



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS FACULTAD DE MEDICINA



LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

ANÁLISIS FUNCIONAL DE QUIMERAS DEL EXTREMO AMINOTERMINAL ENTRE LOS COTRANSPORTADORES RENALES Na-Cl y Na-K-Cl

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciado en Investigación Biomédica Básica
P r e s e n t a :
I s r a e l P i c h a r d o C a s a s



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Dr. José Narro Robles
Director de la Facultad de Medicina
Presente.

Estimado Dr. Narro:

Por este conducto me permito informar a usted que en la sesión del Subcomité Académico de la Licenciatura que se llevó a cabo el día 13 de febrero de 2004, se acordó designar el siguiente Jurado para el examen Profesional del alumno: **Israel Pichardo Casas**, quien presenta la tesis "Análisis funcional de quimeras del extremo aminoterminal de los cotransportadores renales Na-Cl y Na-K-Cl", dirigida por el Dr. Gerardo Gamba Ayala.

Presidente	Dra. Irma Laura Escobar Pérez
Vocal	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Secretaria	Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Suplente	Dr. Freddy Cifuentes Navarro
Suplente	Dr. David Erasmo García Díaz

Sin otro particular agradezco su atención y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D.F., a 24 de febrero de 2004.



Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez
Coordinador



Licenciatura en Investigación
Biomédica Básica
Coordinación



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Coordinación

Dr. José Narro Robles
Director de la Facultad de Medicina. UNAM
Presente

Por este conducto le informamos que la tesis " Análisis funcional de quimeras del extremo aminoterminal de los cotransportadores renales Na-Cl y Na-K-Cl ", que presenta el alumno: **Israel Pichardo Casas**, cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto los suscritos miembros del Jurado otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dra. Irma Laura Escobar Pérez

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Dr. Fredy Cifuentes Navarro

Dr. David Erasmo García Díaz

Agradecimientos

A mi familia, tutores y amigos por su apoyo.

Agradezco al Dr. Gerardo Gamba el tiempo y asesoramiento dedicados durante mi estancia en el laboratorio, de quien valoro, por encima de otras cosas, su profesionalismo y agudeza en el ámbito académico; a los Dres. Laura Camarena, Fredy Cifuentes, Laura Escobar y David García por las importantes observaciones realizadas al presente escrito. También extendo este agradecimiento a la Q. F. B. Norma Vásquez por el trabajo académico y experimental prestados para la conclusión del presente estudio; a la Lic. Martha Cariño por su muy amable ayuda en la biblioteca del instituto; a los miembros presentes y pasados de los laboratorios de la Dra. Ana Ma. López Colomé (IFC), Dr. Sergio Sánchez (IIBm) y Dra. Norma Bobadilla (IIBm) por su calidad humana.

Un agradecimiento especial al Dr. Luis Vaca D. por el inmenso apoyo personal brindado, a mis compañeros de la licenciatura Fabián Flores, Eduardo Martínez, Ricardo Quiroz y Julián Valdés, de quienes aprecio el apoyo personal, académico y moral que me han resultado tan invaluable.

Finalmente mi muestra de mayor agradecimiento es para la Universidad, cuyos espacios, maestros, compañeros y emblema resultan ser tan alentadores para el cultivo del espíritu humano.

"... toda obra grande, en arte como en ciencia, es el resultado de una gran pasión puesta al servicio de una gran idea."

F. Ramón y Cajal en *Los Tónicos de la Voluntad* (1908).

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
Capítulo I	10
1.1 <i>El Transporte Transepitelial de Solutos.</i>	10
1.2 <i>Esquema general de la reabsorción de solutos en el riñón y la anatomía gruesa del riñón.</i>	11
Capítulo II	20
2.1 <i>Los Cotransportadores Renales de Cationes Acoplados de Cloro (CCC).</i>	20
2.2 <i>El Cotransportador Sensible a Bumetanida $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ ó NKCC.</i>	25
2.3 <i>El Cotransportador Sensible a Tiazida $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ ó NCC.</i>	32
2.4 <i>Diferencias estructurales entre NCC/CST y NKCC2/CSB1</i>	35
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	39
Capítulo III	40
3. <i>Estrategia y Metodología</i>	40
3.1 <i>Construcción de las proteínas quiméricas.</i>	41
3.2 <i>Síntesis de RNA in vitro.</i>	43
3.3 <i>Preparación de ovocitos de X. laevis.</i>	43
3.4 <i>Experimentos de pre-captación y captación.</i>	44
3.5 <i>Análisis estadístico.</i>	46
Capítulo IV	47
4. <i>Resultados</i>	47
4.1 <i>Construcción de las Quimeras.</i>	47
4.2 <i>Caracterización Funcional de la Quimera BTT.</i>	52
4.2.1 <i>BTT se comporta como CST.</i>	52
4.2.2 <i>Cinéticas de Na^+ y Cl^- de la Quimera BTT.</i>	53
4.2.3 <i>Curva de inhibición por Metolazona.</i>	54

4.2.4 Efecto de la Tonicidad sobre la Función de la Quimera BTT.	54
4.3 Caracterización Funcional de la Quimera TBB.	55
4.3.1 La clona TBB se comporta como CSB1.	55
4.3.2 Cinéticas de Na ⁺ , K ⁺ y Cl de la Quimera TBB.	57
4.3.3 Curva de Inhibición por Bumetanida.	58
4.3.4 Efecto de la Osmolaridad Extracelular sobre la Función de TBB.	59
4.3.5 Resumen de resultados.	60
V.CONCLUSIONES	61
VI. DISCUSIÓN	62
APÉNDICES	68
BIBLIOGRAFÍA	81

RESUMEN

Los cotransportadores electroneutros renales de cationes acoplados a cloro, CSB1/NKCC2 y CST/NCC, son responsables en gran medida de determinar la homeostasis de iones monovalentes en el cuerpo. CSB1/NKCC2 es un simportador apical capaz de mediar la reabsorción de sal en la porción gruesa del asa de Henle, transporta estequiométricamente $1\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ desde el líquido tubular hacia el citoplasma de las células del epitelio en esta porción de la nefrona. Por su parte, CST/NCC transporta $1\text{Na}^+ : 1\text{Cl}^-$ desde la luz tubular de la nefrona hacia el citosol de las células del túbulo contorneado distal de la nefrona, controlando la regulación fina de la reabsorción de sodio en esta porción. Algunas mutaciones en los genes que codifican a CSB1 y CST dan origen al síndrome de alcalosis hipocalémica de Bartter y Gitelman, respectivamente. Ambos cotransportadores comparten, a nivel de proteína, la misma topología y un alto grado de identidad (~52%); sin embargo, presentan diferencias funcionales que pueden ser explicadas por las diferencias en la secuencia de aminoácidos. Dado que no existen reportes de estudios acerca del papel que tiene la estructura de los cotransportadores CSB1 y CST sobre la función, decidimos iniciar dicho estudio aprovechando las diferencias presentes en ambos cotransportadores. En este estudio se analizó el papel funcional derivado del intercambio del dominio N-terminal entre CSB1 y CST, mediante la construcción de proteínas quiméricas. Analizamos parámetros como la selectividad y afinidad por los iones y por los diuréticos inhibidores. Se utilizó el sistema de expresión funcional de ovocitos de la rana *Xenopus laevis* para caracterizar la función de las quimeras resultantes. Se observó que el dominio N-terminal no es responsable por la especificidad del transporte de iones ni de la unión a los diuréticos, especificidad que probablemente se encuentra codificada en los segmentos transmembranales. Sin embargo, se demostró que dicho dominio es capaz de afectar la cinética de transporte de Cl^- así como la respuesta a los cambios en el volumen celular. Este comportamiento posiblemente se debe al papel regulador de sitios de unión a PKC y CK2 presentes en el dominio N-terminal en ambos cotransportadores.

ABSTRACT

Both electroneutral renal cation-chloride cotransporters, BSC1/NKCC2 and TSC/NCC, play major roles in determining the monovalent ion homeostasis in the body. BSC1/NKCC2 is an apical symporter responsible for the salt reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop, and mediates the transport of $1\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ from urine to the renal interstitium. In contrast, TSC/NCC transports only $1\text{Na}^+ : 1\text{Cl}^-$ from the nephron's tubular lumen to the bloodstream, and yet is responsible for the fine-tune regulation of sodium reabsorption in the distal convoluted tubule. Several mutations in the coding sequences for BSC1 and TSC genes in humans give rise to the Bartter's and Gitelman's hypocalcemic alkalosis syndromes, respectively. These two cotransporters share the same topology and large-scale conserved aminoacid identity (~52%). However, they still retain functional differences that could be explained by the means of the aminoacid sequence differences. There are no studies that correlate the structural traits of the cotransporters with their functional behavior, then the present work begins a whole line of research in that regard. We decided to take advantage from the structural differences of these cotransporters to investigate the structure-function relationship. Here we describe the functional differences derived from the interchange of the N-terminal domain between both cotransporters. By constructing chimerical proteins that contained the N-terminal domain swapped between both cotransporters, we explored functional traits such as selectivity and affinity for ions and for the loop- and thiazide-type diuretics. We used the heterologous expression system of *X. laevis* oocytes to functionally characterize the resulting chimeras. It was found that within the N-terminal domain, lies neither the structural determinants for the ion transport nor the diuretic binding specificity, which are most likely residing at the central-spanning transmembrane domains. However, it was interesting to find that the intracellular N-terminal domain indeed exerts an effect over the ion transport kinetics and the response to cell volume changes. The latter possibility is likely due to the regulatory role of PKC and CK2 binding sites lying within this protein domain shared by both cotransporters.

ABREVIATURAS

Simbolo	Significado
$[Cl^-]_i/[Cl^-]_e$	Concentración de Cl^- intracelular/extracelular.
$[K^+]_i/[K^+]_e$	Concentración de K^+ intracelular/extracelular.
$[Na^+]_i/[Na^+]_e$	Concentración de Na^+ intracelular/extracelular.
ACCPN	Neuropatía Periférica con Agénesis del Cuerpo Caloso.
TALH	Porción Gruesa Ascendente del Asa de Henle.
CAMK	Cinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina
cAMP	Adenosín Mononucleótido Cíclico
CCC	Cation-Chloride Cotransporter/Cotransportador Cation-Cloro.
CIP	Cation-chloride cotransporter Interacting Protein/Proteína de Interacción con CCC.
CK2	Casein Cinasa 2
CSB1/BSC1/NKCC2	Cotransportador Sensible a Bumetanida Apical.
CST/TSC/NCC	Cotransportador Sensible a Tiazida.
CSTfl	Isoforma de lenguado de invierno.
CSTh/CSBh	Isoforma humana.
CSTm/CSBm	Isoforma murina (ratón).
CSTr/CSBr/rNCC/rNKCC	Isoforma murina (rata).
CSTsh/shNCC	Isoforma de tiburón.
CTD/COOH/C-terminal	Dominio Carboxilo Terminal.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DNAc/cDNA	DNA codificante.
$EC_{50}/LogEC_{50}$	50% de actividad de una curva dosis respuesta donde se grafica Log [sustrato] vs. % de actividad.
GABA	Ácido γ -aminobutírico.
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico.
KCC	Potassium-Chloride Cotransporter/Cotransportador K^+-Cl^- .
K_M	Constante de Michaelis-Menten; concentración de sustrato suficiente para alcanzar el 50% de la V_{max} .
M/CTAL	TAL medular o cortical.
NCC	Sodium-Chloride Cotransporter/Cotransportador $Na^+:Cl^-/CST$.
ND96	Medio Ringer (Na^+ 96mM).
NKCC	Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter/Cotransportador $Na^+:K^+:2Cl^-/CSB$.
NMDG	N-metil-D-glucamina.
ns	Estadísticamente no significativo.
NTD/NH ₂ /N-terminal	Dominio Amino Terminal.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PHA II	Pseudo hipoaldosteronismo Tipo II.
PKA	Proteína Cinasa regulada por AMPc.
PKC	Proteína Cinasa regulada por Ca^{2+} /Calmodulina.
RNAc	Mensajero codificante.
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
SLC12A	Familia de genes de los cotransportadores de cationes acoplados a cloro.
TCD/DCT	Túbulo Distal Contorneado.
TM	Dominios Transmembranales.
Tris	Bis-(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano
V_{max}	Velocidad máxima; límite máximo de catálisis de una enzima.

INTRODUCCIÓN

Los *Cotransportadores de Cationes acoplados a Cloro* (CCC) constituyen una familia de proteínas que participan en los mecanismos de absorción y secreción de iones así como en la regulación del volumen celular [1].

Las mutaciones en los genes que codifican para algunos de los miembros de esta familia están relacionadas con diversos síndromes, que se caracterizan por un inadecuado control del balance de sodio, potasio o cloro en el organismo [2]. La gravedad de estas enfermedades depende de qué gen de la familia se encuentra afectado y cómo dichas mutaciones afecten su función [3].

En este trabajo nos interesamos en estudiar sólo a dos miembros de la familia de los CCC: el Cotransportador Sensible a Bumetanida $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ CSB1 ó NKCC2 (por las siglas en inglés Na-K-Cl Cotransporter) [4, 5] y el Cotransportador Sensible a Tiazida $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ CST ó NCC (Na-Cl Cotransporter) [6]. Ambos se caracterizan porque su expresión en el riñón de los mamíferos (rata, ratón, humano, etc.) le confiere a este órgano una de sus funciones básicas, que es la reabsorción de sal a lo largo de la nefrona.

Ambos cotransportadores poseen características distintivas que comparten con los otros miembros de la familia CCC. Son proteínas de membrana cuya topología se caracteriza por presentar 12 dominios transmembranales (TM), así como dos segmentos amino y carboxilo terminales de localización intracelular [6]. Entre los segmentos TM7 y TM8 hay un asa extracelular que contiene sitios de N-glicosilación. Tanto CST como CSB1, que se expresan en el riñón de la rata, comparten el 52% de grado de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos; siendo los segmentos TM los más conservados. Entre las regiones de la proteína más disímiles, se encuentran el segmento amino terminal (N-terminal) y los dominios transmembranales TM5, TM7 y TM11, con un grado de identidad <35% [6]. Los segmentos intracelulares contienen sitios de regulación por fosforilación vía PKA, PKC y CK2 [6].

En el riñón, CSB1/NKCC2 se expresa en la membrana apical de las células del asa gruesa ascendente de Henle (Thick Ascending Limb of Henle's loop, TALH en inglés) en la nefrona [6]. Su función es transportar estequiométricamente $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ desde la luz tubular de la nefrona hacia el citoplasma de las células del TALH [6] y favorecer la reabsorción de sodio de vuelta a la sangre. El transporte funciona a favor del gradiente de concentración de sodio y dicho transporte aumenta en condiciones de hipertonicidad [7]. Una variedad de mutaciones en el gen que codifica a CSB1/NKCC2 en humanos, están ligadas con un síndrome hereditario que produce alcalosis metabólica hipocalémica. Este síndrome recibe el nombre de síndrome de Bartter tipo I [8]. Como se describirá más adelante, el transcrito del gen que codifica a CSB1 sufre un proceso de escisión de exones alternativo. Derivado de este proceso de "splicing" alternativo se generan seis isoformas. De éstas, tres presentan un dominio C-terminal intracelular de 342 a.a y funcionalmente transportan $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ con una sensibilidad principalmente al diurético bumetanida. Las otras tres isoformas presentan un dominio C-terminal más corto, con una secuencia de 55 a.a que no está presente en las

isoformas largas que presentan un tipo de transporte $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ y sensibilidad principalmente al diurético furosemida. Este hallazgo es el primer indicio acerca del papel funcional de un segmento intracelular capaz de modificar la selectividad de este cotransportador.

Por su parte, el Cotransportador Sensible a Tiazidas de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ CST/NCC se expresa esencialmente en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo contorneado distal (CDT) de la nefrona [9]. Esta proteína participa en la regulación fina de la reabsorción de sodio, que se lleva a cabo particularmente en la porción más distal de la nefrona.

Formando parte de los dominios intracelulares de esta proteína, existen secuencias consenso que funcionan como blanco de regulación por diversas cinasas, entre ellas PKA, PKC [6], PKT y CK2 [10]. Se sabe que algunas mutaciones en el gen que codifica para CST en el humano, producen un síndrome hereditario semejante al síndrome de Bartter llamado síndrome de Gitelman [11]. El cuadro clínico se manifiesta como alcalosis metabólica hipocalémica, hipocalciuria e hipotensión arterial.

Actualmente no se conoce de forma precisa cómo están arreglados espacialmente los distintos motivos estructurales de los cotransportadores. No hay evidencia suficiente que sustente cuáles son los segmentos responsables de determinar parámetros como la afinidad o la selectividad por los iones que transportan. A pesar de que se conocen algunos fármacos capaces de inhibir el transporte de manera selectiva, es poca la información acerca de la forma en la que se establece el reconocimiento molecular de la proteína con dichos fármacos.

Se han llevado a cabo diferentes estudios de tipo cinético y farmacológico que describen algunos mecanismos de interacción; sin embargo, no resuelven el problema de la relación estructura-función de estas proteínas desde el punto de vista molecular.

Sólo se han publicado algunos trabajos que intentan abordar dicho problema. Por ejemplo, se ha reportado en el caso del cotransportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ llamado CSB2/NKCC1 (que es la isoforma secretora basolateral ubicua, diferente de CSB1/NKCC, que es apical y sólo se expresa en el riñón), que los segmentos TM 2, 4 y 7 están involucrados en definir la afinidad por los iones que transportan. De hecho se conocen algunos aminoácidos cuyo papel es crítico para definir la selectividad de cationes y aniones [12]. Aún con esta información no es posible predecir qué cambios conformacionales se requieren en estos dominios que expliquen cómo se definen variables como la selectividad por cationes, aniones y diuréticos. En el caso cotransportador sensible a tiazida $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ CST/NCC, se carece de reportes estructurales similares.

