, E.I. & Nielsen, S. Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol* **269**, C655-C664 (1995).
18. Knepper, M.A. The aquaporin family of molecular water channels [comment]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 6255-6258 (1994).
19. Nielsen, S. & Agre, P. The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int.* **48**, 1057-1068 (1995).
20. Knepper M A. Molecular Physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channel by vasopressin. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* **272**, F3-F12 (1997).
21. Schafer J A. Renal water and ion transport systems. *Am. J. Physiol. (Adv. Physiol. Educ.)* **275**, S119-S131 (1998).
22. Greger, R. Physiology of renal sodium transport. *Am. J. Med. Sci.* **319**, 51-62 (2000).
23. Berl T & Robertson G L. The Kidney. W.B.Saunders Company (ed.), pp. 866-924 USA, 2000).
24. Sands, J.M. & Kokko, J.P. Current concepts of the countercurrent multiplication system. *Kidney Int. Suppl* **57**, S93-S99 (1996).
25. Verney E B. Antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc. Roy. Soc London Ser. B* **135**, 25-100 (1947).
26. Schrier, R.W., Berl, T. & Anderson, R.J. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am. J. Physiol* **236**, F321-F332 (1979).
27. Robertson, G.L., Shelton, R.L. & Athar, S. The osmoregulation of vasopressin. *Kidney Int.* **10**, 25-37 (1976).
28. Berliner, R.W. The concentrating mechanism in the renal medulla. *Kidney Int.* **9**, 214-222 (1976).
29. Marsh, D.J. Functional transitions in the renal countercurrent system. *Kidney Int.* **31**, 668-672 (1987).
30. Gottschalk, C.W. History of the urinary concentrating mechanism. *Kidney Int.* **31**, 507-511 (1987).

31. Gottschalk, C.W. & Mylle, M. Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. 1959 [classical article]. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 153-164 (1997).
32. Kokko, J.P. & Rector, F.C., Jr. Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla. *Kidney Int.* **2**, 214-223 (1972).
33. Sands, J.M. & Kokko, J.P. Current concepts of the countercurrent multiplication system. *Kidney Int. Suppl* **57**, S93-S99 (1996).
34. Stephenson, J.L. Concentration of urine in a central core model of the renal counterflow system. *Kidney Int.* **2**, 85-94 (1972).
35. Stephenson, J.L. Models of the urinary concentrating mechanism. *Kidney Int.* **31**, 648-661 (1987).
36. You, G. *et al.* Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. *Nature* **365**, 844-847 (1993).
37. Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger U V & Hediger M A. Urea transporters in kidney: molecular analysis and contribution to the urinary concentrating process. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* **275**, F319-F324 (1998).
38. Nielsen, S., Smith, B.L., Christensen, E.I., Knepper, M.A. & Agre, P. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell Biol.* **120**, 371-383 (1993).
39. Gamba G *et al.* Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* **296**, 17713-17722 (1994).
40. Hebert S C. Roles of Na-K-2Cl and Na-Cl cotransporters and ROMK potassium channels in urinary concentrating mechanism. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* **275**, F325-F327 (1998).
41. Gamba G *et al.* Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2749-2753 (1993).
42. Kurihara, K., Moore-Hoon, M.L., Saitoh, M. & Turner, R.J. Characterization of a phosphorylation event resulting in upregulation of the salivary Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter. *Am. J. Physiol* **277**, C1184-C1193 (1999).
43. Riccardi D *et al.* Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium-sensing receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 131-135 (1995).

44. Shayakul,C., Steel,A. & Hediger,M.A. Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. *J. Clin. Invest* **98**, 2580-2587 (1996).
45. Hebert S C, Culpepper R M & Andreoli T E. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **241**, F412-F431 (1981).
46. Grantham,J.J. & Burg,M.B. Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. *Am. J. Physiol* **211**, 255-259 (1966).
47. Morgan,T., Sakai,F. & Berliner,R.W. In vitro permeability of medullary collecting ducts to water and urea. *Am. J. Physiol* **214**, 574-581 (1968).
48. Sands,J.M., Nonoguchi,H. & Knepper,M.A. Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments. *Am. J. Physiol* **253**, F823-F832 (1987).
49. Knepper M A. Long-term regulation of urinary concentrating capacity. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* **275**, F332-F333 (1998).
50. Katz S A. Some teaching tips on the mechanisms of urinary concentration and dilution: countercurrent multiplication be damned. *Am. J. Physiol. (Adv. Physiol. Educ.)* **275**, S195-S205 (1998).
51. Sands,J.M. & Kokko,J.P. Countercurrent system. *Kidney Int.* **38**, 695-699 (1990).
52. Sands,J.M. & Kokko,J.P. Current concepts of the countercurrent multiplication system. *Kidney Int. Suppl* **57**, S93-S99 (1996).
53. Stephenson,J.L., Jen,J.F., Wang,H. & Tewarson,R.P. Convective uphill transport of NaCl from ascending thin limb of loop of Henle. *Am. J. Physiol* **268**, F680-F692 (1995).
54. Matsumura,Y. *et al.* Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel [see comments]. *Nat. Genet.* **21**, 95-98 (1999).
55. Smith C P *et al.* Cloning and regulation of expression of the rat kidney urea transporter (rUT2). *J. Clin. invest.* **96**, 1556-1563 (1995).
56. Sun,A., Grossman,E.B., Lombardi,M. & Hebert,S.C. Vasopressin alters the mechanism of apical Cl⁻ entry from Na⁺:Cl⁻ to Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransport in mouse medullary thick ascending limb. *J. Membr. Biol.* **120**, 83-94 (1991).

57. Mulders S M *et al.* New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 242-248 (1997).
58. Bichet, D.G. Nephrogenic diabetes insipidus. *Semin. Nephrol.* **14**, 349-356 (1994).
59. Carmichael, M.C. & Kumar, R. Molecular biology of vasopressin receptors. *Semin. Nephrol.* **14**, 341-348 (1994).
60. Dousa, T.P. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterases in the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-mediated actions of vasopressin. *Semin. Nephrol.* **14**, 333-340 (1994).
61. Shyama M, Knepper M & Burg M B. The Kidney. W.B.Saunders Company (ed.), pp. 595-635 USA, 2000).
62. Molony, D.A., Reeves, W.B., Hebert, S.C. & Andreoli, T.E. ADH increases apical Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am. J. Physiol* **252**, F177-F187 (1987).
63. Hebert, S.C. & Andreoli, T.E. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol* **246**, F745-F756 (1984).
64. Eveloff J & Warnock D K. Activation of ion transport system during cell volume regulation. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **252**, F1-F10 (1987).
65. Alvo M, Calamia J & Eveloff J. Lack of potassium effect on Na-Cl cotransport in the medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **249**, F34-F39 (1985).
66. Eveloff J & Calamia J. Effect of osmolarity on cation fluxes in medullary thick ascending limb cells. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **250**, F176-F180 (1986).
67. Hebert, S.C. & Ho, K. Structure and functional properties of an inwardly rectifying ATP- regulated K⁺ channel from rat kidney. *Ren Physiol Biochem.* **17**, 143-147 (1994).
68. Xu Z-C, Yang Y & Hebert S C. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K⁺ channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 9313-9319 (1996).
69. Adachi S *et al.* Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J. Biol. Chem.* **269**, 17677-17683 (1994).

70. Zimniak,L., Winters,C.J., Reeves,W.B. & Andreoli,T.E. Cl⁻ channels in basolateral renal medullary vesicles. X. Cloning of a Cl⁻ channel from rabbit outer medulla. *Kidney Int.* **48**, 1828-1836 (1995).
71. Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt B C, Pfeiffer B & Heinz E. Electrically silent cotransport of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in ehrlich cells. *Biochim Biophys Acta* **600**, 432-447 (1980).
72. Hebert S C, Culpepper R M & Andreoli T E. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. III. Modulation of ADH effect by peritubular osmolality. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **241**, F443-F451 (1981).
73. Hebert S C, Culpepper R M & Andreoli T E. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotrasport; origin of transepithelial volatge. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **241**, F432-F442 (1981).
74. Hebert,S.C. & Andreoli,T.E. Effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle: II. determinants of the ADH-mediated increases in transepithelial voltage and in net Cl⁻ absorption. *J. Membr. Biol.* **80**, 221-233 (1984).
75. Haas,M. & Forbush,B., III. Photolabeling of a 150-kDa (Na + K + Cl) cotransport protein from dog kidney with a bumetanide analogue. *Am. J. Physiol* **253**, C243-C252 (1987).
76. Haas,M., Dunham,P.B. & Forbush,B., III. [3H]bumetanide binding to mouse kidney membranes: identification of corresponding membrane proteins. *Am. J. Physiol* **260**, C791-C804 (1991).
77. Feit P W *et al.* Purification of proteins of the Na/Cl cotransporter from membranes of Ehrlich ascites cells using a bumetanide-sepharose affinity column. *J. Membrane Biol* **103**, 135-147 (1988).
78. Hoffman E K, Sjöholm C & Simonsen L O. Na⁺, Cl⁻ cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase). *J. Membrane Biol* **76**, 269-280 (1983).
79. Levinson,C. Regulatory volume increase in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1021**, 1-8 (1990).
80. Ho,K. *et al.* Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31-38 (1993).
81. Russell,J.M. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* **80**, 211-276 (2000).

82. Bussolati O, Uggeri J, Belletti S, Dallasta V & Gazzola G C. The stimulation of Na,K,Cl cotransport and of system A for neutral amino acid transport is a mechanism for cell volume increase during cell cycle. *FASEB J.* **10**, 920-926 (1996).
83. Haas M and Forbush III B. The Na-K-Cl Cotransporter on secretory epithelia. *Annu. Rev. Physiol* **62**, 515-534 (2000).
84. Russell, J.M. Cation-coupled chloride influx in squid axon. Role of potassium and stoichiometry of the transport process. *J. Gen. Physiol* **81**, 909-925 (1983).
85. Haas M. Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 443-457 (1989).
86. Xu, J.C. *et al.* Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2201-2205 (1994).
87. Delpire, E., Rauchman, M.I., Beier, D.R., Hebert, S.C. & Gullans, S.R. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 25677-25683 (1994).
88. Kaplan M R, Mount D B, Delpire E, Gamba G & Hebert S C. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 649-668 (1996).
89. Mount D B *et al.* The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J. Exp. Biol.* **201**, 2091-2102 (1998).
90. Lytle C & Forbush III B. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II Regulation by direct phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **267**, 25438-25443 (1992).
91. Haas, M., McBrayer, D. & Lytle, C. [Cl⁻]_i-dependent phosphorylation of the Na-K-Cl cotransport protein of dog tracheal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 28955-28961 (1995).
92. Jacoby, S.C., Gagnon, E., Caron, L., Chang, J. & Isenring, P. Inhibition of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransport by mercury. *Am. J. Physiol* **277**, C684-C692 (1999).
93. Matthews J B, Smith J A, Mun E C & Sicklick J K. Osmotic regulation of intestinal epithelial Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport: role of Cl⁻ and F-actin. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **274**, C697-C706 (1998).

94. Fernandez-Llama, P. *et al.* Cyclooxygenase inhibitors increase Na-K-2Cl cotransporter abundance in thick ascending limb of Henle's loop. *Am. J. Physiol* **277**, F219-F226 (1999).
95. Leung S, O'Donnell M E, Martinez A & Palfrey H C. Regulation by nerve growth factor and protein phosphorylation of Na/K/2Cl cotransport and cell volume in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 10581-10589 (1994).
96. Paulais, M. & Turner, R.J. Beta-adrenergic upregulation of the Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter in rat parotid acinar cells. *J. Clin. Invest* **89**, 1142-1147 (1992).
97. Di Stefano A *et al.* Effects of parathyroid hormone and calcitonin on Na⁺, Cl⁻, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse kidney. *Pflugers Arch.* **417**, 161-167 (1998).
98. Amlal H, Legoff C, Vernimmen C, Paillard M & Bichara M. Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransport in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **271**, C455-C463 (1996).
99. Brock T A, Brungnara C, Canessa M & Gimbrone M A. Bradykinin and vasopressin stimulates Na⁺+K⁺+Cl⁻ cotransport in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **250**, C888-C895 (1986).
100. O'Donnell M E & Owen N E. Role of cyclic GMP in atrial natriuretic factor stimulation of Na⁺, K⁺, Cl⁻ cotransport in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 15461-15466 (1986).
101. D'Andrea, L. *et al.* Na:K:2Cl cotransporter (NKCC) of intestinal epithelial cells. Surface expression in response to cAMP. *J. Biol. Chem.* **271**, 28969-28976 (1996).
102. Bailly, C. Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int. Suppl* **65**, S29-S35 (1998).
103. Dong J & Delamere N A. Protein kinase C inhibits Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **267**, C1553-C1560 (1994).
104. Liedtke C M & Cole T. Antisense oligodeoxynucleotide to PKC- δ blocks α_1 -adrenergic activation of Na-K-2Cl cotransport. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **273**, C1632-C1640 (1997).
105. Takaichi K & Kurokawa K. Inhibitory guanosine triphosphate-binding protein-mediated regulation of vasopressin action in isolated single medullary tubules of mouse kidney. *J. Clin. invest.* **82**, 1437-1444 (1988).

106. Hecht,G. & Koutsouris,A. Myosin regulation of NKCC1: effects on cAMP-mediated Cl⁻ secretion in intestinal epithelia. *Am. J. Physiol* **277**, C441-C447 (1999).
107. Lytle C. A volume sensitive protein kinase regulates the Na-K-2Cl cotransporter in duck red blood cells. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **274**, C1002-C1010 (1998).
108. Lytle C. Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and calyculin-A involves phosphorylation at common sites. *J. Biol. Chem.* **272**, 15069-15077 (1997).
109. Klein,J.D., Lamitina,S.T. & O'Neill,W.C. JNK is a volume-sensitive kinase that phosphorylates the Na-K-2Cl cotransporter in vitro. *Am. J. Physiol* **277**, C425-C431 (1999).
110. Jensen,B.S., Jessen,F. & Hoffmann,E.K. Na⁺, K⁺, Cl⁻ cotransport and its regulation in Ehrlich ascites tumor cells. Ca²⁺/calmodulin and protein kinase C dependent pathways. *J. Membr. Biol.* **131**, 161-178 (1993).
111. Vigne P, Lopez-Farre A & Frelin C. Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter of brain capillary endothelial cells. Properties and regulation by endothelins, hyperosmolar solutions, calyculin A, and interleukin-1. *J. Biol. Chem.* **269**, 19925-19930 (1994).
112. Whisenant,N., Zhang,B.X., Khademazad,M., Loessberg,P. & Muallem,S. Regulation of Na-K-2Cl cotransport in osteoblasts. *Am. J. Physiol* **261**, C433-C440 (1991).
113. Lytle,C. & Forbush,B., III. Na-K-Cl cotransport in the shark rectal gland. II. Regulation in isolated tubules. *Am. J. Physiol* **262**, C1009-C1017 (1992).
114. Valdez,I.H., Paulais,M., Fox,P.C. & Turner,R.J. Microfluorometric studies of intracellular Ca²⁺ and Na⁺ concentrations in normal human labial gland acini. *Am. J. Physiol* **267**, G601-G607 (1994).
115. Torchia J, Lytle C, Pon D J, Forbush III B & Sen A K. The Na-K-Cl cotransport of avian salt gland. Phosphorylation in response to cAMP-dependent and calcium-dependent secretagogues. *J. Biol. Chem.* **267**, 25444-25450 (1992).
116. Homma T & Harris R C. Time-dependent biphasic regulation of Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport in rat glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 13553-13559 (1991).
117. Vuillemin,T. *et al.* Regulation by calcitonin of Na(+)-K(+)-Cl⁻ cotransport in a rabbit thick ascending limb cell line. *Am. J. Physiol* **263** , C563-C572 (1992).

118. Crook R B, von Brauchitsch D K & Polansky J R. Potassium transport in nonpigmented epithelial cells of ocular ciliary body: Inhibition of a Na⁺,K⁺,Cl⁻ cotransporter by protein kinase C. *J. Cell Physiol.* **153**, 214-220 (1992).
119. Crook,R.B. & Polansky,J.R. Stimulation of Na⁺,K⁺,Cl⁻ cotransport by forskolin-activated adenylyl cyclase in fetal human nonpigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 3374-3383 (1994).
120. O'Donnell M E. Endothelial cell sodium-potassium-chloride cotransport. Evidence of regulation by Ca²⁺ and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 11559-11566 (1991).
121. Matthews,J.B., Awtrey,C.S. & Madara,J.L. Microfilament-dependent activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransport by cAMP in intestinal epithelial monolayers [published erratum appears in *J Clin Invest* 1993 Apr;91(4):1855]. *J. Clin. Invest* **90**, 1608-1613 (1992).
122. Clemo,H.F., Feher,J.J. & Baumgarten,C.M. Modulation of rabbit ventricular cell volume and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransport by cGMP and atrial natriuretic factor. *J. Gen. Physiol* **100**, 89-114 (1992).
123. Elliott,S.J. & Schilling,W.P. Oxidant stress alters Na⁺ pump and Na(+)-K(+)-Cl⁻ cotransporter activities in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol* **263**, H96-102 (1992).
124. Matthews,J.B. *et al.* Phorbol ester sequentially downregulates cAMP-regulated basolateral and apical Cl⁻ transport pathways in T84 cells. *Am. J. Physiol* **265**, C1109-C1117 (1993).
125. Haas,M. & McBrayer,D.G. Na-K-Cl cotransport in nystatin-treated tracheal cells: regulation by isoproterenol, apical UTP, and [Cl⁻]_i. *Am. J. Physiol* **266**, C1440-C1452 (1994).
126. Robertson M A & Foskett J K. Na⁺ transport pathways in secretory acinar cells: membrane cross talk mediated by [Cl⁻]_i. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **267**, C146-C156 (1994).
127. Haas M, McBrayer D & Lytle C. [Cl⁻]_i-dependent phosphorylation of the Na-K-Cl cotransport protein of dog tracheal epithelial cells. *J. Biochem.* **270**, 28955-28961 (1995).
128. Breitwieser G E, Altamirano A A & Russell J M. Elevated [Cl⁻]_i and [Na⁺]_i inhibit Na⁺, K⁺, Cl⁻ cotransport by different mechanisms in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* **107**, 261-270 (1996).