Una aproximación metodológica para indagar en el problema de la relación estructura-función es la construcción de proteínas quiméricas. Mediante el intercambio de distintas regiones de la proteína entre diferentes cotransportadores es posible inferir qué papel juega una región estructural en particular, pues es posible medir el efecto que tiene en la función de la proteína híbrida. Dado que conocemos la secuencia de

aminoácidos que han sido intercambiados, resulta fácil identificar qué regiones específicas afectan la función. En este sentido, es posible cuantificar el efecto del cambio estructural midiendo algunos parámetros funcionales como son la especificidad y velocidad de transporte de iones así como el perfil de inhibición por los diuréticos.

Con este trabajo iniciamos el análisis estructura-función en proteínas quiméricas de los cotransportadores CSB1 y CST. Las primeras quimeras estudiadas se caracterizan porque presentan el intercambio del segmento N-terminal entre los cotransportadores renales CST y CSB1.

La identificación de motivos estructurales que expliquen la función de estas proteínas, tiene una gran relevancia en diversos campos. Por ejemplo, desde el punto de vista farmacológico, puede ayudar a identificar cómo interactúan molecularmente los diuréticos con los cotransportadores, ello facilita el diseño de fármacos más efectivos y específicos. Cosa que no es gratuita pues diuréticos de asa como la bumetanida (que inhibe específicamente a CSB) y diuréticos derivados de las benzotiadiazinas como la tiazida (que inhibe específicamente a CST) se encuentran entre las drogas más prescritas del mundo, por su efectividad para controlar estados edematosos, hipertensivos, de insuficiencia renal, etc. Además, este conocimiento puede ayudar a comprender las alteraciones moleculares que ocurren en enfermedades hereditarias como el síndrome de Bartter o el síndrome de Gitelman.

Desde el punto de vista de la fisiología, puede ayudar a explicar con detalle molecular los mecanismos involucrados en la regulación intracelular del transporte en fenómenos ya conocidos como la sensibilidad a los cambios de volumen celular, el efecto de diversas hormonas en la formación de orina, la homeostasis del volumen del plasma, la regulación renal de la presión arterial, etc., que están íntimamente ligados con las función de dichos cotransportadores.

La aproximación metodológica que abordamos ha resultado ser muy útil anteriormente para resolver preguntas sobre la relación estructura-función en otras proteínas de membrana con muy buenos resultados, tal como lo reportan diversos trabajos en la literatura [13-15].

Sin embargo, es necesario señalar que los datos presentados en esta tesis no resuelven contundentemente el problema estructura-función de los cotransportadores electroneutros, sino más bien marcan el inicio de una línea de investigación completa que tiene por objetivo global explicar dicha relación. Se requiere un análisis más profundo de estas y otras quimeras, con la finalidad de que tales datos tengan un mayor significado funcional en un contexto más completo. De cualquier forma, los resultados obtenidos son importantes ya que nos hablan del papel que juega el dominio N-terminal en el transporte de iones y en la farmacología.

Para contextualizar al amable lector de forma adecuada sobre la relevancia de nuestros experimentos en relación con la función y estructura de los cotransportadores CST y CSB1, en este trabajo se presenta

primero una breve explicación sobre la fisiología renal, se describen aspectos comunes de la familia de proteínas a la que pertenecen así como algunas patologías causadas por el mal funcionamiento de algunos de estos miembros. Se pone especial énfasis en los mecanismos moleculares en los que participan dichas proteínas y se mencionan algunas características estructurales de los cotransportadores. Se hace referencia a algunos estudios moleculares, cinéticos y farmacológicos realizados en otros cotransportadores y posteriormente se plantea la pregunta de investigación acerca de cómo afecta la estructura de los cotransportadores sobre su función. Enseguida se habla de la importancia de investigar este problema. Se plantean algunos argumentos que justifican la estrategia que se utilizó en este trabajo para responder la pregunta. Posteriormente, se enuncia la hipótesis, los objetivos planteados y la estrategia experimental. Más adelante se describen los resultados obtenidos y se mencionan de forma concreta algunas conclusiones. Se discute la interpretación de los datos y la relevancia para la función de los cotransportadores, desde el punto de vista estructural, contrastándolos con otros resultados reportados anteriormente en la literatura. Finalmente se hacen algunos comentarios finales sugiriendo algunos experimentos adicionales que se pueden realizar para completar esta investigación.

Capítulo I

1.1 El Transporte Transepitelial de Solutos.

El transporte transepitelial de solutos tales como el Na^+ , K^+ , Cl^- , CO_3^- , Ca^{2+} , H^+ , aminoácidos, carbohidratos, entre otros, es una de las funciones elementales de órganos como el intestino, los riñones, pulmón, plexo coroides o la tráquea [16]. Este transporte es necesario, por ejemplo, para mantener la tonicidad y composición de iones en el plasma sanguíneo durante su filtración en el riñón, para transportar sustancias nutritivas como los carbohidratos y aminoácidos desde la luz intestinal hacia la sangre, para la secreción de mucus en vías respiratorias, o bien, sirve para formar líquidos de composición especial, como el líquido cefalorraquídeo formado en el plexo coroides, o la endolinfa del oído [17].

Sean cuales fueren los solutos que transportan los diversos epitelios, dicho transporte depende, en gran parte, de las proteínas de membrana que expresan las células epiteliales. Para que estas proteínas funcionen se requiere el control de dos variables: la selectividad por el sustrato, esto es, cuáles solutos dejarán pasar a través de la membrana plasmática [18], y la polaridad epitelial en donde éstas se expresen [19], ya sea apical o basolateral. En tejidos no epiteliales, el transporte de solutos desde el exterior hacia el citoplasma de las células tiene diversas funciones. Les permite conservar condiciones de tonicidad y composición del citosol estables, mediante el transporte de sustancias a favor o en contra de su gradiente de concentración; permite introducir metabolitos útiles y excretar productos de desecho; permite conservar el equilibrio ácido-base intracelular; sirve para generar cascadas de señales en el interior de la célula y para controlar el estado de polarización de la membrana [2]. De esta forma, el transporte de solutos, ya sea a través de un epitelio especializado o de cualquier otra célula, se convierte en un proceso esencial en todos los organismos.

En los animales superiores, el órgano por excelencia encargado de filtrar solutos de la sangre y mantener la composición y tonicidad de los líquidos del cuerpo es el riñón. Este órgano faculta a vertebrados terrestres como aves y mamíferos para vivir fuera del agua, a diferencia de muchos organismos marinos como los peces. Mediante la reabsorción de iones y otros solutos, el riñón filtra y recircula el agua del cuerpo, ya que ésta siempre se mueve junto con los solutos que en ésta se disuelven, por lo que este órgano constituye una pieza importante para la sobrevivencia.

Entre las proteínas de membrana que se expresan en el riñón encargadas de la filtración de iones se encuentran los cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloro. La función principal de estos cotransportadores es reabsorber iones como sodio y cloro durante la filtración de la sangre. Para comprender su relevancia, es necesario repasar algunos aspectos de la fisiología renal, que se mencionan en el siguiente capítulo.

En el humano, bajo condiciones normales, los riñones filtran diariamente hasta 180 L de agua, reabsorben hasta 1.7 kg de NaCl [2] y consumen para tal efecto hasta el 30% del contenido de ATP del cuerpo. Reabsorben el 100% de las proteínas, glucosa y aminoácidos esenciales de vuelta al torrente sanguíneo, mismos que se excretarían en la orina si no ocurriera el fenómeno de reabsorción [20].

Los riñones son capaces de mantener la homeostasis del agua en el plasma sanguíneo y el líquido intersticial, regulando su excreción e ingesta. Participan de manera importante en el mantenimiento de la presión arterial, puesto que regulan el volumen del plasma y esto afecta la función cardiovascular. Filtran los productos de desecho hacia la orina y limpian constantemente la sangre [20].

La unidad anatómica mínima funcional del riñón la constituye la nefrona. Cada nefrona es una estructura tubular contorneada cuya pared está formada por células epiteliales especializadas. La morfología y función de estas células, van cambiando en la medida en la que se constituyen los diferentes segmentos de la nefrona [2] (ver Fig. 1A).

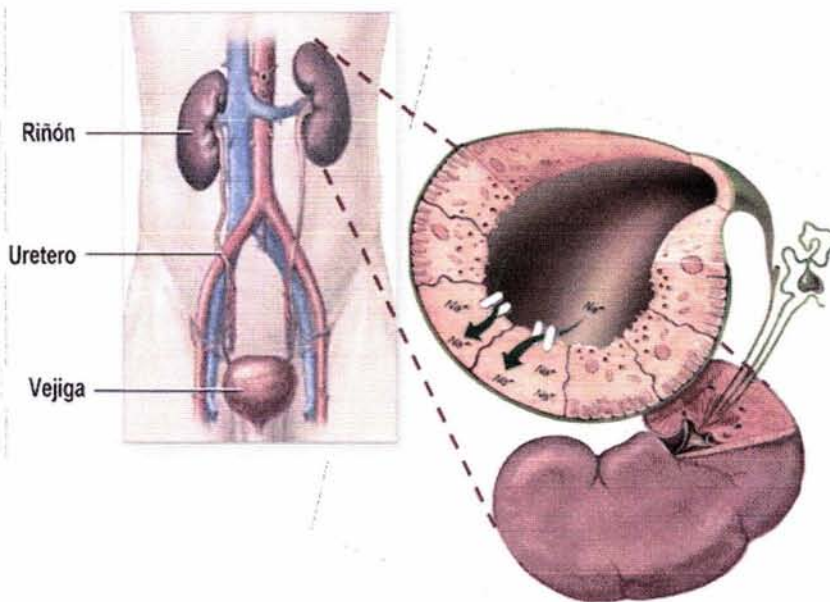
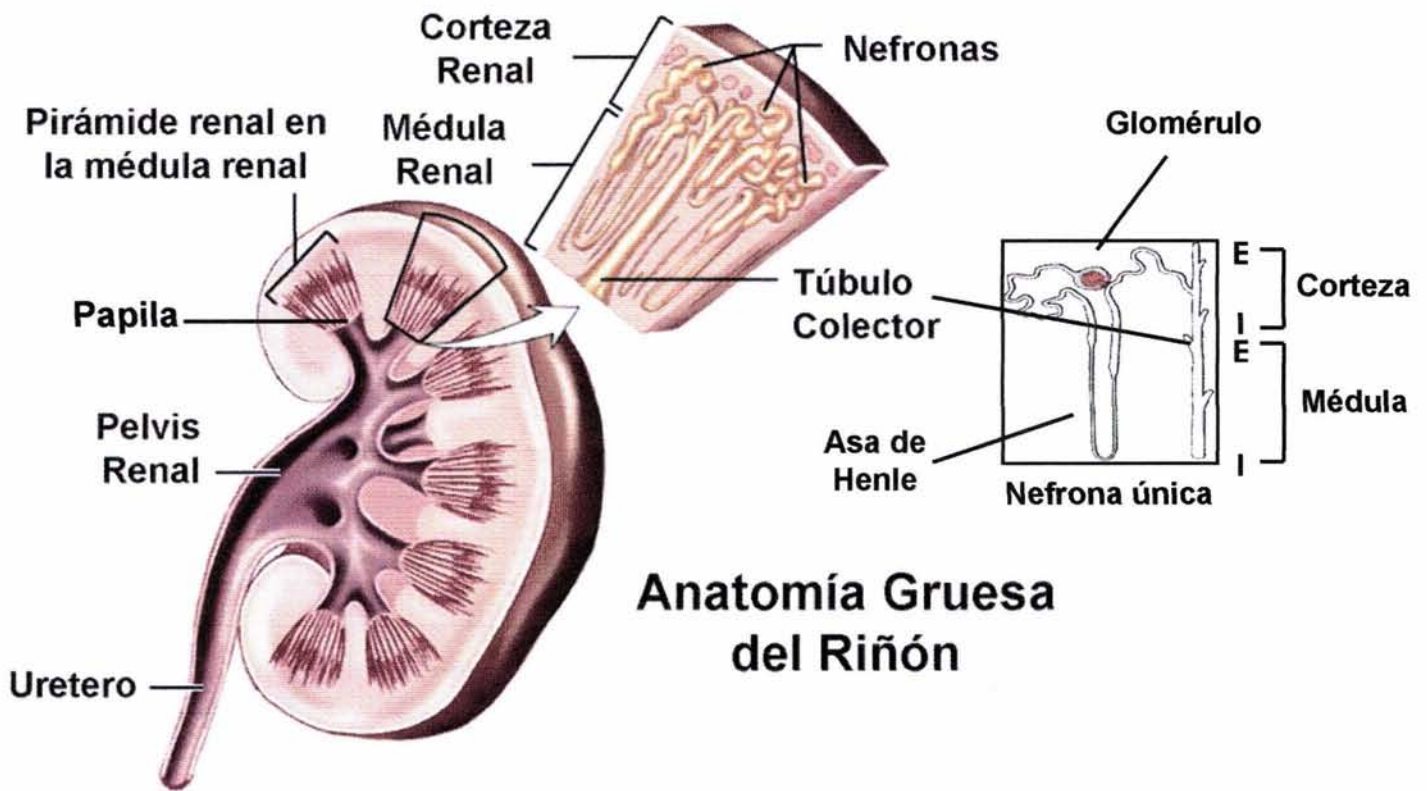


Fig. 1A. Componentes principales del sistema urinario humano y una proyección del epitelio que constituye al riñón. La línea contorneada representa a una nefrona (verde) que es la unidad mínima funcional del riñón. El plano más cercano representa la luz tubular de la nefrona en una porción distal de la estructura llamada túbulo colector. Nótese que la pared del túbulo la conforma un epitelio no estratificado de una sola capa de células. La luz de este túbulo es el lugar por el que viaja la orina que va siendo diluida o concentrada a medida que ésta viaja a través de la nefrona.

Cada riñón humano contiene aproximadamente 1.3 millones de nefronas ordenadas de manera paralela y se acompañan de una red intrincada de vasos sanguíneos. La forma, extensión y ubicación en el riñón de los segmentos que constituyen a las nefronas, condiciona su función [20]. Ver Figura 1B.



Anatomía Gruesa del Riñón

Fig. 1B. Sección sagital de un riñón en la que se distinguen varios lóbulos formados por las pirámides medulares así como la conjunción de diversos canales que confluyen en el uretero. Una sección proyectada de una de las pirámides distinguen a las nefronas. Bajo un corte longitudinal se distinguen dos capas principales: la corteza, que es la capa más exterior, y la médula, localizada debajo de la corteza y se extiende hacia la parte más profunda del riñón. Ambas capas se subdividen en secciones interna y externa, en relación con la superficie del órgano. En la corteza coinciden mayoritariamente las regiones denominadas proximales y distales de las nefronas. En la parte medular se congregan las regiones Asa de Henle así como la sección más distal del túbulo colector. En el recuadro se muestra un esquema simplificado de una nefrona única y algunas estructuras que la conforman. Se observa que en la corteza y en la médula hay dos subdivisiones, la externa (E) y la interna (I).

Estructuralmente cada nefrona se constituye de 5 secciones funcionales principales muy bien definidas: el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector [20]. En su recorrido por la nefrona, el ultrafiltrado glomerular, que después se convertirá en orina, va cambiando de composición en la medida en la que pasa por cada una de las estructuras especializadas que forman a la nefrona. El proceso de filtración de orina se resume en la Tabla 1A.