129. Hegde R S & Palfrey H C. Ionic effect on bumetanide binding to the activated Na/K/2Cl cotransporter: Selectivity and kinetic properties of ion binding sites. *J. Membrane Biol* **126**, 27-37 (1992).
130. Kiroytcheva, M. *et al.* Effect of cAMP on the activity and the phosphorylation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in rat thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* **55**, 1819-1831 (1999).
131. Kaji D M, Chase Jr. H S, Eng J P & Diaz J. Prostaglandin E2 inhibits Na-K-2Cl cotransport in medullary thick ascending limb cells. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **271**, C354-C361 (1996).
132. Hebert, S.C., Reeves, W.B., Molony, D.A. & Andreoli, T.E. The medullary thick limb: function and modulation of the single-effect multiplier. *Kidney Int.* **31**, 580-589 (1987).
133. Ito O, Kondo Y, Takahashi N, Omata K & Abe K. Role of calcium in insulin-stimulated NaCl transport in medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **269**, F236-F241 (1995).
134. Hebert S C, Brown E M & Harris H W. Role of the Ca²⁺-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J. Exp. Biol.* **200**, 295-302 (1997).
135. Riccardi D *et al.* Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* **274**, F611-F622 (1998).
136. Escalante B, Ertlj D, Falck J R & McGiff J C. Effect of cytochrome P450 arachidonate metabolites on ion transport in rabbit kidney loop of Henle. *Science* **251**, 799-802 (1991).
137. Escalante B, Ertlj D, Falk J R & McGiff J C. Cytochrome P-450 arachidonate metabolites affect ion fluxes in rabbit medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **266**, C1775-C1782 (1994).
138. Grossman E B & Hebert S C. Modulation of Na-K-ATPase activity in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. Effect of mineralocorticoids and sodium. *J. Clin. invest.* **81**, 885-892 (1988).
139. Escalante B, Ferreri N R, Dunn C E & McGiff J C. Cytokines affect ion transport in primary cultured thick ascending limb of Henle's loop cells. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **266**, C1568-C1576 (1994).
140. De Rouffignac, C., Di Stefano, A., Wittner, M., Roinel, N. & Elalouf, J.M. Consequences of differential effects of ADH and other peptide hormones on thick ascending limb of mammalian kidney [editorial]. *Am. J. Physiol* **260**, R1023-R1035 (1991).

141. Nonoguchi H, Tomita K & Marumo F. Effect of atrial natriuretic peptide and vasopressin on chloride transport in long-and short-looped medullary thick ascending limbs. *J. Clin. invest.* **90**, 349-357 (1992).
142. Bailly,C., Barlet-Bas,C. & Amiel,C. Platelet activating factor inhibits Cl and K transport in the medullary thick ascending limb. *Kidney Int.* **41**, 269-274 (1992).
143. Ito O *et al.* Tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C regulate insulin-stimulated NaCl absorption in the thick ascending limb. *Kidney Int.* **51**, 1037-1041 (1997).
144. Attmane-Elakeb,A. *et al.* Stimulation by in vivo and in vitro metabolic acidosis of expression of rBSC-1, the Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter of the rat medullary thick ascending limb. *J. Biol. Chem.* **273**, 33681-33691 (1998).
145. Wingo C S. Effect of acidosis on chloride transport in the cortical thick ascending limb of Henle perfuse in vitro. *J. Clin. invest.* **78**, 1324-1330 (1986).
146. Beach,R.E. & Good,D.W. Effects of adenosine on ion transport in rat medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol* **263**, F482-F487 (1992).
147. Payne,J.A. & Forbush,B., III. Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 4544-4548 (1994).
148. Igarashi,P., Vanden Heuvel,G.B., Payne,J.A. & Forbush,B., III. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am. J. Physiol* **269**, F405-F418 (1995).
149. Gillen,C.M., Brill,S., Payne,J.A. & Forbush,B., III. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J. Biol. Chem.* **271**, 16237-16244 (1996).
150. Payne J A. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **273**, C1516-C1525 (1997).
151. Mount D B *et al.* Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J. Biol. Chem.* **274**, 16355-16362 (1999).
152. Mount D B, Hoover R S & Hebert S C. The molecular physiology of electroneutral cation-chloride cotransport. *J. Membrane Biol* **158**, 177-186 (1997).

153. Hiki K *et al.* Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K^+ -Cl⁻ cotransporter. *J. Biol. Chem.* **274**, 10661-10667 (1999).
154. Payne J A, Stevenson T J & Donaldson L F. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J. Biol. Chem.* **271**, 16245-16252 (1996).
155. Kaplan M R *et al.* Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int.* **49**, 40-47 (1996).
156. Yang T, Huang Y G, Singh I, Schnermann J & Briggs J P. Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **271**, F931-F939 (1996).
157. Kaplan M R, Plotkin M D, Brown D, Hebert S C & Delpire E. Expression of the mouse Na-K-2Cl cotransporter, mBSC2, in the terminal inner medullary collecting duct, the glomerular and extraglomerular mesangium, and the glomerular afferent arteriole. *J. Clin. invest.* **98**, 723-730 (1996).
158. Simon D B *et al.* Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics* **13**, 183-188 (1996).
159. Simon D B *et al.* Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* **12**, 24-30 (1996).
160. Clive D M. Bartter's syndrome: the unsolved puzzle. *Am J Kidney Dis* **25**, 813-823 (1995).
161. Simon D B & Lifton R P. The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* **271**, F961-F966 (1996).
162. Simon D B *et al.* Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics* **17**, 171-178 (1997).
163. Simon D B *et al.* Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K^+ channel, ROMK. *Nature Genetics* **14**, 152-156 (1996).
164. Takahashi, N. *et al.* Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome [In Process Citation]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 5434-5439 (2000).
165. Isenring, P., Jacoby, S.C. & Forbush, B., III. The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 7179-7184 (1998).

166. Waldegger,S., Barth,P., Raber,G. & Lang,F. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 4440-4445 (1997).
167. Bailly C. Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int.* **53 (Suppl. 65)**, S-29-S-35 (1998).
168. Greger,R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci.* **319**, 51-62 (2000).
169. Brock T A, Brungnara C, Canessa M & Gimbrone M A. Bradykinin and vasopressin stimulates Na⁺K⁺Cl⁻ cotransport in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* **250**, C888-C895 (1986).
170. Picard,A., Labbe,J.C., Peaucellier,G. & Doree,M. Antipain microinjection prevents progesterone to inhibit adenylyl cyclase in *Xenopus* oocytes. *Cell Biol. Int. Rep.* **11**, 81-88 (1987).
171. Cicirelli,M.F. & Smith,L.D. Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **108**, 254-258 (1985).
172. Stinnakre,J. & Van Renterghem,C. Cyclic adenosine monophosphate, calcium, acetylcholine and the current induced by adenosine in the *Xenopus* oocyte. *J. Physiol (Lond)* **374**, 551-569 (1986).
173. Capasso,G. *et al.* A decrease in renal medullary tonicity stimulates anion transport in Henle's loop of rat kidneys. *Am. J. Physiol* **274**, F693-F699 (1998).
174. Moore-Hoon,M.L. & Turner,R.J. The structural unit of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is a homodimer. *Biochemistry* **39**, 3718-3724 (2000).
175. Nielsen,S., Maunsbach,A.B., Ecelbarger,C.A. & Knepper,M.A. Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am. J. Physiol* **275**, F885-F893 (1998).
176. Kondo,Y. *et al.* Direct evidence for the absence of active Na⁺ reabsorption in hamster ascending thin limb of Henle's loop. *J. Clin. Invest* **91**, 5-11 (1993).
177. Marsh,D.J. Solute and water flows in thin limbs of Henle's loop in the hamster kidney. *Am. J. Physiol* **218**, 824-831 (1970).

178. Shigaev,A., Asher,C., Latter,H., Garty,H. & Reuveny,E. Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na(+) channel. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **278**, F613-F619 (2000).
179. Chen,S.Y. *et al.* Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2514-2519 (1999).
180. Lang,F. *et al.* Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8157-8162 (2000).
181. Watts,B.A., III & Good,D.W. Hyposmolality stimulates apical membrane Na(+)/H(+) exchange and HCO(3)(-) absorption in renal thick ascending limb. *J. Clin. Invest* **104**, 1593-1602 (1999).

Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL

I. Molecular characterization and intrarenal localization

DAVID B. MOUNT,¹ ALLAN BAEKGAARD,² AMY E. HALL,¹ CONSUELO PLATA,³ JASON XU,¹ DAVID R. BEIER,⁴ GERARDO GAMBA,³ AND STEVEN C. HEBERT¹

¹Division of Nephrology, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center,

Nashville, Tennessee 37232; ⁴Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115;

and ³Molecular Physiology Unit, Department of Nephrology and Mineral Metabolism,

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biológicas,

National University of Mexico, Mexico City CP 14000, Mexico; ²Department of Medical Physiology,

The Panum Institute, University of Copenhagen, DK-2200 Copenhagen N, Denmark

Mount, David B., Allan Baekgaard, Amy E. Hall, Consuelo Plata, Jason Xu, David R. Beier, Gerardo Gamba, and Steven C. Hebert. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL. I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am. J. Physiol.* 276 (*Renal Physiol.* 45): F347–F358, 1999.—We have identified several alternatively spliced cDNAs encoding mBSC1, an apical bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter from mouse kidney. Two full-length clones were isolated, designated C4 and C9, predicting proteins of 770 and 1,095 amino acids, respectively. The C4 isoforms are generated by utilization of an alternative polyadenylation site located within the intron between exons 16 and 17 of the mBSC1 gene on chromosome 2; the resultant transcripts predict a truncated COOH terminus ending in a unique 55 amino acid sequence. The predicted C4 and C9 COOH termini differ in the distribution of putative phosphorylation sites for both protein kinase A and C. Independent splicing events involve three previously described cassette exons, which are predicted to encode most of the second transmembrane domain. A total of six different isoforms are expressed, generated by the combinatorial association of three cassette exons and two alternative 3 ends. C9-specific and C4-specific antibodies detect proteins of ~150 and 120 kDa, respectively, in mouse kidney. Immunofluorescence and immunohistochemistry indicate expression of both COOH-terminal isoforms within the thick ascending limb of the loop of Henle (TAL). However, staining with the C4 antibody is more heterogeneous, with a decreased proportion of positive cells in the cortical TAL. Functional expression in *Xenopus* oocytes indicates a dominant negative function for C4 isoforms [companion study, C. Plata, D. B. Mount, V. Rubio, S. C. Hebert, and G. Gamba. *Am. J. Physiol.* 276 (*Renal Physiol.* 45): F347–F358, 1999], and the differential expression of these isoforms may contribute to functional heterogeneity of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in mouse TAL.

sodium-potassium-chloride cotransporter; bumetanide; protein kinase A; adenosine 3',5'-cyclic monophosphate; thick ascending limb of Henle; alternative splicing

ELECTRONEUTRAL cation-chloride cotransporters have been described in a variety of epithelial and nonepithelial cells. These transporters were initially separated

on the basis of differential sensitivity to loop diuretics and thiazide diuretics; however, recent molecular efforts have demonstrated that they form a family of structurally homologous proteins (21). Thus far, five gene products have been identified in vertebrates, encoding an apically expressed bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (10, 14, 24, 29, 33), a predominantly basolateral bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (7, 21), an apical thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter (10, 11), a widely expressed K⁺-Cl⁻ cotransporter, and a neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporter (21).

In the renal thick ascending limb of the loop of Henle (TAL), apical bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ transport plays a critical role in the countercurrent mechanism, maintenance of the extracellular fluid volume, and renal reabsorption of calcium and magnesium. We previously identified a cDNA encoding the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter rBSC1 from the outer medulla of rat kidney and demonstrated bumetanide-sensitive Na⁺- and Cl⁻-dependent uptake of rubidium (⁸⁶Rb⁺) in *Xenopus laevis* oocytes injected with rBSC1 cRNA (10). Orthologous cDNAs, designated NKCC2 by Forbush and colleagues have also been isolated from rabbit (24), mouse (14), and human kidney (29, 33). The BSC1 gene is expressed exclusively within the kidney, and the rBSC1 protein has been localized to the apical membrane of epithelial cells in both the medullary and cortical TAL (MTAL and CTAL, respectively) (8, 16). Mutations in the human BSC1 gene have been demonstrated in kindreds with Bartter's syndrome type I, a familial form of hypokalemic metabolic alkalosis (29, 33).

Previous data were suggestive of molecular heterogeneity in the apical bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters of the mouse TAL. Alternative mRNA splicing of BSC1 has been described in several species, affecting three mutually exclusive exon cassettes, different versions of exon 4 (29), near the 5' end of partial cDNA clones (14, 24, 33). Northern blot analysis also indicates that the outer medulla of mouse kidney contains two transcripts of different length, 3.0 and 4.6 kb, which hybridize to the flounder thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter (fTSC) cDNA (10). Finally, bumetanide binding and photolabeling experiments have detected two immunologically related bumetanide bind-

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

ing proteins in mouse outer medulla, a high-affinity 150-kDa bumetanide binding protein and a low-affinity bumetanide binding protein of ~75 kDa (12).

There is also evidence for functional heterogeneity of apical $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransport in the TAL. We have demonstrated that vasopressin, which stimulates Na^+/Cl^- transport in the murine MTAL (20), switches cotransport from a completely K^+ -independent Na^+/Cl^- mode to a K^+ -dependent $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ mode (31). The molecular mechanism of this modulation is unknown; however, the recycling of K^+ through the K^+ -dependent $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter and apical K^+ channels is required for the generation of a lumen-positive potential difference, which drives paracellular absorption of Na^+ and other cations (21, 31). Heterogeneity in the response to vasopressin has also been shown in CTAL, where vasopressin has little effect on transepithelial Na^+/Cl^- transport (13).

To begin the characterization of this functional and molecular diversity, we undertook cloning of the mouse homolog of the renal apical bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter, hereafter referred to as mBSC1. We now report the isolation of cDNA clones derived from alternative splicing of the three cassette exons (14) and the use of two alternative 3' ends and show that this alternative splicing results in a total of six different transcripts. One of the alternative 3' ends predicts a new subtype of mBSC1 isoforms with a COOH-terminal truncation. We also examine the expression and localization of proteins with the two alternative COOH-terminal domains. Functional expression of full-length isoforms is detailed in the companion study (25).

MATERIALS AND METHODS

cDNA cloning and sequencing. To isolate mBSC1 clones, a directional size-selected (3–6 kb) mouse outer medulla cDNA library was constructed in pSPORT1 (SuperScript, BRL). Poly(A)⁺ RNA for this purpose was isolated from adult male CD-1 mice by the guanidine isothiocyanate method, followed by selection on an oligo(dT)-cellulose column (type 7, Pharmacia). Colonies were screened with a ³²P-labeled randomly primed *Bam*H1-*Bam*H1 fragment (nucleotides 1194–2543) of β TSC (11), at moderate stringency. Seventeen clones were isolated, and cDNA inserts were categorized on the basis of size, restriction mapping, and sequencing of 5' and 3' ends. The cDNA inserts of plasmids were sequenced using the Sequenase version 2.0 kit (US Biochemical) and by automated cycle sequencing on an Applied Biosystems model 373A sequencer (Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School). Analysis of nucleotide and amino acid sequence was performed using the GENWORKS software package (Intelligenetics, version 2.3.1) and the program pBLAST (2). The nomenclature of the mBSC1 cDNAs is as follows: the letters A, B, or F refer to the cassette exons (14), and numerals 4 and 9 refer to the C4 and C9 alternative 3' ends (see RESULTS).

Northern blots and RT-PCR. RNA was extracted from mouse tissues (CD-1 and C57BL/6J strains), and poly(A)⁺ RNA was selected from renal cortex and inner and outer stripe of outer medulla using oligo(dT)-resin (Oligotex, Qiagen). RNA [2.5 μ g/lane of poly(A)⁺ RNA and 10 μ g/lane of total RNA] was resolved by electrophoresis (5% formaldehyde, 1%

agarose), transferred to a nylon membrane (Stratagene), and probed with ³²P-labeled randomly primed probes. Hybridization was performed at 50°C in 4 \times SSCP, 40% formamide, 4 \times Denhardt's solution, 0.5% SDS, and 200 μ g salmon sperm DNA, and membranes were washed twice for 20 min at room temperature in 2 \times SSCP and 0.1% SDS, and twice for 1 h at 65°C in 0.5 \times SSCP and 0.1% SDS.

Subclones and restriction fragments of C4 and C9 were generated for use as probes. A 365-bp *Hind*III-*Apa*I fragment (nucleotides 1284–1649 of C9.0, 1306–1671 of C4.0) was used as a C4/C9-common probe, and a 475-bp *Sac*I-*Sac*I fragment (nucleotides 3293–3768 of C9.0) was used as a C9-specific probe. A 382-bp C4-specific fragment (nucleotides 2530–2912) was generated by PCR and subcloned into pBluescript. High-stringency Southern blot analysis with both the mBSC1 clones and mBSC2 (7) was performed with the individual probes to verify their specificity.

RT-PCR of kidney RNA was performed with C4- and C9-specific primer pairs, which were designed with sense primers within common sequences and antisense primers within the unique 3' ends. The C4-specific primer pair used was

sense, S1: 5'-GACAACGCTCTGGAATTAACC-3

antisense, AS1: 5'-GTCTGCTTCCTTCTCGTTGG-3

The amplified product corresponds to nucleotides 2182–2692 of C4.0 (510 bp). The C9-specific primer pair used was

sense, S2: 5'-GTGCATTGCTTAAACAGGCC-3

antisense, AS2: 5'-GTGTTTGCTTCATCTCCC-3

The amplified product corresponds to nucleotides 2216–2494 of C9.0 (278 bp). Total RNA (200 ng/PCR reaction) from mouse kidney was reverse transcribed using oligo(dT) priming. PCR amplification was performed using *Taq* polymerase (Stratagene) in a PTC-100 programmable thermal controller (MJ Research), using 30 cycles of denaturation (92°C, 2 min), annealing (54°C, 1 min), and extension (72°C, 1 min). The buffer conditions for primer pairs were optimized using cDNA templates and the Opti-Prime buffer system (Stratagene), which varies Mg^{2+} and K^+ concentration and pH. PCR for the S1/AS1 primer pair was optimal using *buffer 5* (10 mM Tris, pH 8.8, 1.5 mM MgCl_2 , and 25 mM KCl) and 5% formamide. PCR for the S2/AS2 primer pair was optimal using *buffer 10* (10 mM Tris, pH 9.2, 1.5 mM MgCl_2 , and 75 mM KCl). PCR products from both a C4-specific and a C9-specific RT-PCR sample were subcloned into the *Eco*R V site of pBluescript by blunt-end ligation.

The murine B cassette exon was not identified in any of the cDNA clones obtained above (see RESULTS). Therefore, it was cloned from renal cortex by RT-PCR, using a primer pair that amplifies the equivalent of nucleotides 746–996 of C9.0. PCR products were subcloned into the *Eco*R V site of pBluescript and screened by PCR with a sense primer (primer S3, defined below) specific for the A cassette; three clones that did not contain the A cassette were sequenced on both strands.

To determine whether alternative splicing of the three 5' cassette exons occurred independently of the splicing that generated the C4 and C9 3' ends, RT-PCR was also performed with sense primers within the cassettes and antisense primers within the unique 3' ends. RT-PCR was performed as above, except that PCR reactions included *Taq* Extender (Stratagene). RT-treated poly(A)⁺ RNA (20 ng/PCR reaction)

was used as the template, and extension times were increased to 1.5 min. The cassette-specific sense primers were

S3: A cassette-specific 5'-CATGGTAACCTCTATCACGGG-3

S4: B cassette-specific 5'-CTGTGATTATCATCGGCTTAGC-3

S5: F cassette-specific 5'-ATCATCATTTGGCCTGAGCG-3

The AS2 primer served as the C9-specific antisense primer; PCR with this primer and the cassette-specific primers generated products of ~1.7 kb. To shorten the amplified products, a primer more 5' than AS1 was used as the C4-specific antisense primer

AS3: C4-specific 5'-CCATGGGTATCTTCTGTGCC-3

PCR with the cassette primers and the AS3 primer generated products of ~1.6 kb. For the four isoforms not isolated in the original cDNA clones (see RESULTS, Fig. 2A), buffer conditions for PCR were optimized with cDNA templates that had been generated for functional expression (see Ref. 25). PCR for the S4/AS3 primer pair was optimal in Stratagene *buffer 5* (see above). *Buffer 9* (10 mM Tris, pH 9.2, 1.5 mM MgCl₂, and 25 mM KCl) was used for the S5/AS3 primer pair. PCR for the S3/AS2 primer pair utilized *buffer 10* (see above), and *buffer 9* was used for the primer pair S4/AS2. The PCR adjunct 5% formamide was also added for the S4/AS3, S5/AS3, and S4/AS2 primer pairs. Amplified RT-PCR bands of the appropriate size were subcloned into the *EcoR* V site of pBluescript.

Characterization of mBSC1 proteins A quantity of 1.0 µg of linearized cDNA (mBSC1-A4 and mBSC1-F9) was translated in vitro using T7 RNA polymerase-coupled rabbit reticulocyte lysate (TNT T7, Promega) and [³⁵S]methionine for 1 h at 30°C. Protein was resolved by SDS-PAGE (10% polyacrylamide), along with prestained high and low range SDS-PAGE molecular weight standards (Bio-Rad, Hercules, CA).

Western blotting of outer medulla membrane protein was performed using antibodies specific for both alternatively spliced mBSC1 COOH termini. A previously characterized antibody generated against a COOH-terminal segment of rBSC1 (amino acids 834-900) was used as a C9-specific antibody (16); these amino acids are not present in the predicted C4 protein. This region of mBSC1 is 94% homologous to rBSC1, and the specificity of the antibody has been established in rat (16). A C4-specific antibody was also generated (Quality Control Biochemicals, Hopkinton, MA) by immunization of rabbits with the HPLC-purified peptide acetyl-CGTEDTHGNRKEKRR (amino acids 735-749 of mBSC1-A4, with an amino terminal cysteine). This peptide lies within the unique COOH terminus of mBSC1 C4 isoforms and does not display any homology to any other proteins in a BLAST search (2) of the nonredundant protein database. For isolation of membrane protein, mouse kidney (CD-1 and C57BL/6J strains) was dissected, homogenized in 9 vol of ice-cold homogenization buffer (0.32 M sucrose, 5 mM Tris, and 2 mM EDTA, pH 7.5, plus protease inhibitors), and centrifuged at 3,000 g for 10 min. The supernatant was subsequently centrifuged at 100,000 g at 4°C for 30 min, followed by resuspension of the pellet in homogenization buffer. Membrane protein (100-150 µg) was resolved by gel electrophoresis in 6% SDS-polyacrylamide, and transferred in 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, and 25% methanol to a polyvinylidene difluoride membrane. Affinity purification of antibody and Western blotting was performed as described (34). Antigen-antibody complexes were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL system, Amersham Life Science).

Immunofluorescence. Mouse kidney (CD-1 and C57BL/6J strains) was processed for immunofluorescence as described (34). C4 antibody fluorescence was optimal in tissue perfused with PBS and 4% paraformaldehyde. Tissue sections were treated with 0.2% Triton X-100 (C4 primary antibody) or 1% SDS (C9 primary antibody) in PBS for 5 min to expose antigenic sites (5). Tissue sections were incubated in 1% BSA/PBS/4% SeaBlock (Searun Holdings, Arundel, ME) for 30 min at room temperature. Slides were incubated overnight at 4°C with affinity purified anti-C4 antibody (1:100) or anti-C9 antibody (1:2,000) diluted in 1% BSA/PBS/4% SeaBlock. Sections were washed with PBS/2.8% NaCl followed by standard PBS, then incubated for 1 h with anti-rabbit Alexa 594 conjugate antibody (1:2,000) (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted in 1% BSA/PBS/4% SeaBlock. Sections were washed as above and mounted with Vectashield mounting medium (Vector Labs, Burlingame, CA) diluted with equal parts 0.3 M Tris, pH 8.8. Slides were examined with a Nikon Eclipse 800 research microscope. Images were generated using an Optronics (OEI-750) video imaging system and printed using a Tektronix Phaser 450 dye-sublimation color printer.

Immunohistochemistry. Mouse kidney sections were obtained and treated as described above. Following blocking with 1% BSA/PBS/4% SeaBlock, the tissue was treated with avidin-biotin for 30 min at room temperature using a kit obtained from Vector Labs. The antibody was applied as before and incubated overnight at 4°C. The sections were allowed to come to room temperature before washing. Sections were washed with PBS/2.8% NaCl followed by standard PBS, then incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit biotinylated antibody (1:200). Sections were washed as above and incubated with Vectastain ABC peroxidase for 1 h followed by two 5-min PBS washes. The sections were then developed using Vector diaminobenzidine substrate kit and mounted with Aquapolymount (Polysciences, Warrington, PA). Slides were examined with a Nikon Eclipse 800 research microscope. Images were generated using an Optronics (OEI-750) video imaging system and printed using a Tektronix Phaser 450 dye-sublimation color printer.

Chromosomal localization and characterization of genomic clones. Primers from within the 3'-untranslated region (UTR) of the C9.0 cDNA were used to test for single-strand conformation polymorphisms (SSCPs) between mouse strains. These were analyzed as previously described (4, 7). The primer pair S6 5'-GGTATTAACCCATGCTTTACAG-3 and AS4 5'-GGCATATGTTGACTCTTTGGG-3, which amplifies nucleotides 4359 to 4546 of mBSC1-F9, identified a series of polymorphisms. Since these primers identified a polymorphism between the C57BL/6J and C3H/FeJ strains, they were used to analyze DNA prepared from the BXH recombinant inbred series.

To determine the mechanism of the alternative splicing that generated the C4 3' end, the corresponding segment of the mBSC1 gene was characterized. Three overlapping PCR fragments were generated from genomic DNA, spanning the exon encoding the C4 3' end and the two flanking introns (Fig. 4B). The three fragments were subcloned into the *EcoR* V site of pBluescript and sequenced; the entire C4 3' exon was sequenced on one strand, and sequences around exon/intron boundaries were determined on both strands.

RESULTS

Isolation and sequence of cDNA clones. Two major classes of mBSC1 clones, designated C4 (clone 4) and C9 (clone 9), were identified. Eight C4 clones and nine

A

MSVSIPSNSV PSSASRFQVH VINEGHGSAA AVGDSADPPH YEETSFQDEA 50
 QNRLRISFRP GNQECYDNFL QTGETAKTDT TFHAYDSHTN TYLQTFGHN 100
 TMDAVPKIEY YRNTGSVSGP KVNRPSSLLEI HEQLAKNVTV APGSADRVAN 150
 GDGMPGDEQA ENKEEDMTGV VKFGVWKGVL VRCMLNIWGV MLFIRLSWIV 200
 GEAGIC[○]LGVL IILLSTMVTS ITGLSTSAIA TNGFVRGGA YYLISRSLGP 250
 EFGSGIGLIF AFANAVAVAM YVVGFAETVV DLLKESDSMM VDPTNDIRII 300
 GSITVILLG ISVAGMEWEA KAQVILLVIL LIAIANFFIG TVIPSNNEKK 350
 SRGFNFYQAS IFAENFGPSF TKGEGFFSVF AIFPPAATGI LAGANISGDL 400
 EDPQDAIPRG TMLAIFITTV AYIGVAICVA ACVVRDATGS MNNTIVSGMN 450
 CNGSACGLG YDFSRCQHEP COYGLMNNFQ VMSMVSGFGP LITAGIFSAT 500
 LSSALASLVS APKVFOALCK DNIFKGLQFF AKGYGKNNP LRGYFLTFVI 550
 AMAFILIAEL NVIAPIISNF FLASYALINF SCFHASYAKS PGWRPAYGIY 600
 NMWVSLFGAI LCCAVMFVIN WWAAVITYVI ELFLYIYVTV KKPVDNWGSS 650
 TQALSYVSAL DNALELTTVE DHVKNFRPQC IVLTGGPMTR PALLDITHAF 700
 TKNSGLCICC EVFVVRATSS GSSAESLCSO WVMLGGTETD HGNRKEKKRL 750
 GOEFTSLKKO TNKOCNRGCK 770

B

TKNSGLCICC EVFVGPRLK VKEMNSGMK KQAWLIKNI KAFYAABAAD 750
 CFRDGVRSLL QASGLGRMKP NTLVIGYKKN WRKAPLSELE NYVGIHDAF 800
 DFEIGVVIVR ISQGFDISPV LQVQDELEKL EQERLALAEA IKDNECEEK 850
 GGIRGLFKKA GKLNITKPAP KKGGNISSIQ SMHVGEFNQK LVEASAQFKK 900
 KQKGTIDVW WLFDDGGLTL LIPYILTLRK KWKDCKLRIY VGGKINRIEE 950
 EKISMASLLS KFRIKPADIH IIGDINIKPN KESWKVFEEI IEPYRLHESH 1000
 KDLTTAEKLE RESPWKITDA ELEAVKEKSY RQVRLNELLO EHSRAANLIV 1050
 LSLPVARCKG ISDLLYMAWL EILTKNLPPV LLVRGNHKNV LTFEYS 1095

Fig. 1. Sequences of full-length mBSC1 clones. A: deduced amino acid sequence of the mBSC1-A4 protein (C4.0 cDNA). COOH-terminal amino acids unique to this isoform are indicated with underscore (at bottom). Membrane spanning domains, predicted as in Ref. 10, are indicated by bold brackets (M1-M12), and the A cassette is enclosed by a box. ♦, predicted N-linked glycosylation sites; ●, predicted phosphorylation sites for protein kinase A (PKA); and ○, protein kinase C (PKC) sites. B: deduced COOH-terminal amino acid sequence of the mBSC1 isoforms with the C9 3' end. Amino acids are depicted beyond the point where the mBSC1-A4 and mBSC1-F9 proteins diverge, for comparison to A. The last 14 amino acids common to both clones are indicated with underscore (at top). Predicted PKA and PKC sites are indicated as in A.

C9 clones were isolated. One full-length clone from each group, C4.0 (2,968 nucleotides) and C9.0 (4,605 nucleotides), was sequenced in entirety on both strands. The sequence of C4.0 has been deposited in GenBank (accession no. U61381) as mBSC1-A4, where "A" refers to the A exon cassette and "4" refers to the C4 3' end (see below); the C9.0 sequence was deposited as mBSC1-F9 (accession no. U94518).

The 5'-UTR of the two cDNAs are identical, although that of C4.0 extends a further 22 bases 5' of C9.0. The

initiation ATG codon is located at nucleotide 202 in C4.0 and nucleotide 180 in C9.0, and the sequence of the C4.0 and C9.0 clones contain single open-reading frames of 2,310 nucleotides (770 amino acids) and 3,285 nucleotides (1,095 amino acids), respectively. The amino acid sequence of the C4.0 cDNA (mBSC1-A4) is displayed in Fig. 1 A. The first 209 codons of the two clones encode identical amino acids, except for codon 11, which encodes a histidine in C9.0 and a proline in C4.0 (see below). After the cassette exons (see below), the 3' ends

of the two clones are identical, until nucleotide 2345 in C4.0 and 2323 in C9.0. The last 165 nucleotides of the coding region of the C4.0 cDNA are distinct from that of the C9.0 cDNA, as is its predicted 3'-UTR. The 3'-UTRs of the C4.0 and C9.0 cDNAs are 445 and 1,130 bases long, respectively; both contain polyadenylation signals just 5' of the poly(A)⁺ tail.

Three mutually exclusive exon cassettes, denoted A, B, and F, have been described near the 5' end of rabbit and mouse BSC1 partial cDNA clones (14, 24). The length of these exons in the mBSC1 gene is 96 nucleotides, encoding 31 amino acids (14). Eight different C4 clones (C4.0-4.7) were found to contain the murine A cassette, whereas the two longest C9 clones, C9.0 and C9.1, contained the F cassette. The A cassette extends from nucleotide 818-913 in C4.0, and the F cassette extends from nucleotides 796-891 in C9.0. The B cassette was independently cloned from mouse renal cortex by RT-PCR. The amino acid sequences of the three cassette exons are identical to those reported by Igarashi et al. (14).

The predicted membrane topology of the electroneutral cation-chloride cotransporter family (14, 21) is preserved in both of the full-length mBSC1 clones, with up to 12 hydrophobic potential membrane-spanning domains flanked by hydrophilic NH₂- and COOH-terminal domains. The cassette exons are predicted to comprise most of the second transmembrane domain, extending 10-13 amino acids into a cytoplasmic loop. The C9 COOH-terminal domain, predicted to be cytoplasmic, is 457 amino acids in length; residues distinct from the C4 isoforms are displayed in Fig. 1B. In contrast, the cytoplasmic COOH-terminal domain of the C4 isoforms is 132 amino acids long, 325 amino acids shorter than that of the C9 isoforms, and the last 55 amino acids of C4 are distinct (Fig. 1A). The COOH-terminal 55 amino acids of the C4 isoforms have only limited homology to other proteins, including other members of the electroneutral cotransporter family.