Tabla 1A. Funciones principales de los diferentes segmentos de la nefrona*

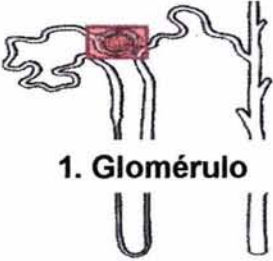
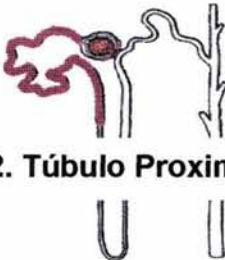
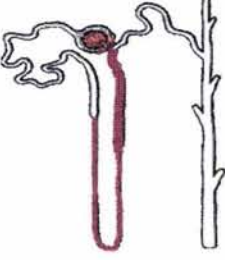
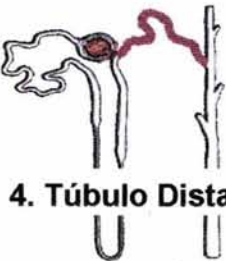
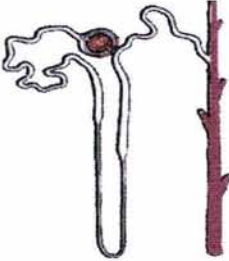
Segmento	Función
 <p>1. Glomérulo</p>	<p>En un esquema simplificado de una nefrona, como se muestra a la izquierda, es posible apreciar la primera estructura en donde se inicia la filtración sanguínea, constituida por el glomérulo. En esta estructura convergen la arteriola aferente y eferente, que conforman un micro entramado capilar envuelta por una capa de epitelio formando el aparato yuxtglomerular. En este punto se lleva a cabo la primera etapa de la filtración del plasma sanguíneo. En condiciones normales, el 100% del contenido de proteínas es filtrado, aunque iones, glucosa, aminoácidos y productos de desecho como la creatinina, sales biliares y urea, pasan fácilmente a través de la cápsula de Bowman, delimitada por la lámina basal, que constituye el principal elemento filtrador epitelial ya que no deja pasar partículas más grandes de 20 kDa. La gran mayoría de los glomérulos se orientan hacia la parte más cortical del riñón.</p>
 <p>2. Túbulo Proximal</p>	<p>En su camino, el filtrado glomerular pasa por el túbulo proximal, en donde se reabsorbe el 60-70% de la carga de sodio inicial de la sangre. También se reabsorbe el 100% de la glucosa y otros carbohidratos así como la totalidad del contenido de aminoácidos. Casi siempre este transporte se debe a la acción de transportadores acoplados a Na^+. En esta región las células capilares presentan una membrana apical muy pilosa, lo que aumenta el área reabsortiva. La actividad metabólica es mucho mayor que en otras regiones tubulares. Se secretan extensamente hacia la luz tubular las sales biliares, H^+ necesarios para mantener el balance de HCO_3^-, ácidos orgánicos como los oxalatos y uratos, así como catecolaminas, además de algunas bases. A medida que la orina desciende dentro del túbulo proximal, ésta se va concentrando cada vez más por la salida de agua mediante la acción de acuaporinas.</p>
 <p>3. Asa de Henle</p>	<p>El asa de Henle que constituye una de las adaptaciones más importantes de los vertebrados terrestres, es una estructura en donde se concentra o diluye la orina con el fin de regular la cantidad de agua del organismo. En esta porción, se recaptura del 20-30% de la carga inicial de Na^+. Se divide en dos secciones: la porción delgada (descendente y ascendente) y la porción gruesa (ascendente). La reabsorción de H_2O es muy activa en la porción descendente delgada y es nula en la porción ascendente gruesa, en donde no se expresan acuaporinas. Iones como calcio, magnesio, bicarbonato, sodio, cloro y potasio son activamente reabsorbidos, particularmente en la porción gruesa. En esta región, la actividad metabólica mitocondrial es alta. La morfología de las células que forman esta región es menos pilosa que la de las células de porciones más tempranas. En la porción gruesa se expresan diferencialmente distintas isoformas del Cotransportador Sensible a Bumetanida $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, principal responsable de la reabsorción de sodio y cloro en esta región. Los diuréticos de asa deben su nombre gracias a que actúan en esta región. La concentración y dilución de orina se regula principalmente por la acción de ADH. El transporte de sodio se activa en condiciones de hipertonicidad. El transporte de cationes divalentes se da principalmente vía paracelular a través de uniones estrechas.</p>
 <p>4. Túbulo Distal</p>	<p>En el túbulo distal se reabsorbe del 5-10% de la carga inicial de Na^+. Esta porción se encuentra principalmente hacia el extremo cortical del riñón. En el túbulo distal se encuentra una estructura denominada mácula densa, que es la zona en donde una porción de la nefrona hace contacto con las arterias aferente y eferente. Esta configuración permite sentir y regular de manera fina la reabsorción de sodio, comparando constantemente la diferencia de osmolaridad y volumen entre las dos arterias, lo que ayuda a controlar la presión arterial. En el túbulo distal actúa la hormona aldosterona. Así mismo se expresa abundantemente el Cotransportador Sensible a Tiazida $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, principal efector de la reabsorción de sodio en esta sección. En esta parte de la nefrona la orina es más diluida porque disminuye el contenido de sodio. Morfológicamente se divide en dos porciones: la porción temprana y la porción tardía. La segunda presenta dos tipos de células: las células principales (que absorben Na^+ y secretan K^+) y células intercaladas (reabsorben K^+ y bicarbonato y secretan H^+ hacia el lumen). Hacia la porción tardía, una pequeña cantidad de sodio es reabsorbida mediante los canales apicales epiteliales llamados eNAC.</p>

Tabla 1A. Continuación

Segmento	Función
 <p>5. Túbulo Colector</p>	<p>Finalmente la orina que ha sido despojada de casi todos los metabolitos y iones útiles, excepto productos de desecho como la creatinina, llega a una porción tubular que desciende hacia la médula renal y que distingue dos porciones: la porción del túbulo colector temprano o cortical y la porción tardía o medular. En esta última parte, la acción de la ADH es conspicua. En ambas regiones el pH es cercano a 5.0. La regulación de la absorción de H₂O es alta. La carga de sodio en este punto es mínima y sólo se reabsorbe del 1-2% del total inicial, además se reabsorben urea y bicarbonato. El canal de sodio eNAC es expresado abundantemente en la membrana apical de las células del túbulo colector. En la porción cortical las hormonas aldosterona y angiotensina II favorecen la reabsorción de sodio. En esta región la regulación ácido-base es fina. A partir de este punto la orina está lista para ser trasladada a la vejiga.</p>

*Datos resumidos de Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. 10th ed. 2000, Philadelphia: Saunders. xxxii, 1064. Para ver una esquematización de los diferentes procesos que ocurren cuando se reabsorbe sal a lo largo de la nefrona, dirigirse a la Fig. 1D.

La reabsorción de solutos en el riñón se completa cuando las sustancias reabsorbidas en la nefrona son capturadas y transportadas de vuelta al torrentes sanguíneo. La presencia de los capilares sanguíneos cercanos a la nefrona permite que el circuito de reabsorción se complete. Éstos se distribuyen a lo largo de corteza y la médula renal y absorben continuamente los solutos filtrados por la nefrona que se encuentran en el espacio intersticial, y esto lo hacen expresando transportadores específicos localizados en la membrana basolateral [20]. Por ejemplo, mientras que en el TALH se expresa CSB1, en las células vasculares se expresa CSB2 (la isoforma ubicua), que facilita la reabsorción de Na-K-Cl iniciada por CSB1 en el TALH, completando el circuito de reabsorción para estos solutos.

En condiciones en las que el organismo requiere conservar una mayor cantidad de agua o de antidiuresis, el proceso de reabsorción de iones se lleva a cabo mediante un mecanismo de contracorriente. En este proceso las células, especialmente del asa de Henle, son capaces de favorecer la formación de un gradiente de osmolaridad a lo largo de la nefrona, que aumenta a medida que descendemos hacia la médula renal, que es útil para la reabsorción de sal. En este mecanismo, el aumento de la concentración plasmática de ADH constituye el activador de este proceso.

La estructura anatómica de la nefrona es determinante para llevar a cabo dicho mecanismo. Como se describe en la figura 1C, el proceso de ultrafiltración en las diferentes regiones de una nefrona es diferencial, es decir, los sustratos transportados son diferentes según la porción tubular de la que se trate. La expresión de transportadores y canales con distintas selectividades y afinidades por los sustratos que translocan en las diferentes secciones de la nefrona, determinan la función de una región en particular.

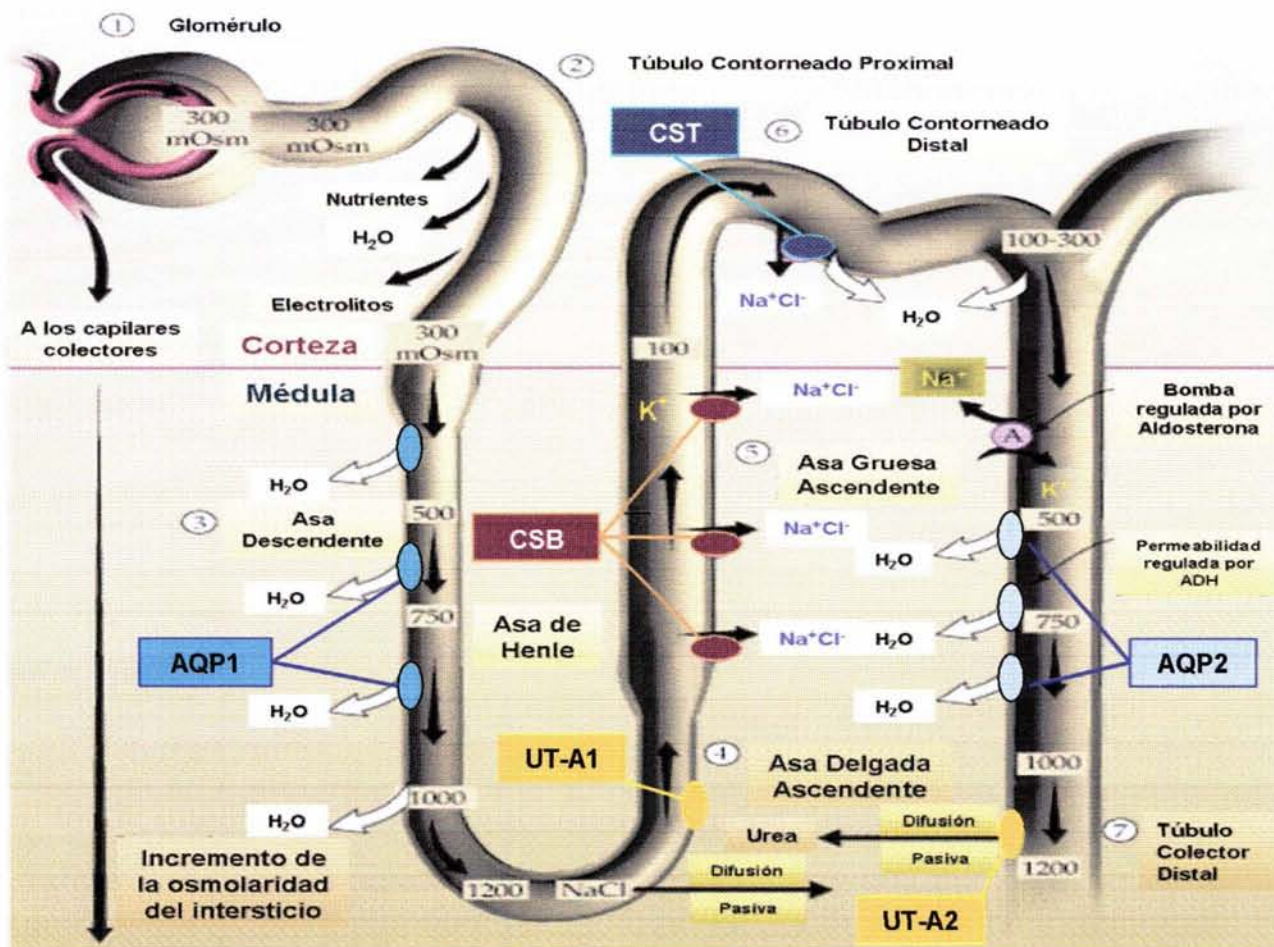


Fig. 1C. Esquema simplificado del proceso de filtración en la formación de orina en condiciones de antiuresis. 1. El proceso inicia con la filtración de la sangre en el glomérulo. 2. El filtrado glomerular resultante pasa por el túbulo proximal y baja por la porción descendente delgada del asa de Henle (TDLH) en donde se reabsorben todos los nutrientes como carbohidratos y aminoácidos. 3. El mecanismo de contracorriente operante (que se describe más adelante) forma los gradientes de osmolaridad que se representan en la figura (~300 a 1200 mOsm $kg^{-1} H_2O$ desde la porción cortical a la porción medular en donde están las papilas renales), mediante la salida de agua desde la luz tubular vía AQP1. 4. En la porción ascendente delgada comienza la reabsorción de cloro, mediante un canal llamado CLC-K1 (no se muestra). 5. En la Porción ascendente gruesa del asa de Henle (TALH), la reabsorción de sodio es alta y ocurre vía CSB1, que se expresa en la membrana apical de las células de esta porción, que da hacia la luz del túbulo. En este estado, el transporte es de tipo $Na^+:K^+:2Cl^-$, pero el K^+ es reciclado de vuelta a la luz tubular (en amarillo) vía el canal apical de K^+ ROMK (no se muestra). La mayor parte del sodio capturado intracelularmente es bombeado al intersticio mediante la acción de la ATPasa basolateral de $Na^+:K^+$ (que no se indica en esta región) y que confronta el intersticio renal. Nótese que no hay reabsorción de agua en esta región. 6. A medida que la orina asciende a través de la porción cortical del Túbulo contorneado distal, la osmolaridad disminuye y la reabsorción de agua por parte de las células, es mínima. La carga de Na^+ del fluido que es reabsorbida en esta porción representa el 5-10% de la carga inicial del filtrado glomerular. El sodio es reabsorbido vía CST, que se expresa abundantemente en la membrana apical las células del túbulo contorneado distal (DCT), que se encarga de regular de manera fina la reabsorción de sodio esta región. Nótese que la osmolaridad es cercana a 100 mOsm $kg^{-1} H_2O$, que es menor que la del plasma sanguíneo. 7. Descendiendo nuevamente hacia la médula, se haya el Túbulo Colector (TC), cuya función es recapturar el 1-2% de la carga inicial de Na^+ . La osmolaridad intratubular vuelve a incrementarse por la salida de agua vía AQP2. La regulación del transporte por esta proteína, controla la concentración o dilución de la orina antes de ser excretada. En presencia de ADH, el transporte de agua es alto, por lo que la orina se concentra. La urea producto del metabolismo de proteínas, que previamente no había sido reabsorbida, difunde al intersticio desde el túbulo colector vía el transportador de urea UT-A2 y se recicla en la porción delgada descendente del asa de Henle vía UT-A1, favoreciendo el incremento de la osmolaridad en el intersticio medular. El papel de ADH es regular la reabsorción de agua y sodio en el TDLH y TALH. La Aldosterona, por su parte, favorece la reabsorción de sodio únicamente a nivel del DCT y el TC vía CST y la bomba de Na^+ - K^+ , que son elementos regulatorios claves para la formación de orina en el riñón.

La expresión de CSB1 y CST en la nefrona está compartimentada (Fig. 1D). Ambos cotransportadores se expresan en la membrana apical de las células de la porción ascendente gruesa del asa de Henle y en la porción distal de la nefrona, respectivamente.

Expresión de los cotransportadores CST y CSB1 en la nefrona

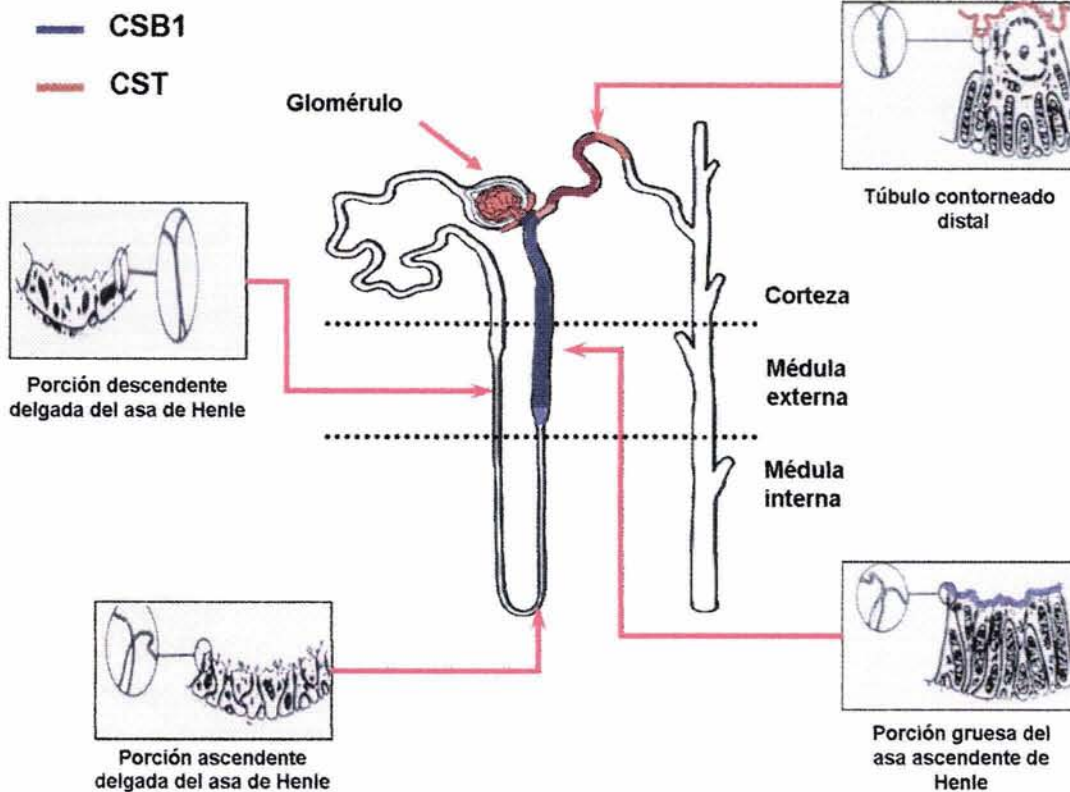


Fig. 1D. Los cotransportadores CST y CSB1 se expresan en la membrana apical del epitelio tubular en la nefrona. Estos cotransportadores participan de forma importante en definir la función de reabsorción en las porciones de la nefrona en donde se expresan. CST se localiza primordialmente en la región de la nefrona conocida como túbulo contorneado distal (DCT) la porción distalo-cortical (rojo). CSB1 se expresa a lo largo del asa ascendente gruesa de Henle (TALH), (azul). Se muestran algunos esquemas que describen la morfología de algunas células epiteliales que conforman a la nefrona. Nótese que en las zonas donde existe una tasa de reabsorción más activa, la presencia de mitocondrias es mayor.

La actividad estudiada de estos cotransportadores en cuanto a afinidad por los iones y sensibilidad a la osmolaridad, se correlaciona con las condiciones fisiológicas de concentración de sal así como de tonicidad presentes en la nefrona. La figura 1D resume la topografía de la expresión de CST y CSB1 en la nefrona.

A nivel celular, ambos cotransportadores se localizan en la membrana apical de las células epiteliales (Fig. 1F). Las funciones de estas y otras proteínas de membrana necesarias para el transporte transepitelial de solutos en el TALH y en DCT así como algunas enfermedades ligadas a su mal funcionamiento, se explican brevemente en el pie de figura.

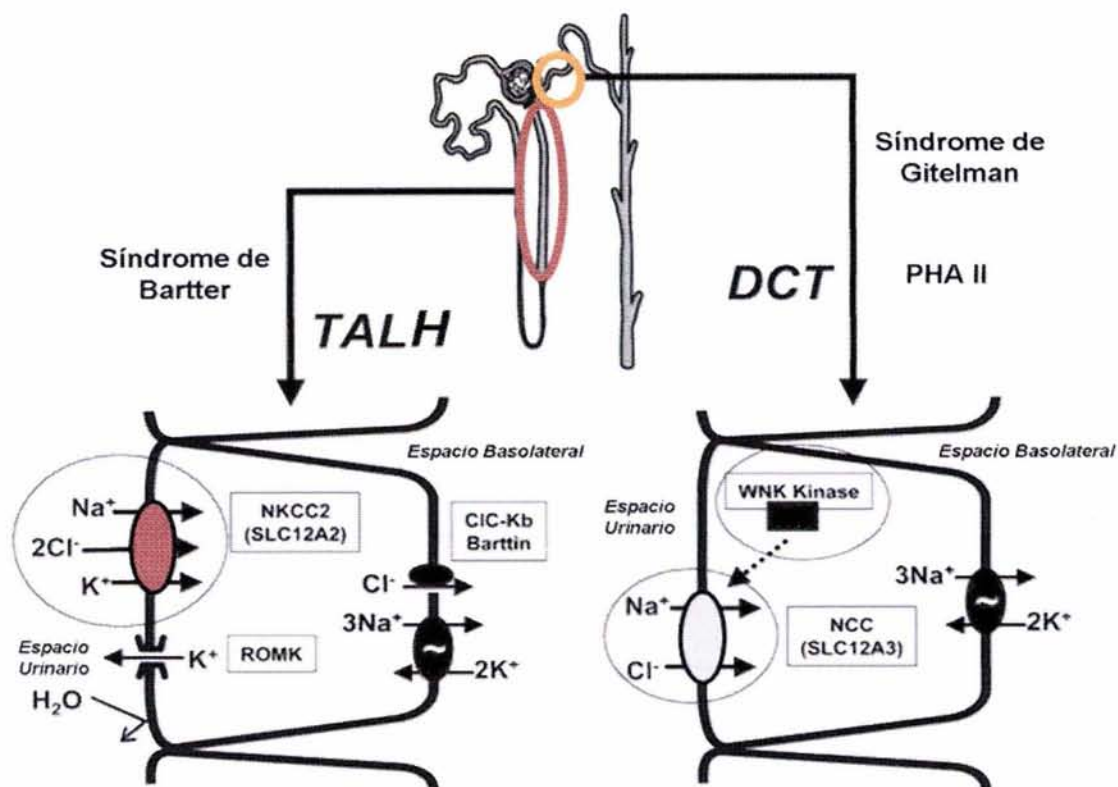


Fig. 1F. Esquema de la localización membranal de los cotransportadores CSB1 (rojo) y CST (azul), en el TALH (Porción ascendente gruesa del asa de Henle) y en DCT (Túbulo contorneado distal), respectivamente. En condiciones de hipertonicidad en la porción medular del TALH, la reabsorción de iones por CSB1 es de tipo $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$. Tanto el Na como el Cl que han entrado a la célula son expulsados a través de la bomba de Na-K (ATPasa) y un canal de cloro (CIC-KNB o Barttina). Puesto que se forma un potencial ligeramente negativo hacia la membrana basolateral (-3mV), ya que hay un ión K^+ más en el citosol por cada $2Na^+$ y $2Cl^-$ transportados por la vía antes mencionada, se recicla continuamente el potasio vía un canal de potasio rectificador entrante (ROMK) que envía al K^+ hacia la luz tubular. Al mismo tiempo, se transporta un catión como Na^+ , Ca^+ o Mg^+ vía paracelular (no se muestra en la figura). Cuando CSB1 o ROMK están mutados, se presenta el síndrome de Bartter. Por su parte, CST, en el túbulo contorneado distal transporta $Na^+ : Cl^-$ en condiciones de hipotonicidad ($<200 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$). Mutantes de CST en humanos causan el síndrome de Gitelman, que se detalla en el siguiente capítulo, y mutantes de la cinasa que fosforila a esta proteína (WNK1) son responsables de una enfermedad llamada Pseudohipoadosteronismo tipo II (PHA II), que se caracteriza entre otros signos por una elevada presión arterial. Tomado de Hebert, S.C., D.B. Mount, and G. Gamba, *Molecular physiology of cation-coupled Cl(-) cotransport: the SLC12 family*. Pflügers Arch, 2004. 447(5): 580-93.

En el riñón operan dos estados de filtración necesarios para mantener el volumen de agua en el cuerpo. Uno es el estado de diuresis y el otro, el de anti diuresis. En condiciones de diuresis, es decir, cuando se va a excretar un exceso de agua, la hormona hipofisaria vasopresina (también conocida como hormona anti diurética ADH) se encuentra presente en muy bajas concentraciones en sangre y la reabsorción de iones no es tan activa. Cuando los niveles de ADH aumentan, el volumen urinario disminuye, se presenta la sensación de sed y la reabsorción de iones en el riñón es mayor, lo que permite retener una máxima cantidad de agua. Este proceso, contrario a la diuresis, se denomina anti diuresis. La secreción de ADH por la hipófisis responde sobretodo a las variaciones de osmolaridad en el plasma, lo que cambia su volumen y por tanto la presión arterial. Este cambio es detectado por barorreceptores localizados en el corazón [20].

Parte de la acción de hormonas que regulan la reabsorción de iones a nivel celular se debe a que activan cascadas de señalización, esto conduce a la modificación de la actividad de muchas proteínas, entre ellas, a la de los cotransportadores electroneutros. La activación de cinasas como PKC y PKA es el resultado de la

acción de ADH en el riñón. Cuando se une la hormona a los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, el aumento de Ca^{2+} intracelular y/o el incremento de cAMP inducen la activación de dichas cinasas. Cuando se activa PKC se observa un incremento en el transporte de Na^+ , K^+ y Cl^- en ovocitos que expresan la isoforma larga del cotransportador CSB1 [7] y dicho incremento correlaciona con el aumento de la expresión de este cotransportador en la membrana plasmática [21]. Adicionalmente, el efecto de la hormona ADH provoca que cambie la expresión en la membrana de este cotransportador en la porción medular ascendente gruesa del asa de Henle (TALH), esto provoca que dicho cotransportador cambie la estequiometría de transporte de tipo $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ a una de tipo $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, permitiendo un mayor flujo neto de sodio y cloro al espacio intersticial.

Otra hormona involucrada con la reabsorción de sodio en el riñón es la aldosterona (una hormona esteroidea secretada por las suprarrenales). Esta hormona afecta la reabsorción de sodio a nivel del túbulo distal, pero no a nivel del TALH. Entre otros efectos, la aldosterona favorece un aumento de la cantidad de mRNA que codifica para CST y de la cantidad de proteína expresada en la membrana de las células del túbulo distal [22].

Durante el proceso de antidiuresis, la función de CSB1 juega un papel preponderante en el mecanismo de contracorriente. La función de este mecanismo es retener agua mediante la reabsorción de solutos por ósmosis. Uno de los efectos que trae la reabsorción de iones en distintas partes de la nefrona es la formación de un gradiente de osmolaridad. El mecanismo de contracorriente es dinámico [16]. En condiciones de diuresis no es operante, el exceso de agua diluye la médula renal y no se forma el gradiente osmótico. Cuando el organismo requiere agua, secreta ADH y se produce la antidiuresis.

Éste consta de cuatro fases que se repiten cíclicamente. Cada ciclo coopera con el siguiente hasta elevar la tonicidad de la médula a un nivel máximo ($1200 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$). Cada ciclo se compone de cuatro etapas. CSB1 es un elemento fundamental en este mecanismo, que se esquematiza en la figura 1G.

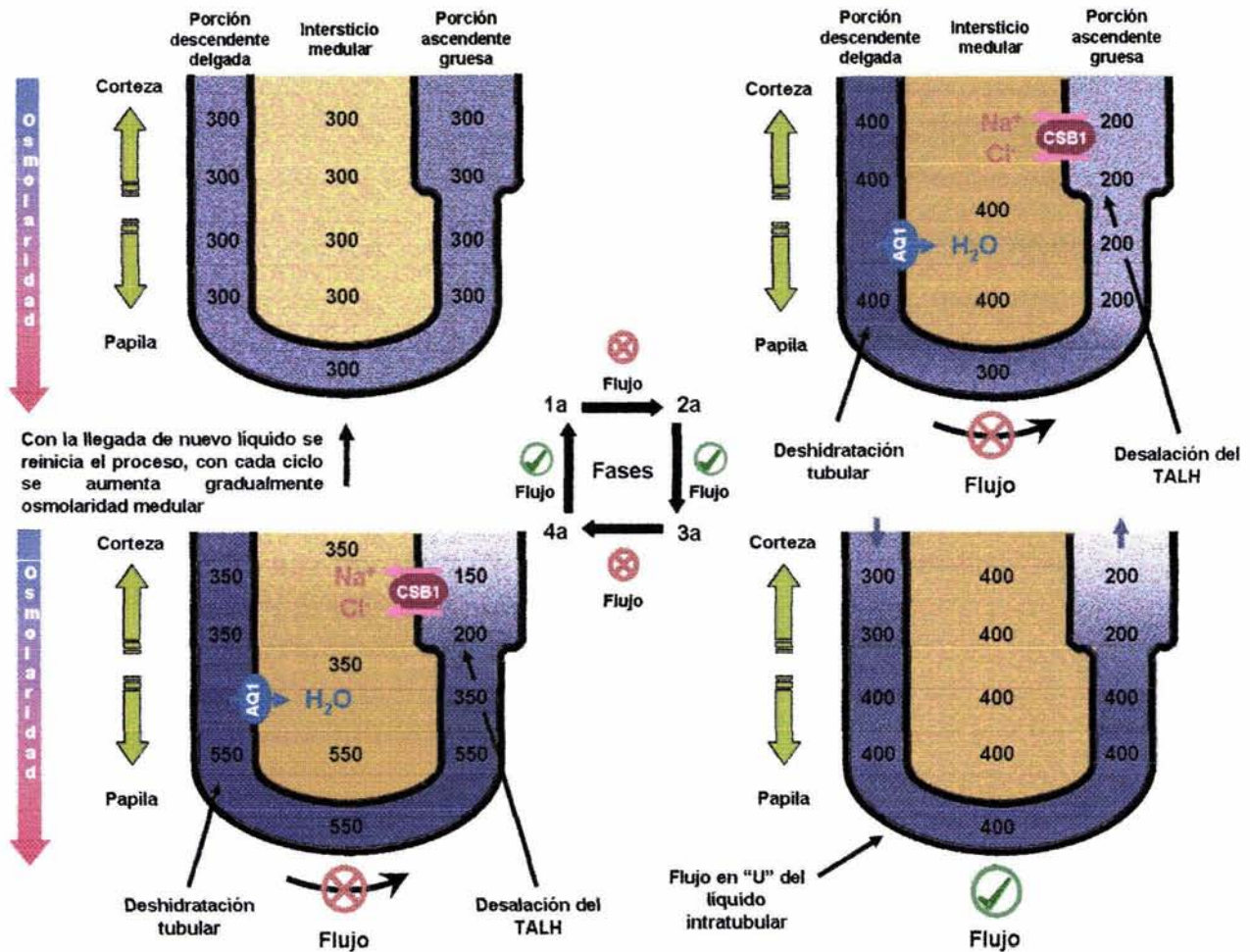


Fig. 1G. Esquema general del mecanismo de contracorriente necesario para reabsorber Na-Cl en la nefrona. Se destaca el papel funcional de CSB1 como un elemento clave para concentrar la orina durante la antidiuresis en la porción del TALH. Los números indican la osmolaridad relativa tanto en la luz tubular como en el espacio intersticial. *Fase 1.* Consiste en la salida de H₂O desde la luz tubular de la porción descendente delgada del asa de Henle (TDLH) hacia el intersticio, por la acción de la acuaporina (AQP1). Esto provoca que el líquido al interior de la nefrona vuelva más concentrado, lo que aumenta la osmolaridad intratubular. En esta fase no hay movimiento en "U" del líquido intratubular en dirección TDHL-TALH, es una fase estacionaria. *Fase 2.* Ocurre cuando se transportan activamente Na-Cl pero no agua, mediante la acción de CSB1 en la porción ascendente delgada del asa de Henle (ThALH), lo que disminuye la concentración del fluido intratubular y por tanto disminuye su osmolaridad a medida que el líquido asciende hacia la corteza. En esta etapa, tampoco hay movimiento en "U" del líquido intratubular. Como un proceso secundario al aumento de la osmolaridad intratubular, existe un reciclaje de urea desde la porción ascendente delgada del asa de Henle hacia el intersticio, que ocurre mediante la acción del transportador de urea UT2. Una vez dentro de la célula, el Na⁺ y el Cl⁻ transportados por CSB son expulsados en el polo basolateral de las células epiteliales vía la ATPasa de Na-K y el canal de Cl⁻ denominado Barttina [23]. *Fase 3.* En esta fase dinámica donde se presenta un movimiento en forma de "U" del líquido intratubular, (forma evocada por el asa de Henle), se conjuga el resultado de las dos fases anteriores. Una vez reabsorbidos el NaCl en el TALH y la osmolaridad se ve aumentada en el intersticio, se presenta la reentrada de agua por ósmosis vía AQP1 (que actúa en ambas direcciones) hasta que la osmolaridad intratubular y la del intersticio alcanzan un equilibrio. Con la llegada de más líquido proveniente del túbulo proximal, se desplaza el líquido hipertónico del asa de Henle hacia arriba, en donde la reabsorción de sal aumenta. *Fase 4.* Finalmente, cuando el nuevo líquido comienza a ser deshidratado en el TDLH, las isoformas de CSB1 de la porción cortical que presentan mayor afinidad por los iones (llamadas CSB1-9B y 9A) se encargan de disminuir aún más la tonicidad de la orina dejándola en condiciones de hipotonicidad cercanas a 200 mOsm kg⁻¹ H₂O. Una vez que la orina llega al túbulo distal, CST continúa la reabsorción de Na⁺:Cl⁻ y disminuye aún más la tonicidad del líquido intratubular. La tendencia a un equilibrio osmolar entre las regiones del ThDLH, el intersticio y el TALH por la constante actividad de los cotransportadores descritos en las fases anteriores, poco a poco van formando el gradiente osmolar a lo largo de la nefrona. La hipertonicidad medular permite la reabsorción de agua en los túbulos colectores vía AQP2, regulada por ADH. A medida que se repiten estos ciclos, la cooperación de cada uno a la formación del gradiente es tal que en condiciones de antidiuresis, la osmolaridad medular llega a ser aproximadamente 1200-1300 mOsm kg⁻¹ H₂O en individuos sanos. En la rata canguro, que vive en zonas de extrema desecación, la osmolaridad medular llega a ser cercana a los 5000 mOsm kg⁻¹ H₂O, lo que le permite maximizar sus reservas de agua.

Desde que se clonaron por primera vez los genes que codifican para CST y CSB1, no sólo se han podido identificar a más miembros estructural y funcionalmente relacionados, sino también se ha obtenido información valiosa acerca de la dinámica de transporte, de su expresión así como de su regulación de los diversos miembros que conforman a la familia, a la que pertenecen CST y CSB1. Existe información estructural sobre todo referente a las predicciones *in silico* de su estructura secundaria. Sin embargo, poco se sabe acerca de cuáles son las regiones de la proteína involucradas en el transporte de iones. En el siguiente capítulo se mencionan algunas características conocidas de la estructura de la familia de cotransportadores de cationes acoplados a cloro, relevantes para el presente estudio.

Capítulo II

2.1 Los Cotransportadores Renales de Cationes Acoplados de Cloro (CCC).

Una gran cantidad de moléculas que son transportadas al interior de la célula son polares y están disueltas en agua. La probabilidad de que atraviesen la membrana plasmática mediante difusión es infinitamente baja ($1 \times 10^8 - 1 \times 10^{-12}$) [18]. Las proteínas de membrana como los cotransportadores, canales y bombas, abaten esta barrera termodinámica, por lo que constituyen la estrategia biológica para formar vías selectivas a un número de solutos para ser transportados [24].

Los CCC son simportadores de membrana capaces de transportar iones monovalentes como sodio o potasio, siempre acompañados del ión cloro. Una característica distintiva de estos cotransportadores es que tienen una tasa de transporte lenta, a diferencia de la que presentan proteínas de membrana como los canales iónicos y bombas (cerca de 10 000 a 100 000 veces más lenta) [18]. El tipo de transporte que llevan a cabo es activo secundario, lo que quiere decir que no se requiere de la hidrólisis de ATP o GTP para el transporte de los iones, en su lugar, se aprovecha la energía derivada del gradiente electroquímico derivado principalmente del sodio [14, 18, 24]. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de transportadores con 12 segmentos transmembranales (pfam00324). Esta superfamilia comparte un dominio de permeasa de aminoácidos.

La activación del transporte de los CCCs depende del gradiente de concentración, principalmente de sodio o de potasio según sea el cotransportador de que se trate [2-4, 6]. Todos los miembros de la familia movilizan estequiométricamente el mismo número de cationes y aniones, por lo que no modifican el potencial eléctrico neto de la membrana [1].

Basados en el número y tipo de iones que son transportados, el transporte efectuado por los CCC se divide en tres clases: el de tipo $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ representado por CST, el de tipo $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ representado por los KCCs y, finalmente, el de tipo $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ representado por CSB1 y CSB2 [3].