The mBSC1-F9 isoform (C9.0 cDNA) shares 98% and 96% sequence identity with rBSC1-F and rabNKCC2-F, respectively. Although essentially identical to the previously reported mBSC1/NKCC2 sequence (14), it differs at a total of 49 nucleotides scattered throughout the sequence. Seven of these differences are nonconservative, predicting different amino acids (residues 11, 30, 48, 599, 773, 873, and 946). Three of these amino acids, residues 30, 48, and 599, are present and identical in the C4.0 sequence, and in all but one instance (the glycine at position 873) the predicted amino acid in the mBSC1 clones is identical to rBSC1 and rabNKCC2. However, partial mNKCC2 cDNA clones were derived from a different mouse strain (BALB/c vs. CD-1), and thus the discordance between the mBSC1 and mNKCC2 sequences may reflect polymorphism between strains. To investigate the variance between the C4.0 and C9.0 cDNAs at codon 11, nucleotides 73 through 238 of C9.0 were amplified by RT-PCR from CD-1 kidney (data not shown) and subcloned in the *Eco*R V site of pBluescript. Seventeen recombinant clones were picked at random

and sequenced; eight cDNAs had CAC (histidine) at codon 11 and nine cDNAs had a CCC (proline) at this codon, suggesting polymorphism within the CD-1 strain.

The seven protein kinase C (PKC) consensus phosphorylation sites predicted from the rBSC1 sequence are conserved in C9, two in the NH₂-terminal domain (Ser⁵⁷ and Thr⁷⁵) and five in the COOH-terminal domain (Thr⁶³⁹, Thr⁹²⁷, Ser⁹⁸³, Ser⁹⁹⁹, and Ser¹⁰²⁰) (Fig. 1, A and B). Two of the three protein kinase A (PKA) sites in the COOH-terminal domain of rabNKCC2 and rBSC1 are preserved in the C9 COOH terminus (Ser¹⁰¹³ and Ser¹⁰⁶²). Both PKA consensus sites and three out of the four PKC consensus sites present in the C9 COOH-terminal domain are absent in the C4 COOH terminus. There are two PKC sites (Ser⁷⁵⁰ and Thr⁷⁶¹) and one PKA site (Thr⁷⁶¹) in the C4 COOH-terminal 55 amino acids (Fig. 1A). The threonine residue at position 761 is a predicted phosphorylation site for both PKA and PKC.

Detection and characterization of mBSC1 transcripts. Northern blots of outer medulla RNA (inner stripe) were performed with splice form-specific probes and with a probe containing sequences common to both isoforms (see MATERIALS AND METHODS). The C4-specific probe detected transcripts of 3.0, 7.4, and >9.0 kb (Fig. 2A). The C9-specific probe detected a 4.6-kb transcript (Fig. 2B). A survey of several tissues (data not shown) with the probe common to all mBSC1 isoforms confirms

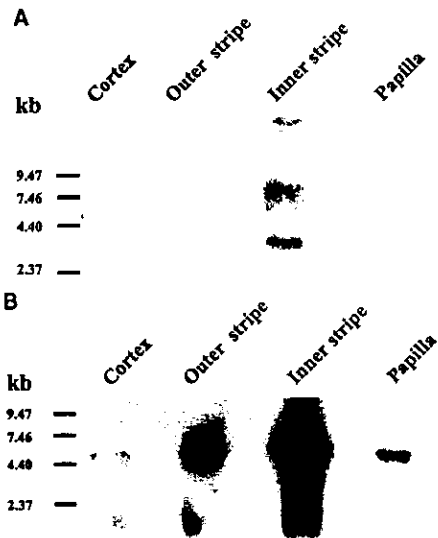


Fig. 2. Northern analysis of mBSC1 transcripts. A: C4-related transcripts; 2.5 μ g per lane of poly(A)⁺ RNA from murine kidney was probed at high stringency with a 382-bp C4-specific probe. Autoradiogram was exposed for 45 h. B: C9-related transcripts; 2.5 μ g per lane of poly(A)⁺ RNA from murine kidney was probed at high stringency with a 475-bp C9-specific probe, and autoradiogram was exposed overnight.

that expression of mBSC1 is specific to the kidney, as reported previously (14).

RT-PCR was first used to demonstrate that the C4 and C9 clones are derived from transcripts expressed in mouse kidney, using antisense primers specific for each 3' end. Specificity was verified for each primer pair (shown for C4 in Fig. 3A). The C9 primer pair does not amplify genomic DNA, whereas the C4-specific pair reproducibly amplifies a 1.3-kb fragment from genomic DNA (Fig. 3A) because of the intervening intron of 750 bp (Fig. 4B). Both primer pairs amplify bands of the appropriate size from cortex and from inner and outer stripe of outer medulla (Fig. 3, B and C); identity was confirmed by subcloning and sequencing of PCR products.

The combination of three 5' and two 3' alternative splicing events suggested a possible total of six different expressed isoforms, two of which were represented by the C4.0 (mBSC1-A4) and C9.0 (mBSC1-F9) cDNA clones. Previous reports do not address this issue, because the partial clones obtained did not link all of the 5' cassettes to 3' coding sequences (10, 14, 24). Partial cDNAs representative of the four remaining isoforms were cloned from poly(A)⁺ RNA by RT-PCR, using the appropriate combination of primers (Fig. 3D);

water controls for each primer pair were negative, and the relevant cDNA templates yielded major PCR bands of the same size as RT⁺ RNA (data not shown). Higher molecular weight bands were also seen for mBSC1-F4 and mBSC1-A9; these uncharacterized bands are not due to genomic amplification but likely reflect amplification of other templates. Guided by the reported intrarenal distribution of cassette exon transcripts (24), the two isoforms containing the B cassette were amplified from superficial renal cortex. The mBSC1-F4 and mBSC1-A9 isoforms were cloned from inner and outer stripe of outer medulla, respectively. Bands of the appropriate size were subcloned into the *Eco*R V site of pBluescript, and 5' and 3' insert ends were sequenced to verify the specificity of each primer pair. Figure 4A summarizes the cDNA clones identified by library screening and RT-PCR.

Chromosomal localization and genomic structure. SSCP analysis (4) was used to map mBSC1. Primers within the C9.0 3'-UTR were analyzed and found to identify an SSCP between inbred mouse strains. The BXH recombinant inbred series was genotyped and the strain distribution pattern analyzed using the Map Manager program (19). The mBSC1 gene was found to map to chromosome 2 with a LOD likelihood score of

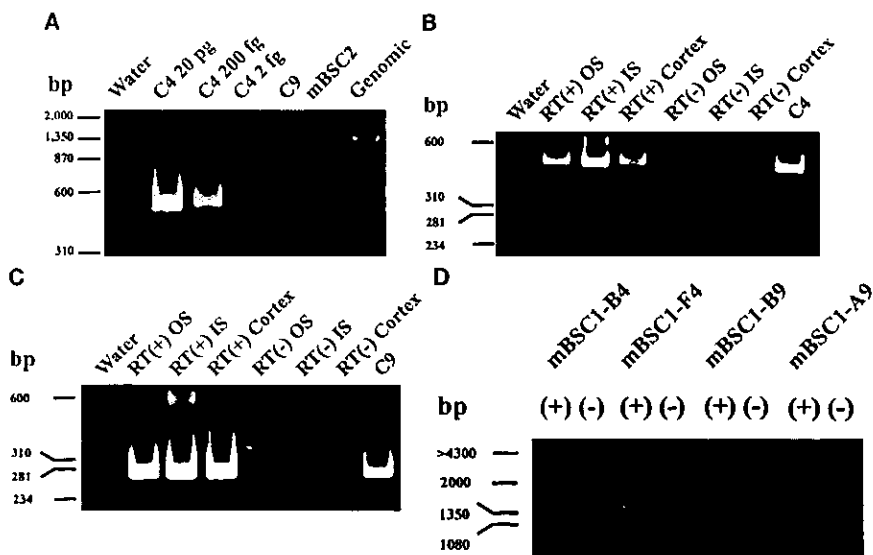


Fig. 3. RT-PCR of kidney RNA. Ethidium stained 6% polyacrylamide gels are displayed; one-fifth of each PCR reaction was loaded per lane. **A:** sensitivity and specificity of the C4-specific primer pair. Sense primer S1 and C4-specific antisense primer AS1 were tested on mBSC1 cDNA templates, mBSC2 cDNA, and on genomic DNA. **B:** RT-PCR of kidney with C4-specific primers; both RT-positive (RT⁺) samples and RT-negative (RT⁻) controls were amplified with C4-specific primer pair S1 and AS1 (amplification product 510 bp). **C:** RT-PCR of kidney with C9-specific primers S2 and AS2 (amplification product 278 bp). **D:** RT-PCR of kidney with cassette-specific sense primers and antisense primers specific for the C4 and C9 3' ends; +, RT⁺; -, RT⁻. Amplified cDNA was subcloned into pBluescript, generating the partial cDNA clones shown in Fig. 4A. mBSC1-B4 (1,602 bp) and mBSC1-B9 (1,692 bp) cDNAs were amplified from renal cortex. mBSC1-F4 cDNA (1,619 bp) was amplified from inner stripe (IS), and the mBSC1-A9 cDNA (1,668 bp) was amplified from outer stripe (OS) of outer medulla.

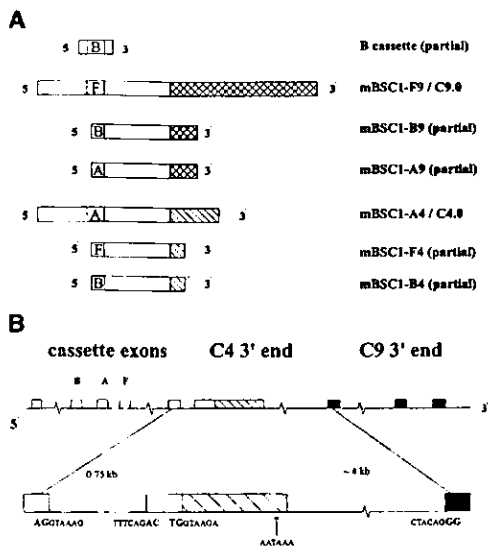


Fig. 4. *A*: schematic representation of full-length and partial cDNA clones, showing relative positions of the cassette exons (letters), C4 3' end (hatched), and C9 3' end (shaded). The two full-length clones were obtained by library screening, and partial clones were obtained by RT-PCR. *B*: partial representation of the mBSC1 gene, encompassing alternatively spliced exons; exon 16 encoding the C4 3' end (hatched), exons encoding the C9 3' end (solid), and the cassette exons (indicated by letters B, A, and F). The order of the cassette exons, different forms of coding exon 4, is from Ref. 14. The section of the gene encompassed by the 3 overlapping genomic clones is expanded (not drawn to scale). Donor and acceptor sites are provided under each exon-intron boundary, with the nucleotides within exons in larger, bold font. The alternative polyadenylation site (AATAAA) in the intron between coding exons 16 and 17 is indicated by an arrow.

3.6. No recombinants were found between mBSC1 and β_2 -microglobulin (6) in the 12 BXH strains (95% confidence interval: 0–18 cM). The mapping to mouse chromosome 2 is concordant with the localization determined using an informative *Taq*I restriction fragment length polymorphism (27).

Sequence comparison between the cDNA clones and genomic DNA (Fig. 4*B*) reveals an internal donor site, TGGTAAGAG (nucleotides 2342–2350 of C4.0), at the point at which the C4 and C9 clones diverge. This and other donor/acceptor sites in the genomic clones (Fig. 4*B*) conform to published consensus sequences (23). The exon encoding the C4 3' end is homologous to coding exon 16 of the human BSC1 gene, although it begins one codon later at the third nucleotide of codon 677. The alternative polyadenylation site found in the 3'-UTR of the C4.0 cDNA is identified within the intron between coding exons 16 and 17. Genomic PCR (data not shown) indicates that the C9 3' end is encoded by several exons, as demonstrated in the human gene (29).

Characterization of mBSC1 proteins. *In vitro* translation of the C4.0 and C9.0 cDNAs gave rise to proteins of

molecular masses of 77 ± 5 and 131 ± 18 kDa, respectively, versus the predicted masses of 83 and 120 kDa (Fig. 5*A*). The broad bands obtained on SDS-PAGE of the *in vitro* translation products are also seen with rBSC1 (10). Like rBSC1, the molecular weight of mBSC1 proteins is not affected *in vitro* by the addition of pancreatic microsomal membranes (data not shown), despite the presence of potential N-linked glycosylation sites (Fig. 1, *A* and *B*).

Western blots were performed with a polyclonal antibody that is predicted to react with C9 proteins and not C4 (see MATERIALS AND METHODS). This antibody reacts with a doublet of ~ 150 kDa, ~ 30 kDa heavier than the predicted core protein, in a membrane fraction of outer medulla (Fig. 5*B*). The use of a lower percentage polyacrylamide gel than in our previous study (16) permitted the resolution of the mBSC1 protein into two distinct bands, likely differentially glycosylated forms. Attempts to deglycosylate the rat and mouse proteins recognized by this antibody have not been successful (data not shown). However, both NH₂-terminal (8) and COOH-terminal antibodies to BSC1 (16) recognize a protein of 150–160 kDa.

Western blotting was also performed with an antibody generated against a peptide from the unique COOH terminus of the C4 isoforms. One of two rabbits immunized with this antigen generated antiserum that reacts with a doublet of ~ 120 kDa (Fig. 5*C*). Again, attempted deglycosylation of this protein was not successful. All of the cation-chloride cotransporters are glycoproteins, and alternative splicing does not change the putative glycosylation sites in the extracellular loop of mBSC1 C4 isoforms. Because the molecular mass of the C9 isoforms is ~ 30 –40 kDa higher than that of the core protein (Fig. 5*B* and Ref. 8), the expected molecular mass of glycosylated C4 proteins is in the range of 110–120 kDa, as seen with the C4 antibody. Affinity-purified antibody recognizes a protein of the same molecular weight in both cortex and outer medulla, and reactivity is abolished by preabsorption with antigen (Fig. 5*D*).

Intrarenal localization of mBSC1 COOH-terminal isoforms. Localization of mBSC1 COOH-terminal isoforms in mouse kidney was assessed using affinity-purified isoform-specific antibodies in immunohistochemistry, immunofluorescence (IF), and differential interference contrast with immunofluorescence (DIC-IF). The anti-C4 antibody detected mBSC1 C4 isoforms within TAL cells in the inner stripe of outer medulla (Fig. 6*A*), and staining with antigen-absorbed antibody was negative (Fig. 6*C*). However, as shown by high-magnification DIC-IF images in Fig. 6, *B* and *D*, staining was heterogeneous with not all cells being labeled. In Fig. 6*D*, mBSC1 C4-positive and -negative cells within a tubule profile are indicated by white and black arrows, respectively. The qualitative degree of heterogeneity in outer and inner stripe of outer medulla appeared to be equivalent (data not shown). Reactivity to the anti-C4 antibody was also detected in the CTAL; however, the proportion of positive cells appeared to be lower than in outer medulla (Fig. 6*E*).

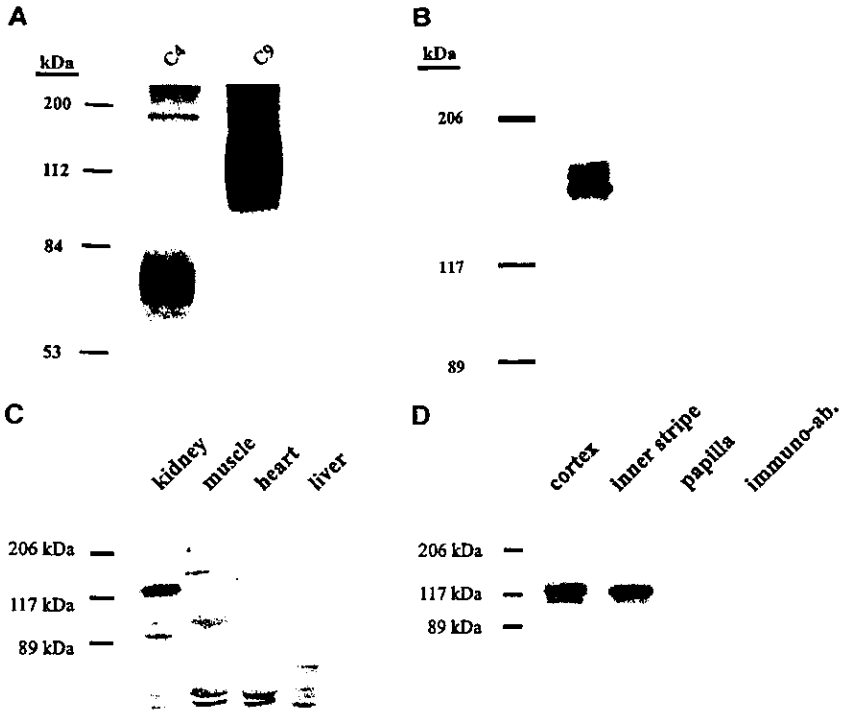
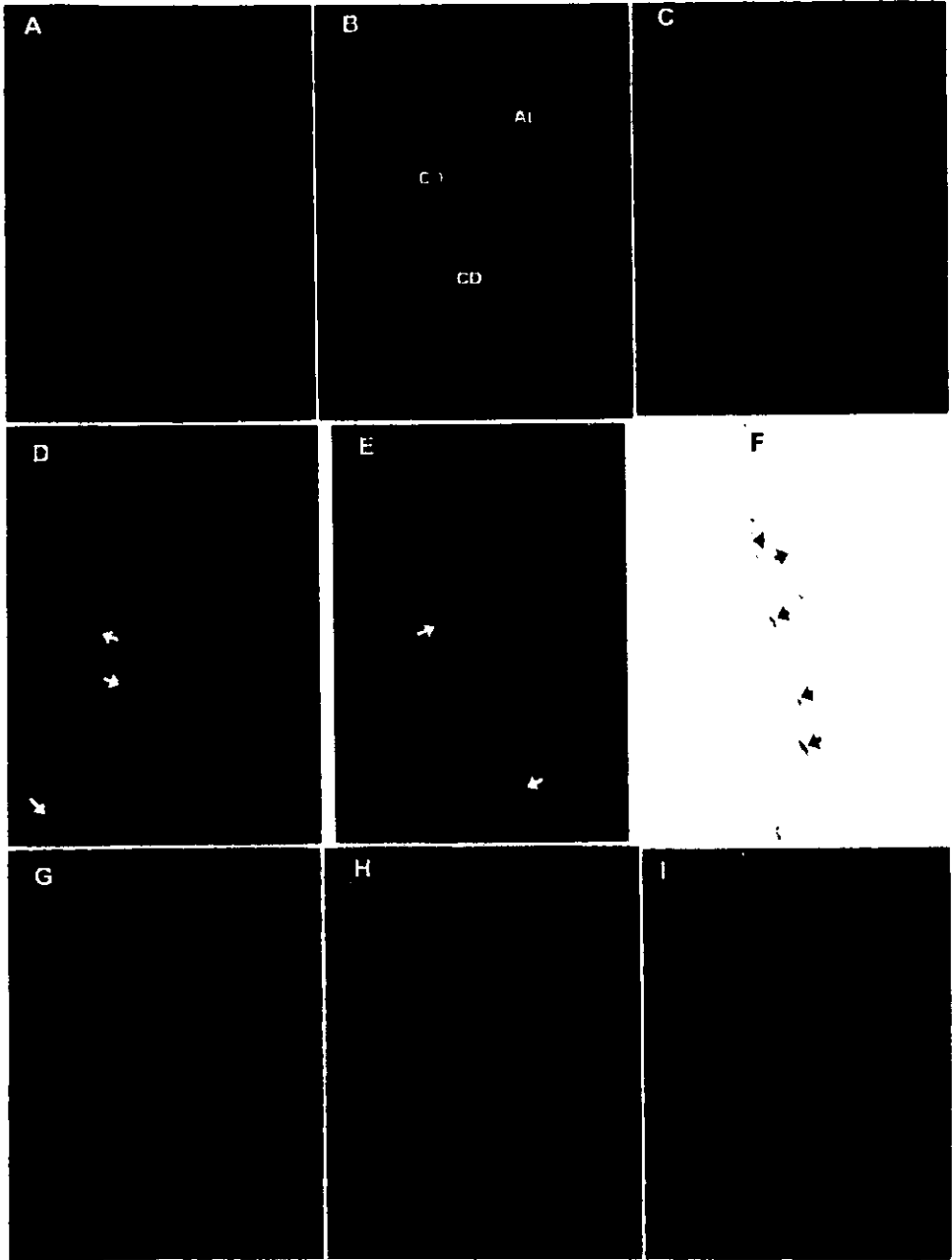