Filogenéticamente todos los miembros de esta familia están muy relacionados y tienen un ancestro común. La figura 2A y 2B resumen el parentesco a nivel de la secuencia de aminoácidos. La figura 2A agrupa a los miembros de la familia en tres ramas principales: las ramas centrales y opuestas corresponden a dos miembros recientemente descubiertos (CIP y CCC9). La rama superior describe a los cotransportadores KCC1-4. La rama inferior trifurcada incluye a los cotransportadores CSB1/NKCC2 y CSB2/NKCC1 y CST/NCC.

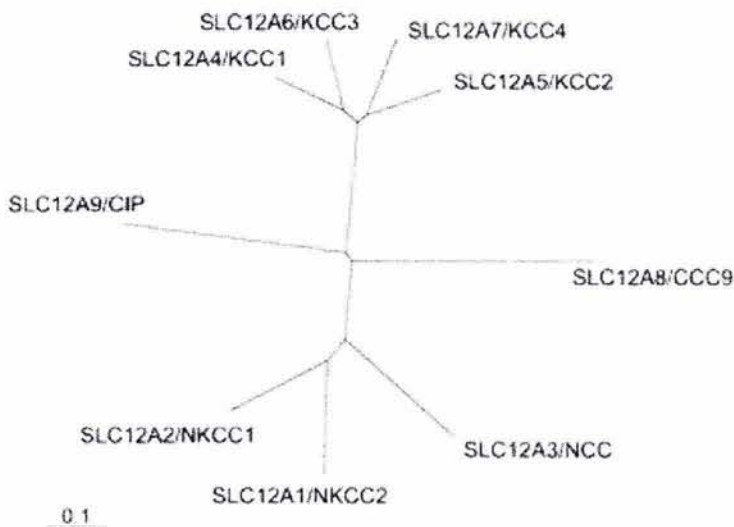


Fig. 2A. Árbol filogenético de la familia de los CCC. El árbol fue calculado usando el programa ClustalW. La barra corresponde a una distancia de 10 sustituciones por cada 100 aminoácidos. Todas las secuencias son humanas. Tomado de Hebert, S.C., D.B. Mount, and G. Gamba, *Molecular physiology of cation-coupled Cl(-) cotransport: the SLC12 family*. Pflugers Arch, 2004. 447(5): 580-93.

Los CCC son codificados por una familia de genes, denominada SLC12, que incluye a nueve miembros reportados hasta la fecha. Las proteínas que codifican estos genes, comparten un grado de identidad del 19 al 74% a nivel de la secuencia de aminoácidos. La figura 2B resume los grados de identidad entre todos los miembros de esta familia.

Familia de Cotransportadores de Cationes Acoplados a Cloro

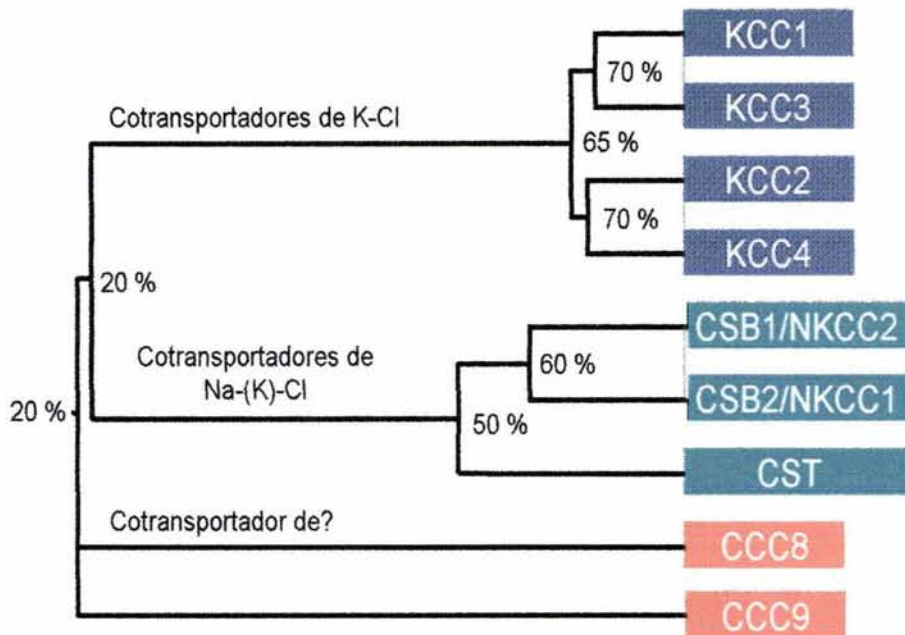


Fig. 2B. Árbol filogenético de los miembros de la familia CCC en secuencia de aminoácidos entre distintos miembros de la familia CCC. Todas las proteínas son derivadas de rata, excepto CCC8 y 9. Los colores identifican a los cotransportadores filogenéticamente más cercanos entre sí. Las secuencias analizadas son de rata.

Los CCC juegan una variedad de roles en la fisiología de la célula y su efecto en el organismo depende del tipo celular en el que éstos se expresen. Una de las funciones principales que se les ha conferido es la de regular la homeostasis del volumen de los líquidos intracorporales (sangre, intersticio y citosol), la homeostasis de la tensión arterial, en procesos de eflujo de iones en epitelios secretores [3] así como de la regulación del estado de polarización membranal en neuronas y la regulación del volumen celular en diferentes células no epiteliales.

Funcionalmente los CCC, se dividen en tres tipos: El primero presenta una estequiometría de transporte $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ e incluye a los cotransportadores sensibles al diurético bumetanida conocidos como CSB1/NKCC2 y CSB2/NKCC1, (los genes que los codifican se denominan SLC12A1 y SLC12A2, respectivamente). El segundo tipo consta del transporte de Na^+ y Cl^- con una estequiometría 1:1, representado por un único miembro denominado CST/NCC o Cotransportador Sensible al diurético Tiazida (SLC12A3). Finalmente la tercer modalidad de transporte, es utilizada por las proteínas KCC1, 2, 3 y 4 (SLC12A4, 5, 6 y 7, respectivamente), muestra una estequiometría de transporte de un ión K^+ acoplado con un ión Cl^- . La característica más destacable de este tipo de transporte es que el flujo de iones es extrusivo, es decir, expulsan iones desde el citosol hacia el espacio extracelular. Ver figura 2C.

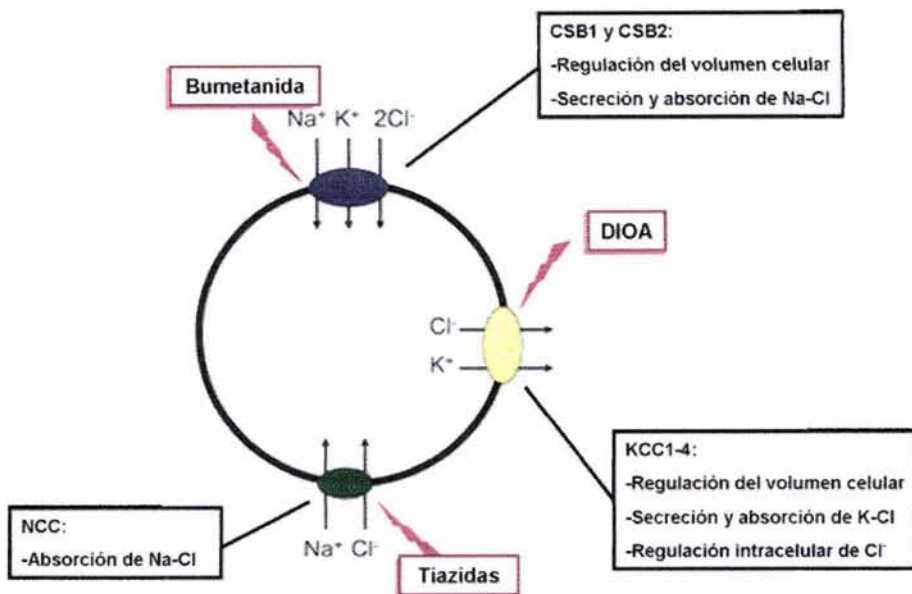


Fig. 2C. Esquema funcional de tres clases de cotransportadores así como algunos fármacos capaces de inhibir su acción. Se identifican a los cotransportadores $K^+:Cl^-$ denominados KCCs, al cotransportador $Na^+:Cl^-$ CST, y a los cotransportadores $Na^+:K^+:2Cl^-$ CSB1 y CSB2. Dado que todavía se desconoce la función de las proteínas CIP-1 y CCC9, no se menciona ninguna función al respecto. Ver texto para más detalles. DIOA (*ácido R(+)-[(2-N-butil-6,7-dicloro-2-ciclopentil-2,3-dihidro-1-oxo-1-H-indenil-5-il)-oxil] acético*), es un derivado estilbénico capaz de inhibir únicamente a los KCCs. Tomado de Hebert, S.C., D.B. Mount, and G. Gamba, *Molecular physiology of cation-coupled Cl(-) cotransport: the SLC12 family*. Pflugers Arch, 2004. 447(5): p. 580-93.

La función de los CCC es variable dependiendo del tipo de tejido en el que se expresen. En el caso de CST y CSB1, que se expresan únicamente en el riñón, son necesarios para la reabsorción de sal y se expresan en las membranas apicales del epitelio tubular [4, 6, 25, 26]) en diferentes regiones de la nefrona como se mencionó en el capítulo 1.

CSB2/NKCC1, se expresa en la membrana basolateral de una gran cantidad de epitelios y en una variedad de células no epiteliales, por lo que se le considera de expresión ubicua. Este cotransportador ha sido uno de los más estudiados desde el punto de vista farmacológico y molecular.

Los cotransportadores $K^+:Cl^-$ KCCs, a diferencia de los casos anteriores, pueden transportar iones hacia afuera de la célula sobre todo en condiciones de hinchamiento celular. Su función principal es ayudar a mantener estable el volumen intracelular. KCC1 es ubicuo y considera como un gen *housekeeping*. KCC2 se expresan únicamente en cerebro y participan en eventos de repolarización y regulación del volumen en neuronas así como en eventos de diferenciación neuronal durante el desarrollo [27]. Una característica importante de este cotransportador, es que presenta un transporte alto en condiciones de isotonicidad a diferencia de otros KCCs. Esta característica se ha asociado con la estructura de su segmento C-terminal rico en prolinas y a.a cargados negativamente en un tracto de aproximadamente 100 a.a, que se ha propuesto como un elemento importante para el transporte. En el caso de KCC3, se expresa en células excitables del páncreas, músculo, corazón, neuronas de la espina dorsal así como en el riñón y la placenta. Existen tres isoformas, de las cuales no se conoce bien las diferencias de su papel funcional. Mutaciones en el gen de KCC3 se han asociado con una enfermedad en humanos donde no se desarrolla bien el cuerpo calloso y existe neuropatía periférica (ACCPN), aunque no es claro cómo ocurre este proceso. Finalmente KCC4, también se expresa en múltiples tejidos, aunque en menor proporción que KCC1. Su expresión es robusta en el riñón y algunas neuronas del sistema nervioso central. Al parecer es importante para regular el

volumen celular y estados de acidosis en las células intercaladas del túbulo proximal. En ratones *knock-out* (-/-) para KCC4 se presenta sordera [3].

Adicionalmente se incluyen a dos miembros de esta familia recientemente reportados, cuya función todavía se desconoce con precisión. CCC9 (SLC12A8) o Cation-Chloride Cotransporter, originalmente clonado de *D. melanogaster*, un nuevo miembro que sólo comparte el 19% de grado identidad, a nivel de proteína, con el resto de la familia. Y por último, la proteína CIP-1 (SLC12A9) o *Cation-chloride cotransporter Interacting Protein*, una proteína de 918 residuos de aminoácidos capaz de inhibir la actividad de NKCC1 cuando se coexpresa en ovocitos de *X. laevis* [28]; además presenta motivos de unión tipo 1 con la proteína de citoesqueleto PDZ en su extremo C-terminal. Su papel fisiológico es aún incierto [29]. Se sugiere que CIP-1 es necesario para regular negativamente la función de otros cotransportadores, mediante heterodimerización [29].

Estructuralmente, todos los miembros de la familia poseen tres regiones principales. Poseen dos segmentos intracelulares correspondientes a los dominios N- y C-terminales, que flanquean una región central que corresponde a los segmentos TM junto con los segmentos conectores [6]. Ver figura 2D.

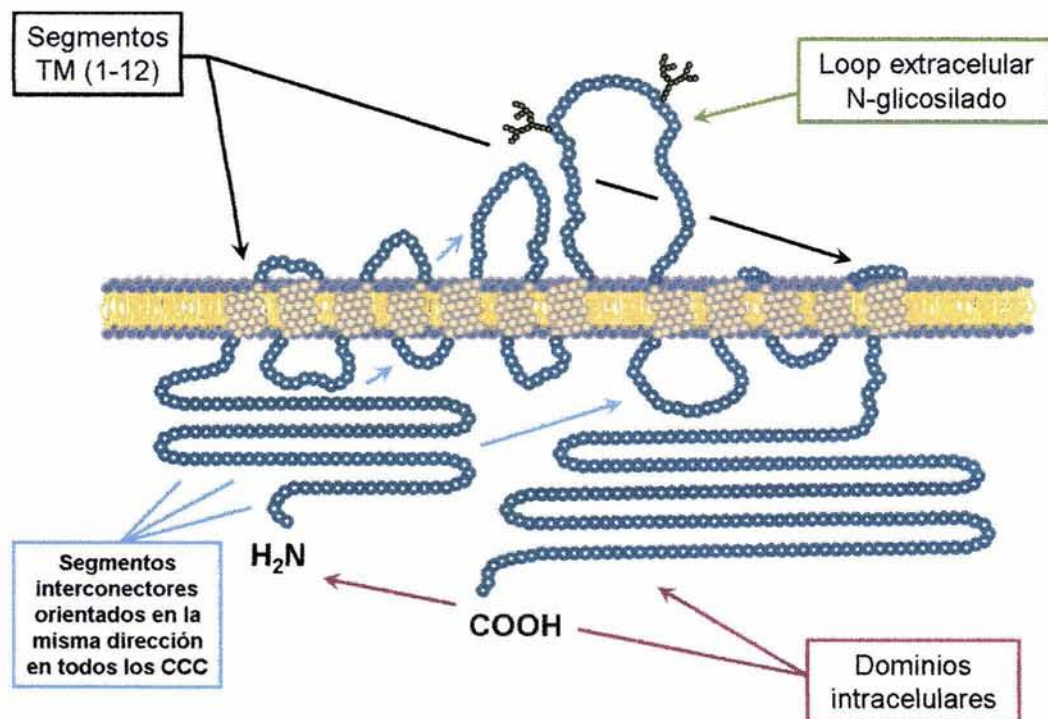


Fig 2D. Esquema de la estructura general de los CCC. Todos los miembros comparten la topología propuesta, con 12 cruces transmembranales (TM), dos dominios C- y N-terminal intracelulares y los segmentos conectores orientados en la misma dirección. Los sitios de N-glicosilación son variables dependiendo del cotransportador.

Poco se conoce acerca de la relación estructura-función de estos cotransportadores. Se han hecho una serie de trabajos en otros cotransportadores dependientes de sodio en bacterias y de mamífero como son el de Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/Pi , $\text{Na}^+/\text{Glucosa}$, Na^+/I^- , entre otros [30]. De éstos, la mayoría de los trabajos reportados se refieren principalmente a la caracterización de la función y algunos aspectos de regulación.

La estrategia de estudio para probar la función generalmente consiste en inyectar cRNA en ovocitos de *X. laevis*, en transfectar y sobreexpresar estas proteínas en diferentes líneas celulares de mamífero (HEK-293, HeLa, CHO, etc.), o bien, en aislar y purificar membranas de distintas células o probar su función en cultivo, en el caso de bacterias. Casi siempre se utilizan marcadores radioactivos o estudios de electrofisiología para medir dicha función.

En fechas recientes se ha abordado a fondo el aspecto estructuro-funcional. Sobre todo en los cotransportadores Na^+/H^+ (NhaA) [31-34], $\text{Na}^+/\text{Glucosa}$ (GLUT 1, 2 y 4) [35] y Na^+/I^- [36, 37]. A partir de dichos estudios ha sido posible inferir el papel que juegan algunos dominios de las proteínas en el transporte e incluso en el primer caso se ha logrado cristalizar y analizar por densidad electrónica la posición de los segmentos TM. Sin embargo, estos cotransportadores comparten poca similitud con los cotransportadores usados para el presente estudio, por lo que no ha sido posible extrapolar datos derivados de dichos estudios hasta la fecha, sobre todo desde el punto de vista de algunos aminoácidos esenciales que determinan la afinidad por los iones.

Es importante destacar que la extensa dificultad para cristalizar proteínas de membrana, ha dificultado el estudio de la estructura de los cotransportadores electroneutros; no hay modelos tridimensionales derivados del análisis de difracción de rayos X ni tampoco estudios de resonancia magnética, ni siquiera hay intentos para cristalizar segmentos peptídicos encaminados al estudio estructural de ninguno de los miembros de la familia de los CCC. Es un campo en desarrollo. Proponemos la utilización de proteínas quiméricas como una estrategia alternativa para comprender el papel estructural sobre la función de los CCC, en particular de CSB1 y CST, puesto que resulta ser relativamente fácil, rápida (comparada con el tiempo que toma hacer cristales) y brinda al mismo tiempo información funcional.

Para describir la relevancia de los resultados presentados en esta tesis, es necesario mencionar primero algunas características específicas de los cotransportadores electroneutros CSB1 y CST.