Fig. 5. Characterization of mBSC1 proteins. *A*: in vitro translation of mBSC1 proteins. Autoradiography of a 10% SDS-PAGE gel showing the in vitro translation products of the C4.0 and C9.0 cDNAs, exposed overnight. *B*: Western blot of outer medulla membrane protein (125 µg, 6% SDS-PAGE) with the C9-specific antibody (ECL system, 30-s exposure). *C*: Western blot of membrane protein (150 µg/lane) from several tissues, including kidney (inner stripe of outer medulla), with immune serum generated against amino acids 735-749 of the predicted mBSC1 C4 isoforms (ECL system, 10-min exposure). *D*: Western blot of renal membrane protein (150 µg/lane for inner stripe and papilla, 250 µg/lane for cortex), using affinity-purified C4 antibody (1:150 titer, ECL, 2-min exposure) and immunoabsorbed ("immuno-ab.") affinity-purified C4 antibody (150 µg of inner stripe membrane protein, 1:150 antibody titer, ECL, 48 h exposure).

As one progressed up individual tubule profiles into the cortex from the outer stripe, C4-positive cells became less frequent (Fig. 6*E*). Immunohistochemistry was more sensitive in detecting positive cells in CTAL (Fig. 6*F*); however, heterogeneous staining was still apparent.

In comparison with the results with anti-C4 antibody, labeling of mouse TAL with the anti-C9 antibody was much more uniform, in both outer medulla and cortex (Figs. 6, *G* and *H*), as previously shown in the rat (16, 34). Labeling of the apical membrane was also very distinct (Fig. 6*I*). In contrast, although labeling with

Fig. 6. Immunolocalization of mBSC1 isoforms within mouse kidney. *A*: Immunofluorescence (IF) of inner stripe of outer medulla (×400) stained with anti-C4 mBSC1 antibody. *B*: combined differential interference contrast (DIC) and IF of inner stripe stained with anti-C4 mBSC1 antibody (×600). Staining of tubular cells within thick ascending limb (TAL) is appreciated, with negative staining of outer medullary collecting duct (CD). *C*: negative DIC-IF (×400) of inner stripe of outer medulla stained with immunoabsorbed anti-C4 antibody. *D*: combined DIC-IF (×1,000) of inner stripe stained with anti-C4 antibody. In one tubular profile, black arrows indicate TAL cells with minimal staining and white arrows indicate strongly positive cells. *E*: combined DIC-IF (×1,000) of two medullary rays stained with anti-C4 antibody, extending from outer stripe of outer medulla (at bottom) into cortex. Positive cells are indicated by arrows. *F*: immunohistochemistry of a medullary ray stained with anti-C4 antibody. Positive cells are indicated by arrows. *G*: IF (×400) of inner stripe stained with anti-C9 mBSC1 antibody. *H*: IF (×400) of cortex stained with anti-C9 mBSC1 antibody. *I*: combined DIC-IF (×600) of inner stripe stained with anti-C9 antibody



the anti-C4 antibody showed apical predominance. Subapical labeling was also seen (Fig. 6, A, B, D, and E).

DISCUSSION

We report here the isolation and sequence of two full-length cDNAs, designated mBSC1-A4 (C4.0, 3.0 kb) and mBSC1-F9 (C9.0, 4.6 kb), encoding the mouse apical or absorptive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter mBSC1. The two clones are generated by alternative splicing and differ in the incorporation of both 5' and 3' exons. The predicted membrane topology of both proteins is identical to other members of this family, and mBSC1-F9 is the murine homolog of rBSC1 and rabNKCC2. The shorter cDNA, mBSC1-A4 (C4.0 clone), predicts truncation of the COOH-terminal cytoplasmic domain by 325 amino acids, with substitution of 55 new amino acids at the extreme COOH-terminal end.

Using both Northern blot analysis and RT-PCR, we have demonstrated that transcripts corresponding to the identified cDNA clones are expressed within mouse kidney. Northern analysis of outer medulla mRNA with the C9-specific probe reveals the expected 4.6-kb transcript. In addition to a 3.0-kb transcript corresponding to the C4.0 cDNA, two transcripts of 7.4 kb and >9 kb were detected in inner stripe of outer medulla using a C4-specific probe. The longer transcripts presumably differ in the length of the 3'-UTR. Although formal quantitation was not performed, C4-related transcripts are apparently expressed at much lower levels than C9 transcripts.

SSCP analysis was used to localize mBSC1 to mouse chromosome 2, tightly linked to β_2 -microglobulin; this mapping is consistent with that reported by Quaggin et al. (27), which it confirms by an independent method. Characterization of a 3' portion of the mBSC1 gene, encompassing the murine equivalent of human coding exon 16 (29), reveals an internal donor site in the coding sequence of the 3' end of the C4 isoforms (Fig. 2B). The bypass of this donor site and utilization of an alternative polyadenylation site, known mechanisms of alternative splicing (30), generate the unique 3' end of the C4 isoforms. The three cassette exons can pair with both alternative 3' ends, such that a total of six different isoforms were identified (Figs. 3D and 4A). The two splicing events are thus presumably independently regulated. The expression of the A, B, and F cassettes appears to be spatially restricted along the TAL (in outer stripe, cortex, and inner stripe, respectively) (14, 24). The C4 protein is detected at the apical membrane of the TAL (see below), thus the combined data indicate that cells in all segments of mouse TAL have the potential to express both COOH terminal paired with segment-specific exon cassettes.

To verify that the C4 isoforms are in fact translated in vivo, an important test for the relevance of alternatively spliced mRNAs, a peptide-specific C4 antibody was generated in rabbits. Western blotting with affinity-purified C4 antibody detects a protein of 120 kDa in a membrane fraction from outer medulla, and reactivity is abolished by preabsorption with antigen. This molecular weight corresponds to glycosylation of an 80-kDa

core protein, because glycosylation of other members of the cation-chloride cotransporter family adds ~30–40 kDa to the molecular mass of the transporter proteins (15, 18, 26). A previous study with an NH_2 -terminal BSC1 antibody, predicted to react with both C9 and C4 isoforms, did not report a protein of the molecular weight identified by the C4 antibody (8). Potential reasons for this discrepancy include the relative amount of membrane protein per lane [$1\text{--}3\ \mu\text{g}$ in Ecelbarger et al. (8) vs. $150\ \mu\text{g}$ in this study].

Western blotting of outer medulla with the C9 antibody detects a protein of ~150 kDa, the same size as the high-affinity bumetanide-binding protein detected in mouse outer medulla. The C9 protein is expressed at the apical membrane of epithelial cells in both the CTAL and MTAL. Expression in *Xenopus* oocytes of the three exon cassettes in the context of the longer C9 3' end results in bumetanide-sensitive, interdependent uptake of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (see companion study). The observation that all three are active in K^+ transport indicates that the cassette exons do not contribute directly to K^+ -independent $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransport (31).

The C4 antibody also labels the apical membrane of TAL cells. However, labeling is much more heterogeneous in all segments of the TAL, such that not all cells are positive. This is particularly true in CTAL (Fig. 6, E and F), and staining tends to decrease in frequency as one moves up individual medullary rays toward the cortex. The heterogeneity of staining within inner and outer stripe was roughly equivalent. Phenotypic heterogeneity of TAL is also detected with antibodies to the K^+ channel ROMK, which do not react with a subpopulation of rat TAL cells (34). Electron microscopy of rat TAL has previously identified two subtypes of TAL cells, "rough" and "smooth," which differ in the relative abundance of apical microvilli (1). In the hamster TAL, the relative frequency of these two cell types correlates closely with the proportion of cells having high and low apical K^+ conductance (32). The issue of which morphological subtype of TAL cells expresses ROMK and the mBSC1 C4 isoforms will require further study at the electron microscopy level.

In addition to the observed cellular heterogeneity, staining of TAL with the C4 antibody is not as sharply apically defined as that produced by the C9 antibody, suggesting a significant component of subapical expression (Fig. 6, A, B, D, and E). This will need to be confirmed by immunoelectron microscopy. BSC1 protein is detectable in a population of subapical vesicles (22), and trafficking of BSC1-containing vesicles to the apical membrane may be involved in regulation of salt transport in the TAL. The amino acids removed and/or added to the COOH termini of the C4 isoforms may affect the interaction of mBSC1 with components of subapical vesicles and/or the cytoskeleton (9). Coexpression of C9 and C4 isoforms in *Xenopus* oocytes reveals a dominant negative role for the truncated C4 isoforms, an effect that is reversed by cAMP (25). The dominant negative effect of the C4 isoforms may depend on differential sorting to the plasma membrane. Specifically, since BSC1 proteins evidently form multimers

(17), membrane trafficking may be attenuated for C9 isoforms "trapped" by coassociation with C4 isoforms. Alternatively, the C4 COOH terminus may function to block ion permeation through the transporter complex, analogous to the effect of the COOH terminus of the ENaC β -subunit on the open probability of epithelial Na⁺ channels (3).

Alternative splicing at the 3' end of mBSC1 alters the consensus sites for PKC- and PKA-dependent phosphorylation (Fig. 1, A and B). The C4 protein contains a cluster of potential phosphorylation sites in the last 20 amino acids of its unique COOH terminus, with two PKC sites and one PKA site not found in C9. In addition, three of four PKC sites and the two PKA sites in the COOH terminus of C9 are absent in C4. Similar modulation of predicted phosphorylation sites occurs in mBSC2, for which alternative splicing of exon 21 creates isoforms that lack a PKA site (28). Although there is as yet no data on the direct phosphorylation of mBSC1, several hormones activate adenylate cyclase and PKA in mouse TAL, with subsequent stimulation of ion transport. Full-length C9 isoforms are not activated by cAMP when expressed in *Xenopus* oocytes (25). However, coexpression with C4 isoforms reconstitutes a response of mBSC1 isoforms to cAMP. The observed decrease in the frequency of C4-positive cells in the mouse CTAL may explain the relative resistance of this segment to vasopressin (13) because the lower abundance of mBSC1 isoforms with a C4 COOH terminus would affect stimulation of ion transport by cAMP.

In summary, a truncated mBSC1 COOH terminus is generated by alternative splicing of the intron between exons 16 and 17. The combinatorial association of both truncated (C4) and full-length (C9) 3' ends with three alternative versions of coding exon 4 (cassette exons A, B, and F) generates a total of six alternatively spliced isoforms. Both truncated and full-length isoforms are translated in mouse kidney and are coexpressed within TAL. As demonstrated in the companion study (25), truncated C4 isoforms are not functionally active in *Xenopus* oocytes. However, these isoforms have a dominant negative effect when coexpressed with the longer isoforms. This effect is reversed by cAMP, suggesting a role for such interactions in regulating salt transport within TAL.

This work was supported by grants from the National Institutes of Health to S. C. Hebert (DK-36803), D. R. Beier (HD-29028 and HG-00951), and D. B. Mount (DK-02103) and by grants from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT, M3840) and Howard Hughes Medical Institute (75197-553601) to G. Gamba. A. Baekgaard was supported by the Danish Research Council (11-9735, 11-0272, 11-0897) and by the King Kristian the Tenth Foundation (0204-0096-006317). C. Plata was supported by scholarship grants from CONACYT and DGAPA.

Portions of this work were presented at the Annual Meetings of the American Society of Nephrology and have been published in abstract form (*J. Am. Soc. Nephrol.* 5: 282, 1994; *J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 347, 1995; and *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 1288, 1996).

D. B. Mount and A. Baekgaard contributed equally to this study. Address for reprint requests: D. B. Mount, Renal Division, Vanderbilt Univ., MCN S 3223, Nashville, TN 37232 [E-mail: david.mount@memail.vanderbilt.edu].

Received 15 June 1998; accepted in final form 30 October 1998.

REFERENCES

- Allen, F., and C. C. Tisher. Morphology of the ascending thick limb of Henle. *Kidney Int.* 9: 8-22, 1976.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997.
- Awayda, M. S., A. Tousson, and D. J. Benos. Regulation of a cloned epithelial Na⁺ channel by its β - and γ -subunits. *Am. J. Physiol.* 273 (*Cell Physiol.* 42): C1889-C1899, 1997.
- Beier, D. R. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genetic mapping. *Mamm. Genome* 4: 627-631, 1993.
- Brown, D., J. Lydon, M. McLaughlin, A. Stuart-Tilley, R. Tyszkowski, and S. Alper. Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochem. Cell Biol.* 105: 261-267, 1996.
- Chorney, M., F. W. Shen, J. Michaelson, and E. A. Boyse. Monoclonal antibody to an alloantigenic determinant on β 2-microglobulin (β -2M) of the mouse. *Immunogenetics* 16: 91-93, 1982.
- Delpire, E., M. I. Rauchman, D. R. Beier, S. C. Hebert, and S. R. Gullans. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *J. Biol. Chem.* 269: 25677-25683, 1994.
- Ecelbarger, C. A., J. Terris, J. R. Hoyer, S. Nielsen, J. B. Wade, and M. A. Knepper. Localization and regulation of the rat renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter, BSC-1. *Am. J. Physiol.* 271 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 40): F619-F628, 1996.
- Ehlers, M. D., E. T. Fung, R. J. O'Brien, and R. L. Huganir. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J. Neurosci.* 18: 720-730, 1998.
- Gamba, G., A. Miyanosita, M. Lombardi, J. Lytton, W. S. Lee, M. A. Hediger, and S. C. Hebert. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* 269: 17713-17722, 1994.
- Gamba, G., S. N. Saltzberg, M. Lombardi, A. Miyanosita, J. Lytton, M. A. Hediger, B. M. Brenner, and S. C. Hebert. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2749-2753, 1993.
- Haas, M., P. B. Dunham, and B. Forbush III. [³H]bumetanide binding to mouse kidney membranes: identification of corresponding membrane proteins. *Am. J. Physiol.* 260 (*Cell Physiol.* 29): C791-C804, 1991.
- Hebert, S. C., R. M. Culpepper, and T. E. Andreoli. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated Na⁺-Cl⁻ cotransport. *Am. J. Physiol.* 241 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 10): F412-F431, 1981.
- Igarashi, P., G. B. Vanden Heuvel, J. A. Payne, and B. Forbush III. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am. J. Physiol.* 269 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 38): F405-F418, 1995.
- Kaplan, M. R., M. D. Plotkin, D. Brown, S. C. Hebert, and E. Delpire. Expression of the mouse Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter, mBSC2, in the terminal inner medullary collecting duct, the glomerular and extraglomerular mesangium, and the glomerular afferent arteriole. *J. Clin. Invest.* 98: 723-730, 1996.
- Kaplan, M. R., M. D. Plotkin, W. S. Lee, Z. C. Xu, J. Lytton, and S. C. Hebert. Apical localization of the Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int.* 49: 40-47, 1996.
- Lee, A. J., J. M. Bradford, J. M. Terris, M. A. Knepper, and C. A. Ecelbarger. The type 1 bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (BSC1) exists in the plasma membrane as a high molecular weight oligomeric complex (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 37, 1997.

18. Lytle, C., J. C. Xu, D. Biemesderfer, and B. Forbush III. Distribution and diversity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.* 269 (*Cell Physiol.* 38): C1496-C1505, 1995.
19. Manly, K. F. A Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data. *Manim. Genome* 4: 303-313, 1993.
20. Molony, D. A., W. B. Reeves, S. C. Hebert, and T. E. Andreoli. ADH increases apical $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am. J. Physiol.* 252 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 21): F177-F187, 1987.
21. Mount, D. B., R. S. Hoover, and S. C. Hebert. The molecular physiology of electroneutral cation-chloride cotransport. *J. Membr. Biol.* 158: 177-186, 1997.
22. Neilsen, S., A. B. Maunsbach, D. Ecelbarger, and M. A. Knepper. Cellular and subcellular localization of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ co-transporter BSC-1 in apical plasma membrane and vesicles of thick ascending limb and macula densa cells (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 40, 1997.
23. Padgett, R. A., P. J. Grabowski, M. M. Konarska, S. Seiler, and P. A. Sharp. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 1119-1150, 1986.
24. Payne, J. A., and B. Forbush III. Alternatively spliced isoforms of the putative renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4544-4548, 1994.
25. Plata, C., D. B. Mount, V. Rubio, S. C. Hebert, and G. Gamba. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL. II. Functional characterization and activation by cAMP. *Am. J. Physiol.* 276 (*Renal Physiol.* 45): F359-F366, 1999.
26. Plotkin, M. D., M. R. Kaplan, J. W. Verlander, W.-S. Lee, D. Brown, E. Poch, S. R. Gullans, and S. C. Hebert. Localization of the thiazide-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int.* 50: 174-183, 1996.
27. Quaggin, S. E., J. A. Payne, B. Forbush III, and P. Igarashi. Localization of the renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter gene (Slc12a1) on mouse chromosome 2. *Mamm. Genome* 6: 557-558, 1995.
28. Randall, J., T. Thorne, and E. Delpire. Partial cloning and characterization of Slc12a2: the gene encoding the secretory $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter. *Am. J. Physiol.* 273 (*Cell Physiol.* 42): C1267-C1277, 1997.
29. Simon, D. B., F. E. Karet, J. M. Hamdan, A. DiPietro, S. A. Sanjad, and R. P. Lifton. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter NKCC2. *Nat. Genet.* 13: 183-188, 1996.
30. Smith, C. W., J. G. Patton, and B. Nadal-Ginard. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* 23: 527-577, 1989.
31. Sun, A., E. B. Grossman, M. Lombardi, and S. C. Hebert. Vasopressin alters the mechanism of apical Cl^- entry from $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ to $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport in mouse medullary thick ascending limb. *J. Membr. Biol.* 120: 83-94, 1991.
32. Tsuruoka, S., C. Koseki, S. Muto, K. Tabei, and M. Imai. Axial heterogeneity of potassium transport across hamster thick ascending limb of Henle's loop. *Am. J. Physiol.* 267 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 36): F121-F129, 1994.
33. Vargas-Poussou, R., D. Feldmann, M. Vollmer, M. Konrad, L. Kelly, L. P. van den Heuvel, L. Tebourbi, M. Brandis, L. Karolyi, S. C. Hebert, H. H. Lemmink, G. Deschenes, F. Hildebrandt, H. W. Seyberth, L. M. Guay-Woodford, N. V. Knoers, and C. Antignac. Novel molecular variants of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter gene are responsible for antenatal Bartter syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1332-1340, 1998.
34. Xu, J. Z., A. E. Hall, L. N. Peterson, M. J. Bienkowski, and T. E. Eessalu, and S. C. Hebert. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am. J. Physiol.* 273 (*Renal Physiol.* 42): F739-F748, 1997.

Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL

II. Functional characterization and activation by cAMP

CONSUELO PLATA,¹ DAVID B. MOUNT,² VERENA RUBIO,¹
STEVEN C. HEBERT,² AND GERARDO GAMBA¹

¹Molecular Physiology Unit, Department of Nephrology and Mineral Metabolism, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán and Department of Medicine, Instituto de Investigaciones Biomédicas, National University of Mexico, Mexico City CP 14000, Mexico; and ²Division of Nephrology, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee 37232

Plata, Consuelo, David B. Mount, Verena Rubio, Steven C. Hebert, and Gerardo Gamba. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL. II. Functional characterization and activation by cAMP. *Am. J. Physiol.* 276 (*Renal Physiol.* 45): F359-F366, 1999.—The functional properties of alternatively spliced isoforms of the mouse apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (mBSC1) were examined, using expression in *Xenopus* oocytes and measurement of ²²Na⁺ or ⁸⁶Rb⁺ uptake. A total of six isoforms, generated by the combinatorial association of three 5' exon cassettes (A, B, and F) with two alternative 3' ends, are expressed in mouse thick ascending limb (TAL) [see companion article, D. B. Mount, A. Baekgaard, A. E. Hall, C. Plata, J. Xu, D. R. Beier, G. Gamba, and S. C. Hebert. *Am. J. Physiol.* 276 (*Renal Physiol.* 45): F347-F358, 1999]. The two 3' ends predict COOH-terminal cytoplasmic domains of 129 amino acids (the C4 COOH terminus) and 457 amino acids (the C9 terminus). The three C9 isoforms (mBSC1-A9/F9/B9) all express Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport activity, whereas C4 isoforms are nonfunctional in *Xenopus* oocytes. Activation or inhibition of protein kinase A (PKA) does not affect the activity of the C9 isoforms. The coinjection of mBSC1-A4 with mBSC1-F9 reduces tracer uptake, compared with mBSC1-F9 alone, an effect of C4 isoforms that is partially reversed by the addition of cAMP-IBMX to the uptake medium. The inhibitory effect of C4 isoforms is a dose-dependent function of the alternatively spliced COOH terminus. Isoforms with a C4 COOH terminus thus exert a dominant negative effect on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport, a property that is reversed by the activation of PKA. This interaction between coexpressed COOH-terminal isoforms of mBSC1 may account for the regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in the mouse TAL by hormones that generate cAMP.

sodium-potassium-chloride cotransporter; bumetanide; protein kinase A; adenosine 3',5'-cyclic monophosphate; thick ascending limb of Henle; alternative splicing

SALT REABSORPTION in the thick ascending limb of Henle (TAL) involves the cooperation of apical bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport and apical K⁺ channels with basolateral Cl⁻ permeation pathways and basolateral Na⁺-K⁺-ATPase (33). The molecular identity of the involved transporters and channels is at least partially known, following the cloning of the

renal bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (BSC1/NKCC2) (8, 25), an apical inwardly rectifying K⁺ channel (ROMK) (12), and basolateral Cl⁻ channels (CLC-K1/K2 and CLCN-KA/KB; Ref. 27). Bartter's syndrome, an inherited metabolic alkalosis with profound defects in the function of the TAL, can be caused by mutations in BSC1/NKCC2 (30), ROMK (14, 31), or CLC-KNB (29), emphasizing the functional importance of each transport pathway.

We previously identified a cDNA (rBSC1) encoding the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter from outer medulla of rat kidney (8), and we detail the identification of six alternatively spliced isoforms of mouse BSC1 in the companion article (22). Similar cDNAs, designated NKCC2, have been isolated from rabbit (25), mouse (13), and human kidney (30). The BSC1 nomenclature will be used in this study. BSC1 is a renal-specific gene, and BSC1 protein is expressed at the apical membrane of medullary and cortical TAL (MTAL and CTAL, respectively) (6, 17). BSC1 is a member of the cation-chloride cotransporter gene family (23), with which it shares a putative membrane topology. Alternative splicing of coding exon 4 of the BSC1 gene, which encodes a portion of the predicted second transmembrane segment and the contiguous intracellular loop, involves three mutually exclusive cassette exons A, B, and F (13, 25). Heterologous expression of rBSC1-F in *Xenopus laevis* oocytes clearly induces a bumetanide-sensitive Na⁺- and Cl⁻-dependent uptake of ⁸⁶Rb⁺, a substitute for K⁺ (8). A chimeric rabbit BSC2/BSC1-A cDNA, which directs the synthesis of a protein with the amino-terminal domain of shark BSC2 fused to the remainder of rabbit BSC1-A, is also active as a bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (15). However, functional expression of all three cassette exons in a full-length BSC1 cDNA has not been reported.

Several hormones, including vasopressin, activate adenylate cyclase in mouse TAL and thus generate cAMP (3). The subsequent activation of protein kinase A (PKA) stimulates transepithelial ion transport. Vasopressin stimulates apical K⁺ conductance in mouse TAL (10), and direct phosphorylation by PKA is required for full activity of the ROMK K⁺ channel (34). Basolateral chloride conductance can also be stimulated by PKA, although this mechanism may be redundant at physiological intracellular Cl⁻ concentrations (27). Vasopressin appears to directly activate the apical

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter (BSC1) in mouse TAL (21); however, the mechanism of this stimulation has not been addressed at the molecular level. Moreover, intriguing functional observations have been made in mouse TAL. First, there appears to be heterogeneity in at least the magnitude of the effect of cAMP in MTAL vs. CTAL, since vasopressin has little to no effect on $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ absorption in the latter segment (11). Second, vasopressin can switch cotransport in mouse MTAL from a completely K^+ -independent, but bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ mode to a K^+ -dependent, bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ mode (32). This latter phenomenon has implications for the cellular physiology of the MTAL, where K^+ -recycling is largely responsible for the generation of the positive luminal potential difference that drives paracellular cation transport (9, 33). Evidence for K^+ -independent $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransport has also been obtained for rabbit (1) and rat outer medulla (20).

Another level of regulation of apical $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport appears to involve alternative splicing, as characterized in the companion article (22). In addition to the three full-length mBSC1 isoforms with the previously described A, B, and F cassettes, three new mBSC1 isoforms have been identified, resulting from the combination of alternative splicing at the 5' end with alternative splicing of the 3' end. This alternative 3' end arises from the utilization of a polyadenylation site in the intron between coding exons 16 and 17 and predicts a protein with a shorter COOH-terminal domain. This splicing event appears to be independent of the splicing of exon 4, such that a total of six isoforms are produced in mouse kidney. We have designated the longer "default" COOH-terminal domain as "C9" and the truncated COOH-terminal domain as "C4." In the present study, we describe the functional characteristics of these isoforms, demonstrating $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport for the C9 isoforms and a dominant negative effect of the C4 isoforms that is modulated by cAMP-dependent processes.

METHODS

Animals and materials Adult female *X. laevis* frogs were purchased from Carolina Biological Supply (Burlington, NC) and from Nasco (Fort Atkinson, MI). Frogs were maintained at the animal facility under constant control of room temperature and humidity at 16°C and 65%, respectively. Frogs were fed with frog brittle dry food from Nasco, and water was changed twice a week. Tracer sodium ($^{22}\text{Na}^+$) and rubidium ($^{86}\text{Rb}^+$) were purchased from DuPont-NEN (Boston, MA). Ouabain, amiloride, bumetanide, IBMX, and general chemicals were from Sigma (St. Louis, MO). Dibutyryl-cAMP, collagenase B, and all restriction enzymes and other enzymes were from Boehringer (Mannheim, Germany) and New England Biolabs (Beverly, MA). *N*-(2[[3-(4-bromophenyl)-2-propenyl]-amido-ethyl]-5-isouquinolinesulfonamide (H-89) was from Calbiochem (La Jolla, CA).

***X. laevis* oocyte preparation and injection** Clusters of oocytes were surgically harvested from anesthetized frogs under 0.17% tricaine and incubated for 1 h with vigorous shaking at room temperature in Ca^{2+} -free ND-96 (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl_2 , and 5 HEPES-Tris, pH 7.4) and 2 mg/ml of collagenase B, after which oocytes were manually

defolliculated. Oocytes were incubated overnight at 17°C in ND-96 supplemented with 2.5 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin. On the next day, stage V-VI oocytes were injected with 50 nl of water or a solution containing cRNA at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (25 ng/oocyte). In coinjection experiments, oocytes were injected with 50 nl of a solution containing 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of each coinjected cRNA (50 ng/oocyte). After injection, oocytes were incubated at 17°C in ND-96 supplemented with 2.5 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin for 3 days. The oocyte incubation medium was changed every day. The day before the isotopic uptake experiment, oocytes were incubated overnight in Cl^- -free frog Ringer (in mM: 96 sodium isethionate, 2 potassium gluconate, 1.8 calcium gluconate, 1.0 magnesium gluconate, 5 HEPES, and 2.5 sodium pyruvate, as well as 5 mg/100 ml gentamicin, pH 7.4), to reduce cell Cl activity, increasing the driving force for tracer uptake and/or activating $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport (8).

Generation of mBSC1 cDNAs. The mBSC1 isoforms identified in the companion study (22) were assessed for functional activity. These isoforms are denoted by the relevant cassette exon (A, B, F) and alternative COOH terminus (C4 or C9) (22). Since mBSC1-A4 and mBSC1-F9 were isolated as full-length cDNA clones, they were not modified for this purpose. Full-length mBSC1-A9 and mBSC1-F4 were generated by interchanging A and F cassettes between mBSC1-A4 and mBSC1-F9, using unique *Nsi*I (nucleotide 752 of mBSC1-A4, 730 of mBSC1-F9; GenBank accession nos. U61381 and U94518, respectively) and *Bsm*I (nucleotide 1837 of mBSC1-A4; nucleotide 1859 of mBSC1-F9) sites on either side of the cassettes. The short B cassette cDNA (22) was lengthened by PCR to 318 nucleotides, using long primers which overlapped with its 5' and 3' ends. This PCR product was digested with *Nsi*I and *Afl*II (nucleotide 1049 of mBSC1-A4) and ligated into the *Nsi*I and *Afl*II sites of mBSC1-A4 to obtain mBSC1-B4; sequencing of the DNA between these two restriction sites verified the fidelity of the PCR. Full-length mBSC1-B9 was then generated by inserting the B cassette and flanking DNA into mBSC1-F9, using the unique *Bsm*I and *Nsi*I sites. The mBSC1 isoforms used in the present study are all in the plasmid pSPORT1 (GIBCO-BRL). To address the functional effect of the CCC-CAC (proline-histidine) polymorphism identified at codon 11 (22), this segment of the mBSC1-A9, mBSC1-B9, and mBSC1-F9 cDNAs was replaced with that of mBSC1-A4, using the *Nsi*I site and the *Kpn*I site in the 5' multicloning site of pSPORT1.

For preparation of cRNA template, each isoform cDNA was first linearized at the 3' end using *Not*I or *Xba*I restriction enzymes, and then cRNA was transcribed in vitro, using the T7 RNA polymerase in the presence of Cap analog (7-methyl GpppG; Boehringer Mannheim). Transcription product integrity was confirmed on agarose gels, and concentration was determined by absorbance reading at 260 nm (model DU 640; Beckman, Fullerton, CA). cRNA was stored frozen in aliquots at -80°C.

Functional characterization of mBSC1 isoforms Functional expression of mBSC1 isoforms was assessed by measuring tracer $^{22}\text{Na}^+$ or $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in groups of 20-25 oocytes 4 days after water or cRNA injection. $^{22}\text{Na}^+$ uptake was measured with the following protocol: a 30-min incubation period in a hypotonic K^+ - and Cl^- -free medium (in mM: 75 sodium gluconate, 6.0 calcium gluconate, 1.0 magnesium gluconate, and 5 HEPES-Tris, pH 7.4) with 1 mM ouabain, 100 μM amiloride, $\pm 100 \mu\text{M}$ bumetanide, $\pm 1 \text{ mM}$ dibutyryl-cAMP + 1 mM IBMX; followed by a 60-min uptake period in a hypotonic uptake medium (in mM: 62 NaCl, 10 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , and 5 HEPES-Tris, pH 7.4) containing 2.5

$\mu\text{Ci/ml}$ of $^{22}\text{Na}^+$ (DuPont-NEN) and the same drugs used during incubation period. The hypotonic conditions inhibit the endogenous oocyte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter (8). Ouabain was added to prevent Na^+ exit via $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, and amiloride prevents Na^+ uptake via Na^+ channels or $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporters. To determine the K^+ - and Cl^- -dependent fraction of Na^+ uptake, paired groups of oocytes were incubated in uptake media without Cl^- (substituted with gluconate) or without K^+ (substituted with *N*-methyl-D-glucamine (NMDG)).

$^{86}\text{Rb}^+$ uptake was assessed using the following protocol. A 30-min incubation period in a hypotonic $\text{Na}^+\text{/K}^+$ -free solution (in mM: 75 NMDG- Cl^- , 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , and 5 HEPES-Tris, pH 7.4) with 1 mM ouabain \pm 100 μM bumetanide, followed by a 60-min uptake period using a hypotonic uptake medium (in mM: 58 NaCl, 2 KCl, 10 BaCl_2 , 1.8 CaCl_2 , 1.0 MgCl_2 , and 5.0 HEPES, pH 7.4) with 1 mM ouabain, \pm 100 μM bumetanide, and 10 $\mu\text{Ci/ml}$ of $^{86}\text{Rb}^+$, specific activity 0.57 $\mu\text{Ci/nmol}$ (DuPont-NEN). For ion-dependency experiments, Na^+ was replaced in the uptake solution by NMDG and Cl^- was replaced by gluconate.