2.2 El Cotransportador Sensible a Bumetanida $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ CSB1 ó NKCC2.

Desde que se clonó por primera vez en 1994 por Gamba y colaboradores [4], CSB1, el *Cotransportador Sensible a Bumetanida $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$* , se describieron una serie rasgos estructurales y funcionales básicos acerca de este cotransportador. CSB1 de rata (CSB1r, que es la clona que se usó en el presente estudio) tiene una longitud de 1095 aminoácidos y una masa de 120-130 kDa; en presencia de Glucosidasa H ésta no cambia. La secuencia clonada en la rata tiene una longitud de 4612 pb que contiene un marco de lectura abierto (ORF) de 3308 pb. Los extremos no traducidos (UTR) 5' y 3' que flanquean el ORF, se extienden 215 y 1045 pb, respectivamente. Esta secuencia genera un producto de mRNA de ~4.6 kb, que se encuentra únicamente en la porción de la médula externa del riñón [6]. Se sabe que la forma funcional de este cotransportador oligomeriza en forma de dímero [38].

El transporte estequiométrico de CSB1 es de $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, lo que no ejerce algún cambio sobre voltaje de membrana, ya que como se observa las cargas siempre van compensadas. El transporte de estos iones responde principalmente a la fuerza motriz del ión Na^+ derivada de su alta concentración extracelular ($140 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$). El voltaje de membrana en el epitelio tubular es en promedio de -70 mV y ligeramente negativo hacia el lumen (-3 mV) [20], aunque esto disminuye la fuerza electromotriz alejándose del potencial de equilibrio del sodio, el gradiente de concentración de este ión es el factor que determina su permeabilidad a través de los cotransportadores así como el estado de activación del cotransportador.

CSB1 constituye el blanco específico de los inhibidores llamados Diuréticos de Asa (nombre que deriva de su sitio de acción en la nefrona, que el Asa de Henle en donde se expresa). Estos diuréticos son derivados del ácido sulfamoilbenzónico (e.g. furosemida y bumetanida) y afectan negativamente el transporte de iones. CSB1r-9F presenta un perfil de inhibición con el orden: bumetanida > furosemida. Se desconoce si estas drogas compiten por el sitio de unión de uno de los iones cloro, tal y como se ha propuesto que ocurre en el caso de CSB2/NKCC1 [39].

Estas drogas, junto con las tiazidas, son importantes por su utilidad clínica para controlar estados edematosos asociados con insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal crónica, hipertensión arterial, litiasis renal, cirrosis hepática, síndrome nefrótico, entre otros. Por su eficacia en el control de estados hipertensivos y edematosos se encuentran entre los fármacos más recetados en el mundo. Históricamente son los primeros fármacos sintetizados químicamente *ex profeso* para su uso como diuréticos [40], sin embargo sólo hasta comienzos de la década de los 90 se determinó cuáles son los blancos moleculares que inhiben [41].

Con base en la naturaleza hidropática de la secuencia de aminoácidos, determinada mediante el método de Kyte-Doolittle, Gamba y colaboradores describieron que la topología de esta proteína está compuesta de 12 segmentos transmembranales con un alto índice de hidrofobicidad tipo alfa-hélice (enumerados del TM 1-12). Estos dominios están flanqueados por un segmento N-terminal y C-terminal orientados intracelularmente (Fig. 2D y Apéndice XII). Poseen segmentos conectores entre los dominios TM y uno de ellos constituye un asa extracelular de 47 a.a que conecta a los dominios TM 7 y 8, que incluye sitios de N-glicosilación (N-AcGluc, involucrados en el tráfico vesicular hacia la membrana plasmática). Como parte de los segmentos N- y C- terminales se incluyen motivos de unión de diferentes cinasas como PKC, PKA y CK2, útiles para la regulación funcional de esta proteína [4]. Mediante este y otros métodos computacionales (MEMSAT, PHDhtm, TMHMM, HMMTOP, SOSUI), se ha demostrado que la topología predicha es extensiva a todos los miembros de la familia CCC.

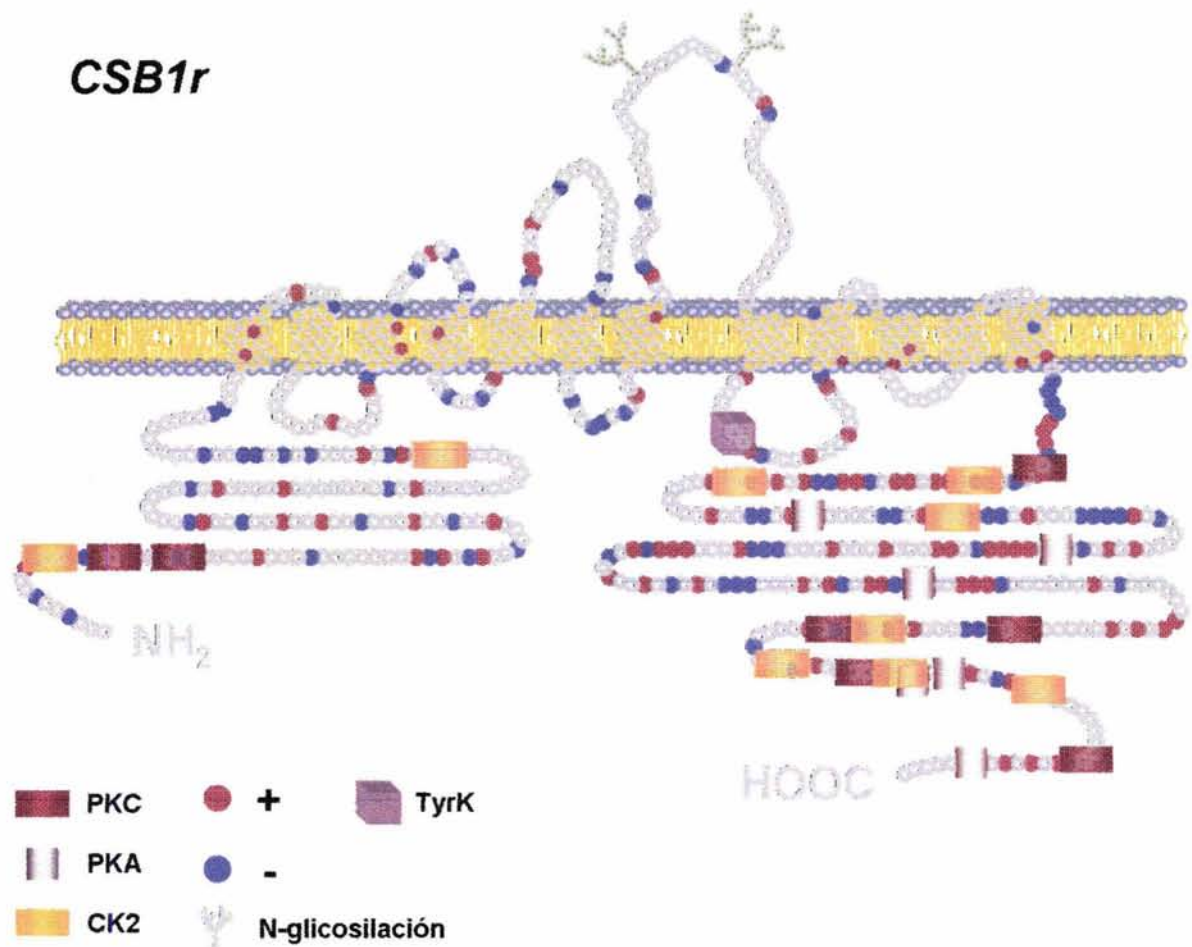


Fig. 2D. Esquema de la topología propuesta para CSB1-9F. Consta de 1095 a.a en la rata, los dominios intracelulares corresponden a los extremos N- (izq) y C- terminal (der). La proteína cruza 12 veces la membrana plasmática. El segmento conector de los dominios TM7 y TM8 tiene dos sitios consenso para la adición de N-AcGluc. Se destacan las posiciones relativas de los sitios consenso de unión de diferentes cinasas así como algunos aminoácidos cargados.

Para demostrar experimentalmente que la topología antes referida corresponde con la predicha mediante diferentes algoritmos, T. Gerelsaikhan y J. Turner realizaron un trabajo elegante en el cotransportador CSB2 [42], homólogo a CSB1. Por medio de un sistema de traducción *in vitro* y mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra un *tag* clonado en las diferentes regiones que flanquean a los segmentos TM, y mediante ensayos de inmunoblot sobre membranas de células HEK transfectadas con el cDNA de este cotransportador, encontraron que tanto los segmentos N- y C- terminales así como los dominios TM están orientados tal como lo muestra el modelo de la figura 2D [42]. Sin embargo es el único estudio de este tipo realizado con uno de los miembros de los CCC.

El gen que codifica a CSB1 (SLC12A1) se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 en humano (15q21.1) [43]. Se expresa únicamente y de forma abundante en la porción gruesa del asa de Henle. En el ratón y la rata este gen sufre un proceso de corte y empalme alternativo que da origen a seis isoformas (CSB1-4A, -4B, -4F y CSB1-9A, -9B, -9F), mediante la escisión de 2 cassettes de exones mutuamente excluyentes. Las isoformas C4 carecen de un segmento de 325 a.a en el extremo C-terminal, el cual es sustituido por una

secuencia de 55 a.a diferente de la isoformas C9, mediante el uso alternativo de un sitio de poliadenilación interno (Fig 2E). De forma genérica, C4 y C9 se denominan como las isoformas corta y larga, respectivamente. La diferencia del tamaño del dominio C-terminal es entre C4 y C9 es esencial para la regulación del transporte iónico por acción por PKA y PKC). Por otro lado, las isoformas A, B y F se distinguen por las diferencias que presentan en el segmento que corresponde a una porción del dominio TM2 y parte del segmento conector entre TM2 y TM3. En este estudio se utilizó la isoforma larga o CSB19-F para la construcción de las quimeras.

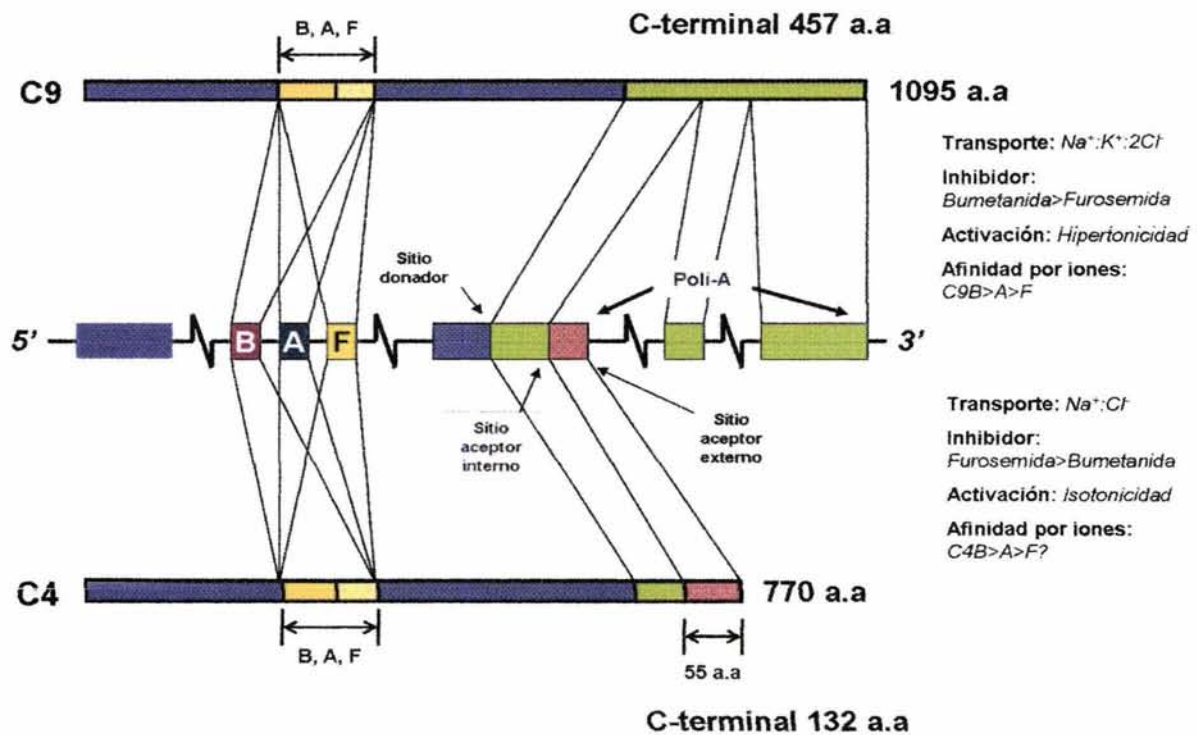


Fig. 2E. Splicing alternativo de CSB1 en el riñón que da origen a seis isoformas que se expresan en el riñón mediante el uso alternativo de dos cassettes de exones. Uno de ellos, selecciona el exón 4 que da codifica para una región del segmento TM2 y parte del asa conectora con TM3. Las tres isoformas que se generan se denominan A, B y F. El segundo cassette selecciona el exón 16 que contiene un sitio de poliadenilación temprano y da origen a una isoforma corta (C4) de 770 a.a, cuyo extremo C-terminal de 132 a.a tiene una secuencia de 55 a.a que no está presente en C9. Esta última, de 1095 a.a, muestra un tipo de transporte $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, mientras que C4 es de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$. Se muestran los perfiles de inhibición y de afinidad por los iones conocidos, así como la condición de tonicidad en la que se activan dichas isoformas.

Se ha observado que la reabsorción activa de Na-Cl en la porción medular del TALH se modifica en presencia de ADH mediante el cambio en el tipo de transporte que realiza CSB1. El transporte cambia de tipo $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, en condiciones de diuresis, a uno de tipo $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, en condiciones de antidiuresis [44]. Se ha propuesto un modelo que plantea que el cambio en la localización de la membrana de isoformas funcionalmente distintas origina el cambio observado en el tipo de transporte [45]. Se ha demostrado que cuando se activa la vía de PKA, las isoformas largas de CSB1 (C9), con un extremo C-terminal de 286 a.a, que translocan $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, éstas migran desde la región subapical de la célula hacia la membrana plasmática. Por el contrario las isoformas cortas (C4) con un extremo C-terminal de 132 a.a, que translocan $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, disminuye su concentración en la membrana plasmática. Mediante este mecanismo CSB1 actúa como un elemento clave para controlar la cantidad de Na^+ y Cl^- que son reabsorbidos en el TALH,

favoreciendo la concentración de la orina en condiciones de antidiuresis y diluyéndola en condiciones de diuresis.

Se ha demostrado que la activación de este cotransportador es dependiente de la acción de la cinasa dependiente de cAMP (PKA) [7] y su inactivación es mediada vía PKC en ovocitos de *X. laevis* [46], además dicha activación varía dependiendo de las condiciones de osmolaridad. Funcionalmente, las isoformas cortas C4 son activas en condiciones de hipotonicidad ($\sim 100 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) y las isoformas C9 son activas en condiciones de hipertonicidad ($\sim 300 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) [47].

G. Gamba y colaboradores se interesaron en determinar las características funcionales de dichas isoformas. Se encontró que la función de las isoformas de C4 y C9, expresadas en ovocitos de *X. laevis* se diferencian funcionalmente en la selectividad y sensibilidad a los derivados de la bumetanida, según la longitud del segmento C-terminal. Cuando se coexpresan ambas isoformas se observó un efecto dominante negativo sobre el transporte de iones. La activación o inhibición de PKA no afecta la función de C9, pero cuando se coexpresan C4 y C9 se observa un decremento importante en el transporte [7]. Dicho efecto se debe a que la isoforma larga no llega a la membrana plasmática cuando se coexpresa con la isoforma corta. Este efecto se abate en presencia de IBMX y/o cAMP [45].

Por otra parte, al analizar las diferencias funcionales de las isoformas A, B y F se encontró que éstas presentan diferencias en la afinidad por los iones en este orden: B>A>F [48, 49]. Cuando se analizó la expresión de estas isoformas *in vivo*, se encontró que éstas se distribuyen axialmente a lo largo del asa ascendente gruesa de Henle, en el riñón de ratón [47]. Por ejemplo, la isoforma A sólo se expresa en la porción más medular del TALH seguida de B en una región más cortical y finalmente F que se expresa sólo en la porción de la corteza interna [47]. Las diferencias en la afinidad por los iones es congruente con el microambiente iónico que "ven" estas proteínas en la luz tubular *in vivo* [7].

Actualmente no existe algún estudio estructural que revele cuáles son los sitios que determinan la selectividad y afinidad, transporte e inhibición, tanto de los iones como de los diuréticos en el cotransportador CSB1. Como se mencionó arriba, existe gran cantidad de información con respecto de la función, pero para correlacionar esta función con la estructura se requieren hacer estudios a nivel de biología molecular.

B. Forbush, y colaboradores han realizado un extenso y exitoso estudio estructuro-funcional en CSB2/NKCC1 mediante el uso de quimeras. CSB2 es un homólogo de CSB1 y se expresa de forma ubicua en el organismo (una excelente revisión de su trabajo se puede encontrar en [12]). Este cotransportador, a diferencia de CSB1, se localiza basolateralmente en una gran variedad de células epiteliales y juega un papel importante en la secreción de Cl^- al espacio extracelular. La expresión de este cotransportador en las células endoteliales de los capilares sanguíneos que corren a lo largo de la nefrona es importante porque

permite reintegrar el Na-K-Cl filtrado por el epitelio de la nefrona hacia el intersticio y, posteriormente, llevarlo hacia el torrente sanguíneo [50], completando el circuito de reabsorción.

La estequiometría de transporte es la misma que la de CSB1. Su función primordial es controlar el volumen celular [51]. Participa activamente abatiendo el incremento de volumen durante insultos como edema o isquemia celular [52, 53] y contribuye enormemente a la repolarización de neuronas GABAérgicas en el cerebro de rata [54].