All uptakes were performed at 30°C and were linear over the first 60 min. At the end of the uptake period, oocytes were washed five times in ice-cold uptake solution without isotope to remove extracellular fluid tracer. After the oocytes were dissolved in 10% SDS, tracer activity was determined by beta scintillation counting. The degree of variability between experiments is due to seasonal variations in the quality of oocytes, as well as the relative quality of cRNA. Thus experiments were compared with internal controls done under identical conditions, using oocytes prepared from the same donor.

Statistical analysis. Statistical significance is defined as two-tailed $P < 0.05$, and the results are presented as means \pm SE. The significance of the differences between groups were tested by one-way ANOVA with multiple comparison using Bonferroni correction or by the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks with the Dunn method for multiple comparison procedure, as needed.

RESULTS

Expression of mBSC1 C9 isoforms in *Xenopus* oocytes. Microinjection of *Xenopus* oocytes with cRNA in vitro transcribed from the C9 isoforms mBSC1-F9, mBSC1-A9, and mBSC1-B9 resulted in significant increases in $^{22}\text{Na}^+$ uptake when compared with water-injected oocytes. As Fig. 1A shows, the increased Na^+ uptake observed in oocytes with the three C9 isoforms was K^+ dependent, Cl^- dependent, and bumetanide sensitive. In addition, Fig. 1B shows that the three C9 isoforms also exhibit increased tracer Rb^+ uptake that was Na^+ -dependent, Cl^- dependent, and bumetanide sensitive. Furthermore, the mBSC1-F9, mBSC1-A9, and mBSC1-B9 cDNAs containing the polymorphism CCC (proline) or CAC (histidine) at the codon 11 in the NH_2 -terminal domain (22) also induced $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport in oocytes (data not shown). Therefore, the three C9 isoform cDNAs containing the A, B, or F cassette exons within the putative second transmembrane domain encode bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporters, under the conditions utilized.

Since $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ transport in TAL is affected by cAMP and PKA (21), initial experiments addressed the regulation of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ transport by PKA, using

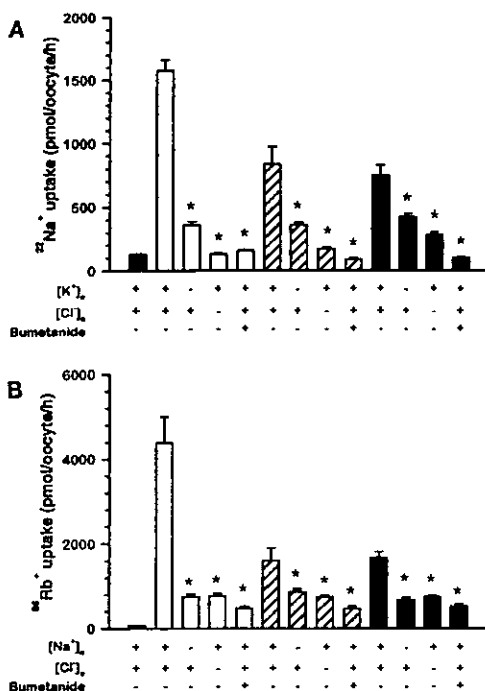
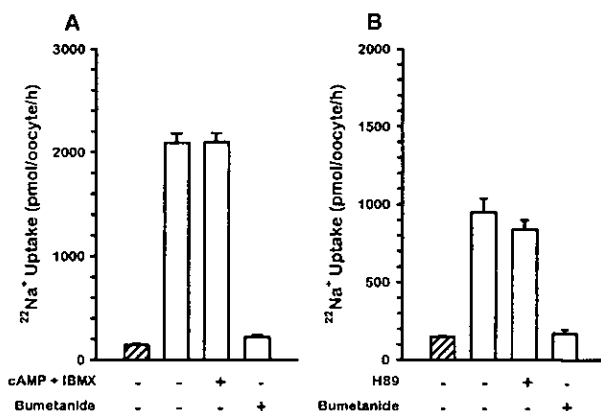


Fig. 1. Functional expression of mBSC1-9 isoforms in *X. laevis* oocytes injected with water (solid bars) or with 25 ng of cRNA from either mBSC1-F9 (open bars), mBSC1-A9 (hatched bars), or mBSC1-B9 (shaded bars). A: $^{22}\text{Na}^+$ uptake in groups of oocytes that were exposed to tracer Na^+ in presence or absence of extracellular K^+ (i.e., $[\text{K}^+]_o$), Cl^- ($[\text{Cl}^-]_o$), or bumetanide, as indicated. B: $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in absence or presence of extracellular Na^+ , Cl^- or bumetanide. * Significant difference ($P < 0.001$) from uptakes in presence of Na^+ , K^+ , and Cl^- .

oocytes expressing the full-length, functional C9 isoforms. Figure 2A depicts the pooled results from seven experiments in which oocytes were obtained from different frogs. mBSC1-F9-injected oocytes expressed increased tracer Na^+ uptake that was completely abolished in the presence of 100 μM bumetanide but which was not affected by the addition of a cell membrane-permeable analog of cAMP plus the phosphodiesterase inhibitor IBMX to the uptake medium ($2,090 \pm 93$ vs. $2,102 \pm 87$ pmol \cdot oocyte $^{-1} \cdot$ h $^{-1}$, respectively; $P =$ not significant). In addition to this finding, Fig. 2B shows the pooled results from three experiments in which increased Na^+ uptake induced by mBSC1-F9 cRNA injection into oocytes was not affected by the addition of the PKA inhibitor H-89 to the uptake medium. Equivalent results were obtained with mBSC1-A9 (data not shown). Thus the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport induced by heterologous expression of mBSC1 C9 isoforms was not affected by PKA activation with cAMP-IBMX or by direct inhibition of the endogenous PKA activity.

Fig. 2. Effects of cAMP on $^{22}\text{Na}^+$ uptake of *Xenopus* oocytes injected with water (hatched bar) or with mBSC1-F9 cRNA (open bars). *A*: effect of protein kinase A (PKA) activation by the addition of 1 mM dibutyryl-cAMP + 1 mM IBMX to uptake medium. *B*: effect of PKA inhibition by addition of 20 μM H89. Each bar represents the mean \pm SE from 7 different experiments in *A* and 3 experiments in *B*.



Expression of mBSC1 C4 isoforms in oocytes. Figure 3 depicts the results of 11 pooled experiments showing that oocytes injected with up to 25 ng of mBSC1-A4 isoform cRNA do not express any increase in $^{22}\text{Na}^+$ uptake. A similar observation was made assessing $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in oocytes injected with cRNA from the mBSC1-F4 isoform (data not shown). Thus oocytes injected with the truncated C4 isoforms mBSC1-F4 and mBSC1-A4 did not express significantly increased $^{22}\text{Na}^+$ or $^{86}\text{Rb}^+$ uptake, compared with water-injected oocytes. Insignificant functional activity was also observed in oocytes injected with mBSC1-F4 cRNA transcribed from a vector containing *Xenopus* β -globin 5'- and 3'-untranslated regions (19) (data not shown). Since the C4 and C9 isoforms differ in consensus PKA and PKC sites (22), the effect of phorbol ester and dibutyryl-cAMP-IBMX was examined; these agents did not affect transport in mBSC1-A4-injected oocytes (data not shown).

Coexpression of mBSC1 isoforms and regulation by cAMP. As detailed in the companion study, mBSC1 isoforms with both the C4 and C9 COOH termini are

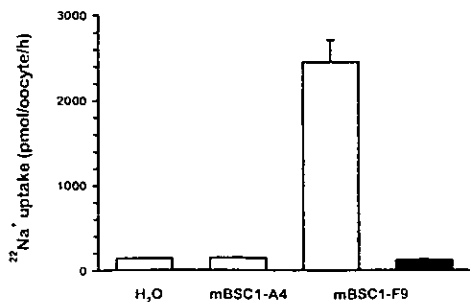


Fig. 3. Functional expression of mBSC1-A4 isoform. $^{22}\text{Na}^+$ uptake in oocytes injected either with water or with cRNA from mBSC1-A4 and mBSC1-F9, as indicated. Tracer uptake was performed in absence (open bars) or presence (solid bar) of 100 μM bumetanide. Each bar represents mean \pm SE from 11 experiments.

coexpressed within TAL cells. Given the lack of transporter function in oocytes injected with cRNA from the C4-type isoforms, as well as the hypothesis that the COOH terminus of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter could be involved in functional regulation of the protein, we measured $^{22}\text{Na}^+$ uptake in *Xenopus* oocytes coinjected with cRNA from one of the long COOH-terminal C9-type isoforms together with cRNA from one of the C4-type truncated isoforms. When the full-length mBSC1-F9 isoform was coinjected with the shorter mBSC1-A4 truncated cRNA, a significant reduction in Na^+ uptake was observed, compared with the mBSC1-F9-injected oocytes. Figure 4 shows the effect of increased amount of mBSC1-A4 cRNA in oocytes that were injected with mBSC1-F9 cRNA. Oocytes were coinjected with a fixed amount of mBSC1-F9 cRNA (25 ng/oocyte) plus increasing concentrations of mBSC1-A4 cRNA, from 6.25 ng to 50 ng per oocyte. Increasing the concentration of mBSC1-A4 cRNA progressively inhib-

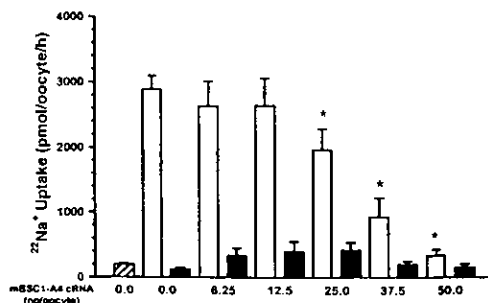


Fig. 4. Effect of increasing concentrations of the mBSC1-A4 cRNA in *Xenopus* oocytes on functional expression of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter. Tracer Na^+ uptake was assessed on groups of 25 oocytes that were injected with water (hatched bar), with 25 ng of mBSC1-F9 cRNA alone or together with increasing amounts of mBSC1-A4 cRNA (open bars). Uptake in the same groups of oocytes was also assessed in presence of 100 μM bumetanide (solid bars). * $P < 0.01$ vs. respective control group.

ited the increased uptake that was observed in oocytes injected with mBSC1-F9 cRNA. Thus the reduction in $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport induced by coinjection with mBSC1 C4 isoforms is dose dependent. Furthermore, Fig. 5 shows that the negative effect of mBSC1 C4 cRNAs in C4/C9 coinjected oocytes is not due to simple competition for translation, since unrelated cRNA, specifically 25 ng of renin cRNA or Shaker K^+ channel, did not decrease Na^+ uptake when coinjected with 25 ng of mBSC1-F9 cRNA. In addition, the interaction between C9 and C4 isoforms is not affected by the presence of the 5' A/B/F mutually exclusive cassettes. As Fig. 6A shows, both mBSC1-F4 and -A4 isoforms equally reduced increased Na^+ uptake induced by mBSC1-F9 cRNA expression. Similarly, Fig. 6B shows that the function of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter induced by mBSC1-A9 cRNA was reduced by mBSC1-A4 and -F4.

Since K^+ -independent bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransport has been described in mouse TAL (32), the ion dependency of the $^{22}\text{Na}^+$ uptake in coinjected oocytes was examined. Figure 7 shows that Na^+ uptake observed in C9/C4 coinjected oocytes remains K^+ dependent, Cl^- dependent, and bumetanide sensitive, indicating that the two isoforms together form a K^+ -dependent, bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter.

Given the lack of effect of cAMP on $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter function induced by C9 isoforms in *Xenopus* oocytes (Fig. 2), we measured the effect of cAMP on tracer uptake in C4/C9 coinjected oocytes. Figure 8 shows the pooled results from seven experiments in which oocytes were injected with mBSC1-F9 cRNA alone or together with mBSC1-A4 cRNA. The reduction in Na^+ uptake in C9/C4 coinjected oocytes was partially reversed by the addition of cAMP-IBMX to the uptake medium ($1,023 \pm 62$ vs. $1,514 \pm 97$ pmol \cdot oocyte $^{-1} \cdot$ h $^{-1}$, respectively; $P < 0.001$). A similar result was obtained when mBSC1-F9 and mBSC1-F4 were coexpressed. Thus, in *Xenopus* oocytes, the function of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter can be modulated by cAMP only when mBSC1-9 and mBSC1-4 isoforms are coex-

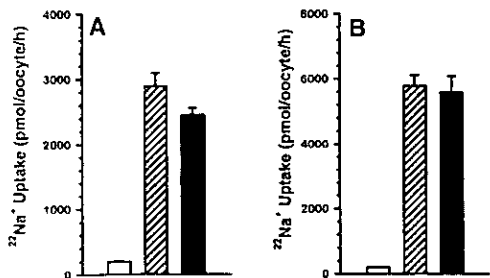


Fig. 5. $^{22}\text{Na}^+$ uptake in *Xenopus* oocytes injected with mBSC1-F9 cRNA and unrelated cRNAs. *A*: oocytes injected with water (open bar), 25 ng of mBSC1-F9 cRNA alone (hatched bar), or 25 ng of mBSC1-F9 with 25 ng of renin cRNA (shaded). *B*: oocytes injected with water (open bar), 25 ng of mBSC1-F9 cRNA alone (hatched bar), or 25 ng of mBSC1-F9 with 25 ng of Shaker K^+ channel cRNA (solid bar).

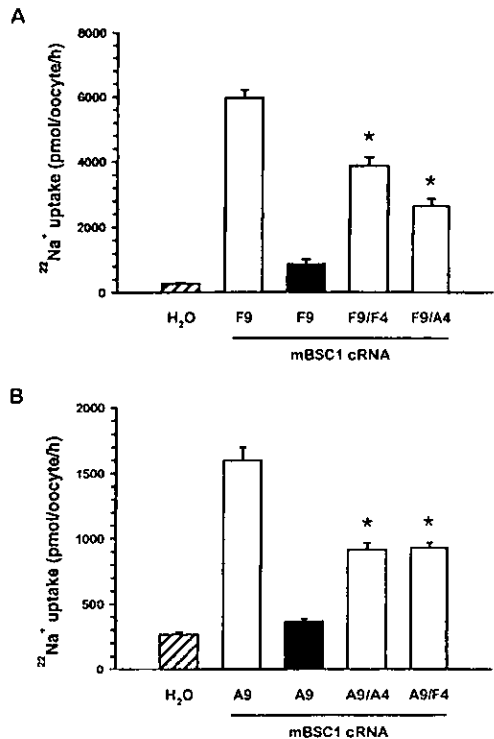


Fig. 6. $^{22}\text{Na}^+$ uptake in *Xenopus* oocytes coinjected with mBSC1 C4 and C9 isoforms alone or in combination. *A*: $^{22}\text{Na}^+$ uptake in oocytes injected with water (hatched bars), mBSC1-F9, mBSC1-F9 + mBSC1-F4, or mBSC1-F9 + mBSC1-A4, as indicated. *B*: oocytes injected with water (hatched bar), mBSC1-A9, mBSC1-A9 + mBSC1-A4, and mBSC1-A9 + mBSC1-F4, as indicated. In both *A* and *B*, the solid bar depicts uptake in presence of 100 μM bumetanide. * $P < 0.001$ vs. control uptake in mBSC1-F9 or mBSC1-A9 groups.

pressed, but not when a mBSC1-9 isoform is expressed alone (Fig. 2). Note in Fig. 8 that Na^+ uptake in the coinjected oocytes, with or without cAMP-IBMX, exhibited bumetanide sensitivity, consistent with $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport activity.

DISCUSSION

The present work describes the functional properties of alternatively spliced mBSC1 isoforms that we have identified from mouse kidney mRNA (22). The cDNA sequence of three of these isoforms predicts proteins of 1,095 amino acid residues containing a long COOH-terminal domain of 457 amino acids in length, referred to here as the C9 COOH-terminal domain. The difference between the individual C9 isoforms arises from the alternative splicing of three variants of coding exon 4, denoted A, B, and F by Payne and Forbush (25). The data in the present article show that the three C9

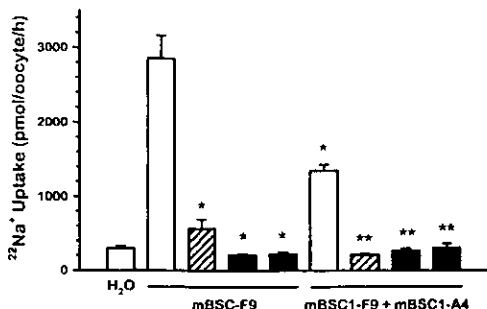


Fig. 7. Ion dependency and bumetanide sensitivity of Na^+ uptake in *Xenopus* oocytes injected with mBSC1-F9 cRNA or coinjected with mBSC1-F9 + mBSC1-A4 cRNA. Tracer uptake was performed in presence of the 3 cotransported ions (open bars), in absence of extracellular K^+ (hatched bars), in absence of extracellular Cl^- (shaded bars), or in presence of 100 μM bumetanide (solid bars). * $P < 0.0001$ vs. C9 control. ** $P < 0.001$ vs. mBSC1-F9 + mBSC1-A4 control.

mBSC1 isoforms from mouse kidney encode bumetanide-sensitive Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporters. These alternatively spliced isoforms were potential candidates (25) for the K^+ -independent bumetanide-sensitive Na^+ - Cl^- transport activity, for which there is functional evidence in mouse, rabbit, and rat kidney (1, 20, 32). However, all three isoforms catalyze K^+ -dependent uptake of $^{22}\text{Na}^+$ and bumetanide-sensitive uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ in oocytes and thus do not encode K^+ -independent Na^+ - Cl^- cotransporters under the conditions utilized. In the experiments using $^{22}\text{Na}^+$ uptake (Fig. 1A), all three isoforms showed some residual K^+ -independent uptake, presumably due to the diffi-

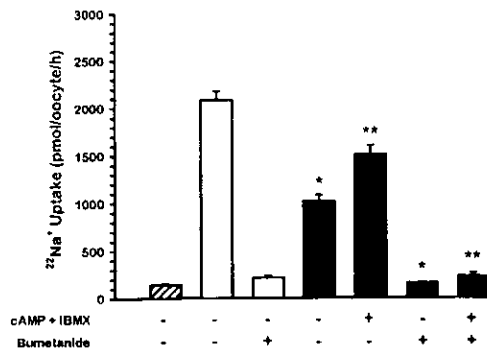


Fig. 8. Effects of cAMP + IBMX in mBSC1-A4-induced reduction of Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransport activity. $^{22}\text{Na}^+$ uptake of *Xenopus* oocytes injected with water (hatched bar), mBSC1-F9 isoform cRNA alone (open bars), or with mBSC1-F9 + mBSC1-A4 cRNAs (solid bars). Either 1 mM dibutyl- cAMP + 1 mM IBMX or 100 μM bumetanide was added to the uptake medium as indicated. Each bar represents mean \pm SE from 7 different experiments with oocytes obtained from 7 frogs. * $P < 0.001$ vs. mBSC1-F9-injected group. ** $P < 0.001$ vs. mBSC1-F9 + mBSC1-A4 injected oocytes.

culty in preparing solutions that are completely devoid of this and equivalent ions (e.g., NH_4^+). The functional differences between these isoforms are not completely clear. However, reproducible differences in uptake were observed, such that oocytes injected with mBSC1-F9 consistently had the highest transport activity (Fig. 1). A difference in translational efficiency and membrane expression is possible, although these isoforms differ only in the 96-bp cassette exons. The individual isoforms may differ in the affinity for a transported ion or ions; however, thus far we have not been able to use the oocyte expression system for kinetic analysis of BSC1 (unpublished data). Kinetic analysis of a chimeric rabbit BSC1-A9 construct, expressed in HEK-293 cells, has recently been reported (15). Unfortunately, chimeric rabbit BSC1-F9 and BSC1-B9 constructs cannot be expressed in mammalian cells, nor can full-length nonchimeric BSC1 cDNAs (15). Therefore, kinetic comparison of the cassette exons in BSC1 constructs is not possible at this time.

The sequence of another class of cDNA clones isolated from mouse outer medulla predicts proteins of 770 amino acid residues, containing a shorter COOH-terminal domain of 129 amino acids in length (22). We have called this alternative COOH-terminal domain C4. RT-PCR clones detailed in the companion study demonstrate that all three of the 5' A/B/F cassettes can pair with the C4 3' end in renal mRNA. An isoform-specific antibody demonstrates that mBSC1 proteins with the C4 COOH terminus are expressed in mouse kidney along the length of the TAL (22). Isoforms of mBSC1 with a C4 COOH terminus did not express Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransport in *Xenopus* oocytes (Fig. 3). Of potential significance, the 55 amino acid residues at the end of the C4 COOH-terminal domain are distinct, and predict different consensus sites for PKC- and PKA-dependent phosphorylation (see figure 1 in Ref. 26). Since it is possible that these isoforms are differentially affected by phosphorylation processes, we also assessed the effects of modulating PKA and PKC on the function of mBSC1-A4; no increase in $^{22}\text{Na}^+$ uptake was observed (data not shown).

The stimulation of cAMP formation by hormones such as vasopressin activates transepithelial salt transport in the murine TAL (3). Initial experiments thus examined the effect of cAMP on mBSC1 isoforms expressed in *Xenopus* oocytes. In oocytes injected with any of the three C9 isoforms, however, activation of PKA with cAMP did not affect $^{22}\text{Na}^+$ uptake. In addition, since previous work with the ROMK (34) and ENaC (28) cation channels had suggested that PKA is active in the unstimulated *Xenopus* oocyte, the effect of inhibiting basal PKA activity was examined. However, the PKA inhibitor H-89 did not affect transport in oocytes expressing mBSC1 isoforms (Fig. 2B). These combined observations suggest that other factors are required to reconstitute the observed cAMP activation of apical Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransport in murine TAL.

Given that the two alternative COOH-terminal mBSC1 isoforms are coexpressed in TAL (see compan-

ion article, Ref. 22), the effect of coinjecting both types of mBSC1 isoforms was examined. In multiple experiments, C4 isoforms reduced the transport activity of the high-expressing mBSC1-F9 isoform. This effect occurred irrespective of which of the 5' cassettes were included in the coexpressed cRNAs (Fig. 6). Thus mBSC1-F4 cRNA inhibits the uptake of oocytes expressing either mBSC1-F9 or mBSC1-A9 isoforms, and mBSC1-A4 reduces uptake expressed by mBSC1-F9 or by mBSC1-A9. The $^{22}\text{Na}^+$ uptake in C9/C4 coinjected oocytes is K^+ and Cl^- dependent (Fig. 7), indicating that together the two isoforms do not form a bumetanide-sensitive Na^+/Cl^- cotransporter under the experimental conditions used here. The possibility of competition for translation in C4/C9 coinjected oocytes is unlikely to account for the reduced $^{22}\text{Na}^+$ uptake, since coinjecting mBSC1-F9 with renin or Shaker K^+ channel, unrelated cRNAs, did not significantly reduce uptake (Fig. 6). Moreover, in contrast to the lack of a cAMP effect in oocytes injected with C9 isoforms alone, cAMP abrogated the inhibitory effect of C4 isoforms, suggesting a specific functional effect. Therefore, COOH-terminal truncated isoforms exert a dominant negative function on the ion transport expressed by full-length C9 isoforms, a property that is reversed by cAMP. Heterogeneity of immunostaining for the C4 antibody is described in the companion study (22), such that not all cells are positive for the C4 antigen. Moreover, the intensity of staining and distribution of positive cells is axially distributed, such that CTAL appears to express less C4 than outer medullary segments (22). This heterogeneity may underlie the observed difference in vasopressin-sensitive Na^+/Cl^- cotransport in CTAL vs. MTAL (11).

There is precedence for the dominant negative effect of the truncated C4 isoforms of mBSC1. For example, two groups have reported a dominant negative property for an alternatively spliced isoform of the long-QT syndrome K^+ channel (5, 16). This isoform, which predicts an NH_2 -terminal truncation of the channel protein, is inactive on its own, but has a dominant negative effect on the channel activity of the full-length isoform, both in *Xenopus* oocytes (16) and in mammalian cells (5). The generation of dominant negative isoforms by alternative splicing has also been demonstrated in nonmembrane proteins, particularly for transcription factors (2). Finally, an isoform (α_{21}) of the α_2 -subunit of soluble guanylyl cyclase with a 31 amino acid alternatively spliced insert has been identified (4). The α_{21} isoform competes with the α_2 -subunit for dimerization with the β_1 -subunit, producing a nonfunctional guanylyl cyclase that may play a role in the regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity.

The functional effects observed here suggest a number of testable hypotheses. First, BSC1 proteins likely form a multimeric complex; indeed, preliminary immunoprecipitation experiments with an amino-terminal antibody suggest that they may form oligomers (18). Like thiazide-sensitive cotransporter, TSC (26), BSC1 proteins are detected within subapical vesicles (24), and trafficking of these vesicles to the apical membrane

may play a role in regulation. The staining of mouse kidney with anti-C4 antibody suggests that a significant proportion of these isoforms have a subapical distribution (22), and it is possible that the modification of the mBSC1 COOH terminus by alternative splicing affects the interaction of the transporter proteins with the cytoskeleton (7) and/or the vesicular trafficking machinery. If so, then coassociation of C4 isoforms with C9 isoforms may play a role at this level of regulation. Specifically, C4 isoforms may either "retrieve" the BSC1 complex from the apical membrane or "trap" it within vesicles. Alternatively, heteromeric complexes of C4 and C9 isoforms may be inactive in transport at the apical membrane. The results obtained in *Xenopus* oocytes suggest that such interactions would be sensitive to cAMP, perhaps due to direct transporter phosphorylation. Regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ transport could also occur at the level of alternative splicing, and changing the ratio of alternatively spliced isoforms may play a role in the response to physiological stimuli such as water deprivation and water loading. Finally, if equivalent splicing events exist in humans, then genetic modulation of the relative efficiency of alternative splicing may affect the pathophysiology of the TAL in disorders such as Bartter's syndrome and hypertension. Such a phenomenon is likely in genetic forms of the cardiac long-QT syndrome (5).

In summary, in the present study we have addressed the functional characteristics of alternatively spliced isoforms of mBSC1 gene. The three C9 isoforms containing a full-length COOH-terminal domain and the A, B, or F cassette exons clearly encode bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporters, when expressed in *Xenopus* oocytes. In contrast, the C4 isoforms containing the truncated C4 COOH-terminal domain do not induce cotransporter activity by themselves, but give rise to a dominant negative effect on $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter function that can be modulated by cAMP. These processes may play a role in the regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport in TAL by vasopressin and other hormones.

We are grateful to Dr. Octavio Villanueva for help with animal care and to members of the Molecular Physiology Unit for suggestions and stimulating discussion.

This work was supported by Research Grant 3840 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and Grant 75197-553601 from Howard Hughes Medical Institute to C. Gamba, and by National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grants DK-36803 and DK-02103 to S. C. Hebert and D. B. Mount, respectively. C. Plata is supported by scholarship grants from CONACYT and Dirección, General del Personal Académico of the National University of Mexico.

Portions of this work were presented at the 27th, 28th, and 29th Annual Meetings of the American Society of Nephrology and have been published in abstract form (*J. Am. Soc. Nephrol.* 5: 282, 1994; *J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 347, 1995; and *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 1288, 1996).

Address for reprint requests: C. Gamba, Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico (E-mail: gamba@mailier.main.conacyt.mx).

Received 15 June 1998; accepted in final form 30 October 1998.

REFERENCES

- Alvo, M., J. Calamia, and J. Eveloff. Lack of potassium effect on $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransport in the medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol.* 249 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 18): F34-F39, 1985.
- Bach, I., and M. Yaniv. More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *Embo J* 12: 4229-4242, 1993.
- Bailly, C. Transducing pathways involved in the control of $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int. Suppl.* 65: S29-S35, 1998.
- Behrends, S., C. Harteneck, G. Schultz, and D. Koesling. A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J. Biol. Chem.* 270: 21109-21113, 1995.
- Demolombe, S., I. Baro, Y. Pereon, J. Bliék, R. Mohammad-Panah, H. Poillard, S. Morid, M. Mannens, A. Wilde, J. Barhanin, F. Charpentier, and D. Escande. A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J. Biol. Chem.* 273: 6837-6843, 1998.
- Ecelbarger, C. A., J. Terris, J. R. Hoyer, S. Nielsen, J. B. Wade, and M. A. Knepper. Localization and regulation of the rat renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter, BSC-1. *Am. J. Physiol.* 271 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 40): F619-F628, 1996.
- Ehlers, M. D., E. T. Fung, R. J. O'Brien, and R. L. Huganir. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J. Neurosci.* 18: 720-730, 1998.
- Gamba, G., A. Miyanooshita, M. Lombardi, J. Lytton, W. S. Lee, M. A. Hediger, and S. C. Hebert. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* 269: 17713-17722, 1994.
- Greger, R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol. Rev.* 65: 760-797, 1985.
- Hebert, S. C., and T. E. Andreoli. Effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. II. Determinants of the ADH-mediated increases in transepithelial voltage and in net Cl^- absorption. *J. Membr. Biol.* 80: 221-233, 1984.
- Hebert, S. C., R. M. Culpepper, and T. E. Andreoli. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransport. *Am. J. Physiol.* 241 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 10): F412-F431, 1981.
- Ho, K., C. G. Nichols, W. J. Lederer, J. Lytton, P. M. Vassilev, M. V. Kanazirska, and S. C. Hebert. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362: 31-38, 1993.
- Igarashi, P., G. B. Vanden Heuvel, J. A. Payne, and B. Forbush III. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter. *Am. J. Physiol.* 269 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 38): F405-F418, 1995.
- International Collaborative Study Group. Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. *Hum. Mol. Genet.* 6: 17-26, 1997.
- Iseñring, P., and B. Forbush III. Ion and bumetanide binding by the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter. Importance of transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* 272: 24556-24562, 1997.
- Jiang, M., J. Tseng-Crank, and G. N. Tseng. Suppression of slow delayed rectifier current by a truncated isoform of KvLQT1 cloned from normal human heart. *J. Biol. Chem.* 272: 24109-24112, 1997.
- Kaplan, M. R., M. D. Plotkin, W. S. Lee, Z. C. Xu, J. Lytton, and S. C. Hebert. Apical localization of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int.* 49: 40-47, 1996.
- Lee, A. J., J. M. Bradfor, J. M. Terris, M. A. Knepper, and C. A. Ecelbarger. The type 1 bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter (BSC1) exists in the plasma membrane as a high molecular weight oligomeric complex (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 37, 1997.
- Liman, E. R., J. Tytgat, and P. Hess. Subunit stoichiometry of a mammalian K^+ channel determined by construction of multi-meric cDNAs. *Neuron* 9: 861-871, 1992.
- Ludens, J. H., M. A. Clark, and J. A. Lawson. Does ADH alter cotransporter properties in conscious rats? Evidence for a shift from K^+ -independent to K^+ -dependent cotransport (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 344, 1995.
- Molony, D. A., W. B. Reeves, S. C. Hebert, and T. E. Andreoli. ADH increases apical Na^+ , K^+ , 2Cl^- entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am. J. Physiol.* 252 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 21): F177-F187, 1987.
- Mount, D. B., A. Baekgaard, A. E. Hall, C. Plata, J. Z. Xu, D. R. Beier, G. Gamba, and S. C. Hebert. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL. I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am. J. Physiol.* 276 (*Renal Physiol.* 45): F347-F358, 1999.
- Mount, D. B., R. S. Hoover, and S. C. Hebert. The molecular physiology of electroneutral cation-chloride cotransport. *J. Membr. Biol.* 158: 177-186, 1997.
- Neilsen, S., A. B. Maunsbach, D. Ecelbarger, and M. A. Knepper. Cellular and subcellular localization of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ co-transporter BSC-1 in apical plasma membrane and vesicles of thick ascending limb and macula densa cells (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 40, 1997.
- Payne, J. A., and B. Forbush III. Alternatively spliced isoforms of the putative renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4544-4548, 1994.
- Plotkin, M. D., M. R. Kaplan, J. W. Verlander, W. S. Lee, D. Brown, E. Poch, S. R. Gullans, and S. C. Hebert. Localization of the thiazide-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int.* 50: 174-183, 1996.
- Reeves, W. B., C. J. Winters, L. Zimniak, and T. E. Andreoli. Properties and regulation of medullary thick limb basolateral Cl^- channels. *Kidney Int. Suppl.* 65: S24-S28, 1998.
- Saxena, S., Y. Oh, M. W. Quick, and D. G. Warnock. cAMP regulation of wild type amiloride-sensitive sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 1289, 1996.
- Simon, D. B., R. S. Bindra, T. A. Mansfield, C. Nelson-Williams, E. Mendonca, R. Stone, S. Schurman, A. Nayir, H. Alpay, A. Bakkaloglu, J. Rodriguez-Soriano, J. M. Morales, S. A. Sanjad, C. M. Taylor, D. Pilz, A. Brem, H. Trachtman, W. Griswold, G. A. Richard, E. John, and R. P. Lifton. Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* 17: 171-178, 1997.
- Simon, D. B., F. E. Karet, J. M. Hamdan, A. DiPietro, S. A. Sanjad, and R. P. Lifton. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalcaemia, is caused by mutations in the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter *NKCC2*. *Nat. Genet.* 13: 183-188, 1996.
- Simon, D. B., F. E. Karet, J. Rodriguez-Soriano, J. H. Hamdan, A. DiPietro, H. Trachtman, S. A. Sanjad, and R. P. Lifton. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K^+ channel, *ROMK*. *Nat. Genet.* 14: 152-156, 1996.
- Sun, A., E. B. Grossman, M. Lombardi, and S. C. Hebert. Vasopressin alters the mechanism of apical Cl^- entry from $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ to $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport in mouse medullary thick ascending limb. *J. Membr. Biol.* 120: 83-94, 1991.
- Winters, C. J., W. B. Reeves, and T. E. Andreoli. A survey of transport properties of the thick ascending limb. *Semin. Nephrol.* 11: 236-247, 1991.
- Xu, Z. C., Y. Yang, and S. C. Hebert. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K^+ channel, *ROMK*, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 9313-9319, 1996.