Buscando definir cuáles son los segmentos de la proteína responsables de cada uno de los parámetros funcionales de este cotransportadores, el grupo de B. Forbush ha utilizado la estrategia de la construcción de proteínas quiméricas. Su estrategia se basó primero en el análisis funcional de clonas de CSB2 a las que se les retiraban distintos segmentos y, posteriormente, en la construcción de quimeras de los dominios N-, C-terminales así como de los diferentes segmentos TM y segmentos conectores. Utilizaron como modelo los genes ortólogos de tiburón, humano y conejo [12, 55-59].

El análisis funcional de las clonas que carecían ya sea del dominio N- o C-terminal o los dos, no mostraban transporte de iones cuando se las expresaba en células HEK-293 en cultivo. Esto es importante ya que sugiere que los segmentos intracelulares juegan un papel preponderante sobre la función del cotransportador.

Por su parte, el análisis de las cinéticas de transporte usando marcadores radioactivos por expresión funcional en células HEK-293 que expresaban dichas quimeras y mediante el análisis, mostró que la afinidad y la selectividad por los iones se definen en los segmentos TM [56]. Sin embargo, sólo los segmentos TM1-7, en particular los segmentos TM2, TM4 y TM7 [57] son requisito indispensable para definir estos aspectos, pero no así los segmentos TM8-12 (Fig. 2F). Además, al analizar la orientación de los residuos hidrofílicos de las hélices α que conforman a dichos dominios TM, se encontró que es muy probable que estén orientados hacia la misma dirección, formando una vía de paso para los iones [12]. Como resultado de estos hallazgos, proponen un modelo en el que se destaca la participación de distintos dominios TM en definir la afinidad y selectividad por los iones, como se muestra en la figura 2F. Entre otras cosas este modelo propone la existencia de un estado dinámico de unión a los iones que depende de interacciones alostéricas necesarias entre los segmentos TM2, 4 y 7 así como de algunos aminoácidos localizados en asas adyacentes que forman lo que llaman *translocation pocket* o cavidad de translocación.

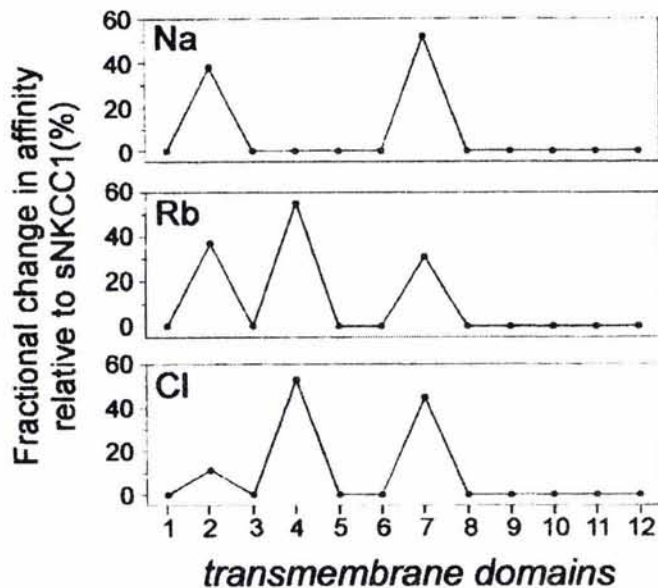


Fig. 2F. Efecto de los diferentes segmentos transmembrana encargados de definir la afinidad por los iones. Esta gráfica muestra el efecto del cambio de diferentes dominios TM entre los ortólogos de tiburón y humano de CSB2. Nótese que los segmentos TM8-12 al parecer no determinan este parámetro. Mientras que el sodio parece interactuar con los segmentos TM2 y 7, el potasio con los segmentos TM2, 4 y 7, el cloro lo hace con los dominios TM4 y 7 principalmente. Tomado de Isenring, P. and B. Forbush, *Ion transport and ligand binding by the Na-K-Cl cotransporter, structure-function studies*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2001. 130(3): p. 487-97

Adicionalmente describieron que algunos aminoácidos en pares como S-V y M-M que localizados en el segmento TM2 determinan la afinidad por los cationes. Aparentemente el segmento TM2 también juega el mismo rol en el caso de CSB1, al menos en la isoforma de tiburón [60]. Por otro lado este grupo ha propuesto un modelo de interacción iones-cotransportador; éste predice que el orden de unión de los iones concuerda con el modelo de McManus [39] que es $1\text{Na}^+ : 1\text{Cl}^- : 1\text{K}^+ : 1\text{Cl}^-$, sin embargo a diferencia del primer modelo propuesto, predicen que el sitio de unión a la bumetanida es distinto del sitio de unión al segundo cloro, como anteriormente se había propuesto [39]. Sin embargo esto sigue en discusión, sobre todo porque ambos estudios fueron realizados en diferentes modelos celulares.

Aunque los alcances de estos estudios son muy grandes para CSB2, en realidad es poco lo que podemos extrapolar para el caso de CSB1 en la rata sobre todo porque que ninguno de dichos estudios se ha realizado hasta la fecha en CSB1. Funcionalmente no son iguales, ya que presentan algunas diferencias cinéticas marcadas, por ejemplo, la afinidad por sodio es mucho mayor en CSB1sh (tiburón) que en CSB2r (rata), la sensibilidad a los cambio de osmolaridad extracelular (mientras que CSB2 se activa por el aumento de Cl^- intracelular, CSB1 lo hace cuando aumenta la tonicidad extracelular).

Hasta el momento no se ha reportado algún trabajo concluyente que correlacione los determinantes estructurales con la función en el caso del cotransportador renal CSB1. Para determinar cuáles estructuras de la proteína son definen diferentes parámetros se pueden utilizar dos estrategias complementarias. Una es mediante la construcción de quimeras entre cotransportadores relacionados y la otra es mediante el análisis de mutantes con importancia clínica, en particular las relacionadas con el Síndrome de Bartter Tipo I (cuyas manifestaciones son alcalosis metabólica hipocalémica, natriuresis, hipocalciuria e hipomagnesemia) [8]. Diversos trabajos han mostrado que ciertas mutaciones tienen un efecto deletéreo sobre la función de CSB1

[61-64], pero aún es necesario determinar qué efecto causan dichas mutaciones sobre la estructural del cotransportador.

2.3 El Cotransportador Sensible a Tiazida $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ CST ó NCC.

El *Cotransportador Sensible a Tiazida $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$* , *CSTr*, es una proteína integral de membrana de 1002 a.a, con una masa de de 115 kDa que en presencia de Glucosidasa H es de 110 kDa. El marco de lectura abierto es de 3018 pb [4, 6]. Las secuencias UTR 5' y 3' miden 9 y 1343 pb respectivamente. El gen que codifica a esta proteína se denomina SLC12A3, que en humanos se localiza en la posición cromosomal 16q13 [65]. Se sabe que la forma activa de CST es un homodímero [66].

CST/NCC se expresa en la porción distal de la nefrona. Se sabe que la expresión se afecta por la acción de ADH [22], por la hormona estradiol en ratas [67] y por la hormona aldosterona [68-71] y en presencia del inhibidor de la acción de esta hormona, espironolactona [72] que se sabe que abate la nefrotoxicidad inducida por Ciclosporina A [73].

La topología en la membrana corresponde a la que comparten los miembros de la familia CCC, con 12 segmentos transmembranales flanqueados por dos dominios intracelulares N- y C-terminales (Apéndice XI y Fig. 2G). Al igual que CSB1 también tiene sitios potenciales regulatorios en los dominios intracelulares, que son secuencias consenso blanco de PKA, PKC y CK2, aunque no se ha determinado el efecto funcional de ésta última cinasa.

Los estudios cinéticos y farmacológicos realizados por A. Monroy y colaboradores muestran que la estequiometría de transporte de sodio y cloro es 1:1 y la unión de estos iones a la proteína es aleatoria, pero que se requiere de la unión de uno para facilitar la unión del contraión [74], y en ambos casos la afinidad por los iones es muy alta. Además, se sabe que el transporte siempre es activo en condiciones de isotonicidad ($\sim 210 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), éste decremента en condiciones de hipotonicidad ($\sim 110 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) y en hipertonicidad ($\sim 310 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) no muestra cambio alguno, al menos cuando se le expresa en ovocitos de *X. laevis* [6]. Recordemos que la osmolaridad real que ve CST en el riñón es de $\sim 100\text{-}150 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$.

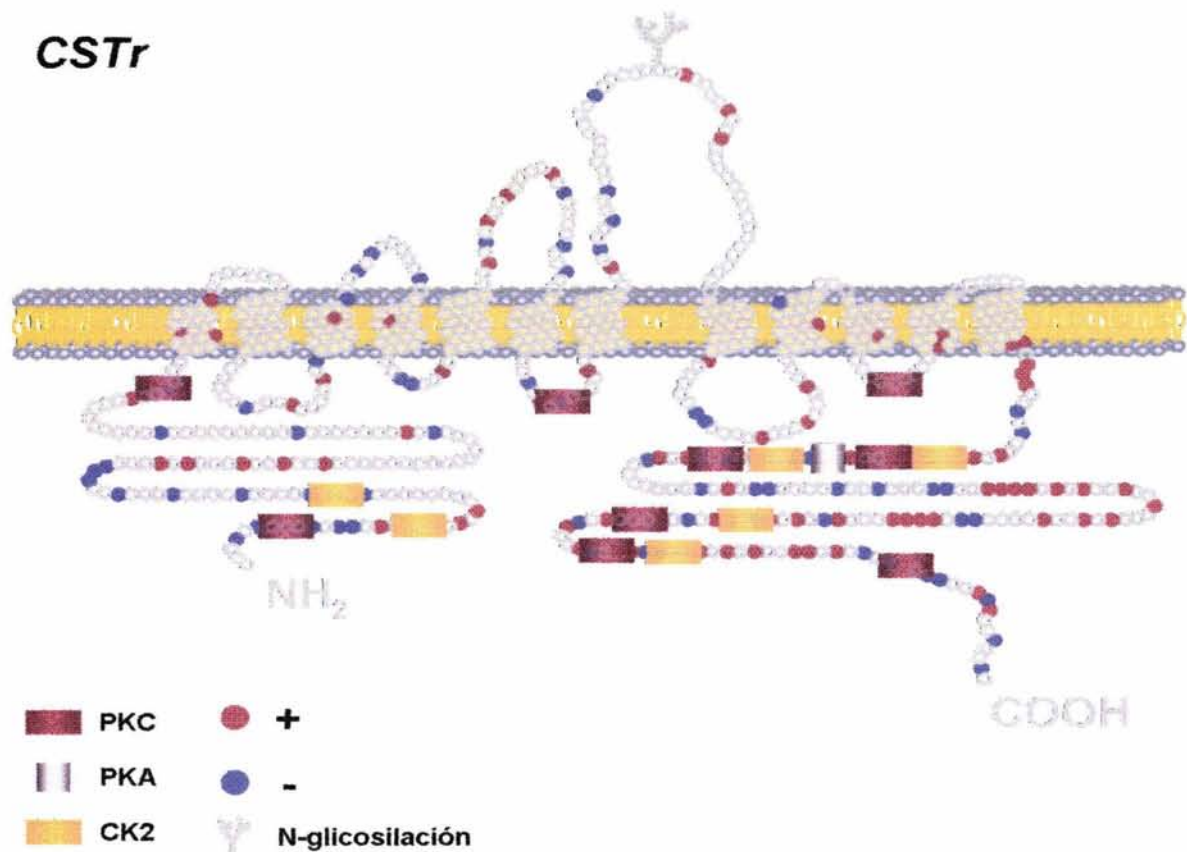


Fig. 2G. Esquema de la topología propuesta para CST. CSTr consta de 1002 a.a, los dominios intracelulares corresponden a los extremos N- (izq) y C- terminal (der). La proteína cruza 12 veces la membrana plasmática. El segmento conector de los dominios TM7 y TM8 tiene sólo un sitio consenso para la adición de residuos de cadenas de alta manosa. Se destacan las posiciones relativas de los sitios consenso de unión de diferentes cinasas así como algunos aminoácidos cargados. El efecto de la cinasa CK2 no ha sido determinado.

Por otro lado, se ha demostrado que el segmento extracelular de 54 a.a, que conecta los dominios TM 7 y 8, contiene sitios consenso de N-glicosilación, que funcionalmente afectan la unión del diurético tiazida [75]. Adicionalmente se ha sugerido que la acción inhibitoria de esta droga se lleva a cabo sin competir por los sitios de unión a cloro o sodio [74]. El perfil inhibitorio por derivados de las benzotiadiazinas es politiazida > metolazona = bendroflumetiazida > tricloretiazida > hidroclorotiazida > clortalidona, con una sensibilidad muy alta, pues a dosis de 10^{-4} M se alcanza un valor >95% de inhibición [75, 76]. Este cotransportador no muestra ninguna sensibilidad al diurético bumetanida ni mucho menos ésta afecta la unión de cloro al cotransportador, por lo que se sugiere que los sitios de unión a los diuréticos es diferente en CST como en CSB1.

Por otra parte se ha descrito que los sitios de glicosilación presentes en el asa extracelular, que une a los segmentos TM7 y TM8, desempeñan una papel importante en la función y en la interacción con las tiazidas, tal y como lo muestra el trabajo realizado por A. Monroy y colaboradores en el laboratorio. Mediante el análisis funcional de mutantes de los residuos de Asn (N404Q y N424Q) se encontró una disminución drástica de la captura de sodio en ambas mutantes, que en combinación la disminución es cercana al 100%.

En cada una de las mutantes se observó un aumento de la afinidad por cloro y un incremento de dos órdenes de magnitud en la afinidad por metolazona, lo que sugiere que en presencia de las cadenas de alta manosa asociadas con residuos de Asn se presenta un determinado nivel de impedimento estérico que afecta el acceso del diurético a su sitio de unión. Es importante mencionar que la disminución de la función correlaciona muy bien con la observación que este cotransportador está imposibilitado para llegar a la membrana plasmática (*docking*). Estudiando ovocitos que expresan GFP fusionada al extremo C-terminal de CST silvestre y CST de las mutantes, se observó mediante microscopía confocal que la fluorescencia localizada en la membrana plasmática disminuye en la medida en la que están mutados uno o los dos sitios de glicosilación [75].

Aunque no se conoce con precisión acerca de la regulación funcional de este cotransportador, se sabe que tanto el óxido nítrico [68] y PKC afectan negativamente el transporte de iones, aunque no ocurre así vía PKA. En ovocitos inyectados con el cRNA de CST_r incubados en presencia de TPA (activador de la vía de PKC) se observa un decremento en la captación de ²²Na⁺ equiparable con el efecto inhibitorio de las tiazidas. En presencia de cAMP, cGMP e IBMX el transporte no se afecta significativamente.[76]. Como dato adicional se ha reportado que la unión de CST con la proteína gp58 (que tiene actividad de chaperona) incrementa el transporte, lo que sugiere que una forma de regulación sobre la reabsorción de sodio en el DCT puede consistir en la regulación de la estabilidad del cotransportador [77].

El gen que codifica a CST_h ha sido ligado con una enfermedad semejante al síndrome de Bartter, denominada Síndrome de Gitelman, que además de presentar las manifestaciones clínicas como son alcalosis metabólica hipocalémica, natriuresis e hipomagnesemia, se diferencia del primero porque la excreción de calcio es baja, produciendo hipocalciuria [11]. Este síndrome se ha rastreado en diversas poblaciones, y las mutaciones detectadas han sido estudiadas para determinar su efecto a nivel funcional. [65, 78-80].

Una enfermedad adicional asociada con CST es el Pseudohipoaldosteronismo tipo II (que presenta hipertensión arterial característica y pérdida de sal), que recientemente se ha descrito a partir de mutantes de las cinasas WNK1 y WNK4 de humano. Mutaciones en esta cinasa provocan una disminución de la actividad de CST en la membrana plasmática, lo que a su vez afecta la sobrevivencia de las células del TCD y por consecuencia afecta los niveles de sodio y cloro en el organismo. Por tanto este cotransportador también ha sido asociado con diversas formas de hipertensión.

Sólo en fechas más recientes con el advenimiento de la actualización de la secuencia del Genoma Humano, el estudio de polimorfismos ha resultado una herramienta que facilita la comprensión de variantes alélicas en diversas poblaciones. A partir del análisis de SNPs (Polimorfismos de Nucleótido Único) en el gen que codifica para CST en humano, E. Moreno, y colaboradores caracterizaron el efecto de un polimorfismo localizado en el segmento TM4 (G264A), que por sí solo es capaz de modificar la afinidad por cloro y por

tiazida en CST [81]. En este sentido el estudio de las variantes alélicas que ocurren normalmente en las poblaciones también ayudan a definir el papel de distintas regiones de la proteína sobre la función.

2.4 Diferencias estructurales entre CST y CSB1.

A pesar de que se conoce la estructura primaria, el mapa genético, diversas características cinéticas, la expresión localizada, algunos aspectos metabólicos derivados de su función, la interacción con algunas proteínas de señalización, algunos inhibidores específicos, diversos mecanismos de regulación y de transcripción, así como de la diversidad de isoformas distribuidas en diversas especies, etc., poco sabemos acerca de la relación estructura-función que presentan estas proteínas. En otras palabras, carecemos de modelos computacionales que nos ayuden a predecir cambios conformacionales que a su vez pueden verse reflejados en la manera en la que se comportan dichos transportadores en interacción con otras moléculas.

Una forma inicial de abordar este problema es analizar las diferencias y similitudes en la secuencia primaria de aminoácidos. La tabla 2A resume las diferencias en cuanto al grado de identidad entre los diferentes segmentos que constituyen a los cotransportadores renales CST y CSB1.

Tabla 2A. Porcentaje de Identidad entre NCC y KCC2 en Distintos Segmentos

	N	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7	TM8	TM9	TM10	TM11	TM12	C
Identidad	22.6	76.2	61.1	80.1	66.6	33.3	76.2	34.8	90.4	65.0	95.2	19.0	52.4	51.8
Longitud (a.a)	133 ^a / 173 ^b	21	18	21	21	21	21	23	21	20	21	21	21	323 ^a / 286 ^b

^a CST, ^bCSB1. Los valores de Grado de Identidad fueron obtenidos por el método de ClustalW en el programa DNASTAR[®] MegAlign[®]. En rojo se presenta el segmento de N-terminal que intercambiamos en las quimeras.

Como es posible observar a partir de la Tabla 2, el segmento correspondiente al dominio N-terminal comparte un grado de identidad cercano al 23%. Por ser uno de los dominios con el mayor número de diferencias, esta fue la primera región que decidimos analizar mediante la construcción de las quimeras para tratar de determinar su rol funcional. Ver figura 2H.

De esta observación, aún no es posible identificar si se produce algún cambio estructural en las regiones de α -hélice o β -plegadas cuando los sitios blanco de las cinasas referidas son fosforilados, que afecten a su vez la función de los cotransportadores.

De cualquier forma, saber si este tipo de arreglo de la estructura secundaria presenta una implicación funcional, por ejemplo cuando los residuos de Serina son fosforilados, está por determinarse.

Para estudiar el arreglo tridimensional de una proteína con datos experimentales, la aproximación ideal sería la cristalización. Esto permite someterlas a estudios de resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X; condiciones que no existen hasta la fecha para estudiar proteínas integrales de mamífero. Recordemos que las únicas proteínas de membrana que han sido cristalizadas, como ocurre con algunos canales iónicos, provienen de bacterias como *E. coli* y otras que son extremófilas o bien del análisis de fragmentos aislados embebidos en una monocapa lipídica, cuya gran estabilidad facilita su cristalización.

Sin embargo, como una alternativa para el análisis estructuro-funcional, la construcción de quimeras entre proteínas estructural y funcionalmente semejantes es muy útil y atractiva (resulta más barata y puede dar información valiosa en corto tiempo), como lo es también el uso de mutantes identificadas mediante tamizaje genético en la práctica clínica. En este estudio, nos inclinamos por enfoque de las quimeras.

A pesar de que ambos cotransportadores son funcionalmente diferentes y que se regulan por medio de mecanismos distintos, tales diferencias pueden ser aprovechadas para estudiar su papel en la función, asumiendo que éstas se atribuyen a las diferencias en la secuencia de aminoácidos.

CST y CSB1 tienen una selectividad, estequiometría y afinidad diferentes, sin embargo comparten parcialmente las características de transporte dependiente de cloro. Son 48% idénticos a nivel de secuencia de a.a; los a.a más conservados están localizados en posiciones idénticas en ambas proteínas; en las regiones donde hay grandes diferencias, como el dominio N-terminal, podrían explicar muy bien las diferencias funcionales, y, entre otras características compartidas, se encuentran la sensibilidad a los cambios en la presión osmótica y a la carga de iones en ambos lados de la membrana plasmática.

De esta forma, si se desea empezar el análisis estructural, el segmento N-terminal, que sólo comparte el 23% de grado de identidad entre los dos, constituye un blanco inicial para comenzar dicho análisis. Las posibilidades funcionales derivadas de la construcción de quimeras en el extremo N-terminal se discuten más adelante, en el siguiente apartado.

JUSTIFICACIÓN

Hay dos razones principales por la que creemos que algunos parámetros como la cinética de transporte de iones o la sensibilidad a los diuréticos podrían verse modificados como consecuencia del intercambio producido en el segmento N-terminal de los cotransportadores renales CST y CSB1.

La primera razón para esperar un cambio en los parámetros arriba mencionados, es que ya existía un antecedente inmediato acerca de la función de un segmento intracelular que define la selectividad así como la respuesta a la regulación del transporte de iones. Ese antecedente es la isoforma más corta del cotransportador renal CSB1 (ver capítulo 2). El splicing alternativo que genera las isoformas de C4 truncadas hacia el segmento C-terminal (~154 a.a más corta) provoca que cambie la selectividad de transporte tipo $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ a uno de tipo $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ independiente de K^+ , así como el perfil de inhibición por bumetanida. Este aspecto es importante ya se ha postulado que la selectividad por los iones y diuréticos se define solamente en la región central correspondiente a los segmentos TM en el caso de CSB2. El papel estructural que confiere el cambio funcional entre C9 y C4 dado por las diferencias en el tamaño del segmento C-terminal es incierto aún, puesto que se requieren más estudios para determinar dicho aspecto.

La segunda razón es que la región N-terminal entre CST y CSB1 es el dominio menos conservado entre ambos. Es razonable pensar que la diferencia en la secuencia de a.a de este dominio pueden ser las responsables de las diferencias funcionales observadas en los dos cotransportadores. La construcción de las quimeras que se describen en este trabajo permite explorar esta posibilidad como una primera aproximación. Con este método es posible revelar el efecto funcional de aquellos aminoácidos que no están conservados. Dado que el dominio N-terminal posee secuencias de regulación por PKC y CK2 que están posicionalmente conservadas, también es posible identificar si el intercambio puede conferir alguna diferencia regulatoria que se refleje en la función de las quimeras.

Para detectar el efecto funcional derivado del intercambio del dominio N-terminal entre CST y CSB1 es necesario determinar el efecto sobre variables como la selectividad o la afinidad por los iones y diuréticos, analizando las cinéticas de transporte y las curvas de inhibición.

La hipótesis, que se presenta en el apartado siguiente sólo puede enunciarse de forma binomial, esto es, sólo puede haber dos posibilidades. La primera es que el intercambio de este dominio no afecte la selectividad ni la afinidad por iones y diuréticos cuando se pruebe la función de las quimeras. La segunda, más interesante, es que sí modifique cualquiera de estos parámetros lo que nos sugiera que el dominio N-terminal juega un papel preponderante en el transporte, y que por ser la región más disímil entre CST y CSB1, sea la responsable de definir las diferencias funcionales entre los dos cotransportadores.

Con lo anterior en mente, existen dos posibles panoramas. Si el cambio no afecta la selectividad, al menos desde el punto de vista de la caracterización funcional, entonces podemos sugerir que tal parámetro no se define en el segmento NH₂ terminal.

Por otro lado, si se afecta la afinidad de uno o todos los iones así como de los diuréticos, entonces es posible sugerir que este segmento requiere un cambio conformacional de algún(os) sitio(s) de unión a iones o inhibidores en los segmentos TM que interactúan con los sustratos, debido a que se modifica la interacción con el segmento N-terminal. Más aún, el papel regulatorio por PKC y CK2 puede modificarse y esto a su vez cambia dicha interacción.

HIPÓTESIS

“El segmento aminoterminal de los cotransportadores renales de cationes acoplados a cloro, CSB1 y CST, puede afectar la afinidad y/o la selectividad de estos cotransportadores por los iones y diuréticos”.

OBJETIVOS

Para probar estas ideas, se proponen los siguientes:

- Construir quimeras entre los cotransportadores CSB1 y CST de rata que intercambien el segmento aminoterminal.***
- Caracterizar las propiedades funcionales de las quimeras resultantes.***

Capítulo III

3. Estrategia y Metodología

Para construir las quimeras del N-terminal entre CST y CSB1, la estrategia utilizada en esta tesis puede resumirse en la figura siguiente:

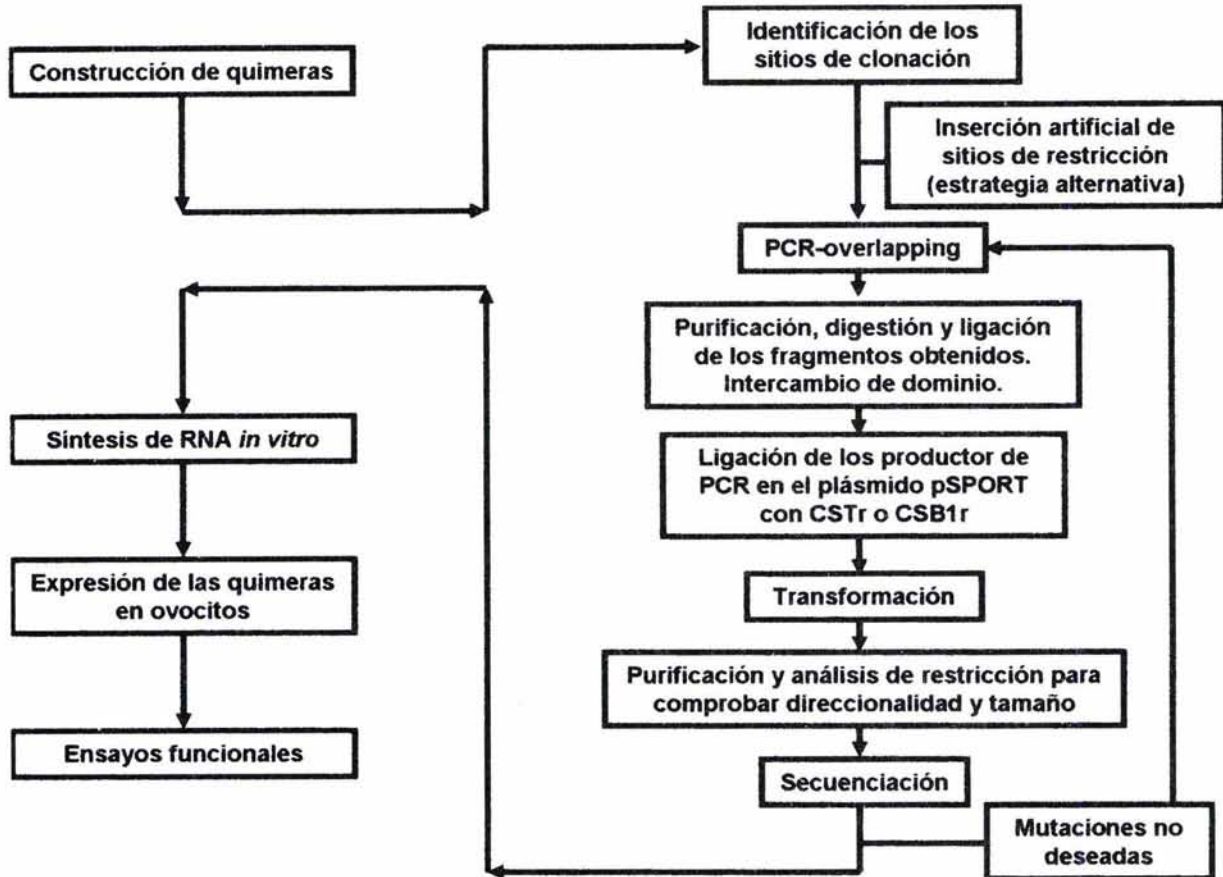


Fig. 3A. Esquema general de la estrategia usada para la construcción de quimeras entre CSTr y CSB1r. Consiste en identificar los sitios de restricción necesarios para separar la secuencia correspondiente al N-terminal de cada cotransportador por medio del uso de endonucleasas de sitio único. Si dichos sitios no existieran, se lleva a cabo mutagénesis dirigida para insertar uno en el sitio de interés. Una vez identificados, se diseñan oligonucleótidos específicos para amplificar los segmentos de interés. Algunos de estos oligos están diseñados con secuencias de ambos cotransportadores, para que en una tercera ronda de PCR sea posible hibridar una parte del cotransportador con la del otro (mediante el método de PCR-overlap extension). Los fragmentos purificados, son digeridos y ligados de tal forma que se lleve a cabo el intercambio de dominio de forma correcta. El producto de la ligación se usa para transformar bacterias competentes. Una vez crecidas, se analizan diversas colonias y se someten a un análisis de restricción para comprobar que las clonas estén correctas. Cuando se obtengan los fragmentos del tamaño esperado, las clonas son llevadas a un secuenciador automático para verificar que no haya mutaciones no deseadas. Si esto ocurre, es necesario repetir los PCRs. Si la secuencia es correcta, el vector es linearizado y se lleva a cabo la síntesis de RNA *in vitro*. Una vez purificado, éste se alícuota y diluye para posteriormente inyectarlo en ovocitos de *X. laevis*. Finalmente, los ovocitos son incubados en condiciones adecuadas hasta que la proteína esperada se exprese en la membrana (usualmente 96 h después de la inyección). Para detectar expresión (función) se realizan ensayos funcionales mediante captación de marcadores radioactivos y se lleva a cabo el análisis cuantitativo de las diferentes condiciones probadas en los experimentos.

A partir de esta estrategia se llevó a cabo la primera fase que consistió en la construcción de las quimeras.

3.1 Construcción y nomenclatura de las proteínas quiméricas.

Como ya se ha venido mencionando, el perfil de hidropatía de los cotransportadores CSTr y CSB1r es similar entre los dos. Se distinguen tres regiones principales: la región N-terminal, los segmentos transmembranales y un segmento C-terminal (ver Capítulo 2). En el presente trabajo intercambiamos el segmento N-terminal entre los dos cotransportadores.

Para identificar la serie de quimeras que se construirían se decidió utilizar un código de tres letras, cada letra corresponde a uno de los tres grandes dominios arriba mencionados; así, la primera letra representa el dominio N-terminal, la segunda representa a los segmentos TM, y la tercera corresponde al dominio C-terminal. Puesto que las siglas entre CST y CSB1 se distinguen por la tercera letra, se decidió aprovechar esta diferencia. Por ejemplo, si hablamos del cotransportador silvestre CSTr, que tiene todos los dominios de un mismo tipo, entonces podría ser representado como TTT. De la misma forma, el cotransportador silvestre CSB1r se puede representar como BBB. Por lo tanto, si intercambiamos el dominio N-terminal proveniente de CST con los segmentos TM y C-terminal provenientes de CSB, entonces la quimera resultante recibe el nombre de TBB. En el otro caso posible, la quimera resultante recibe el nombre de BTT. (ver figura 3B)

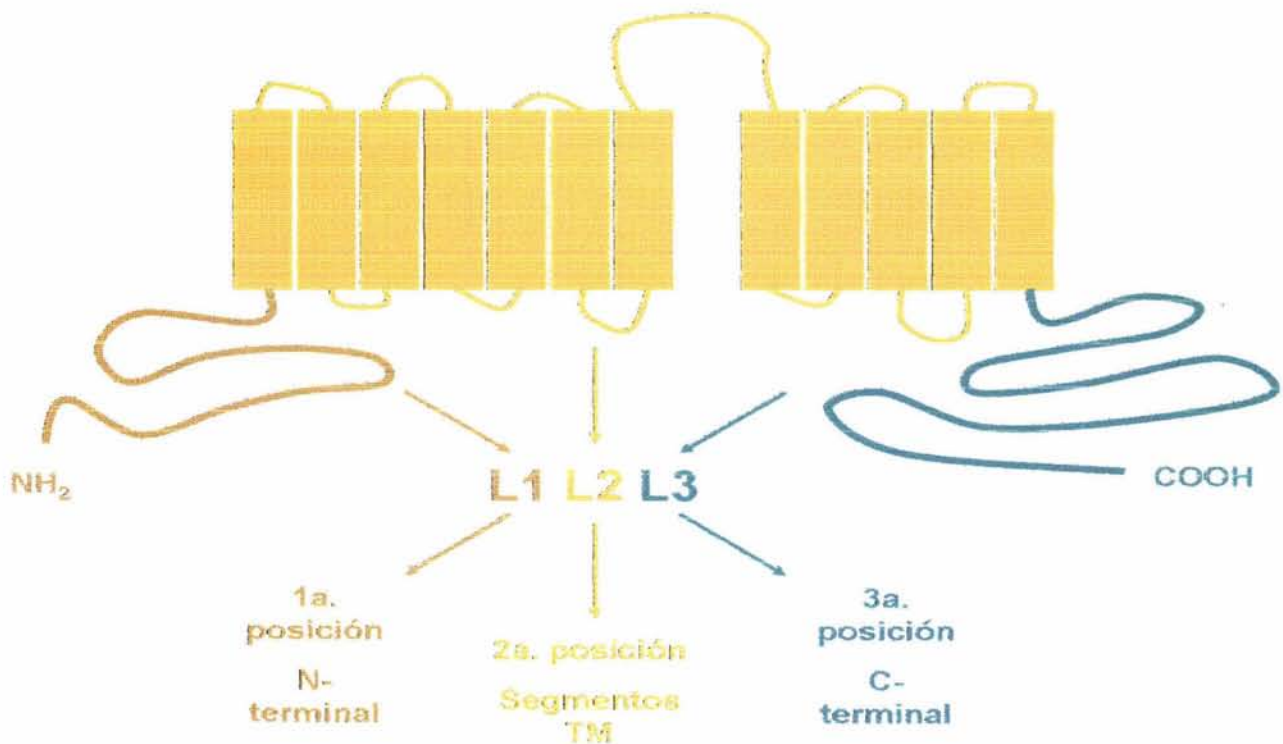


Fig. 3B. Nomenclatura general. La nomenclatura de las quimeras N-terminal entre CSTr y CSB1r se determinó tomando en cuenta los tres dominios estructurales principales. El dominio N-terminal (café) corresponde a la primera letra del nombre de las quimeras (L1, primera posición), los segmentos TM (amarillo), a la segunda letra (L2, segunda posición) y el dominio C-terminal (verde) corresponde a la tercera letra (L3, tercera posición).

El intercambio del dominio N-terminal se esquematiza en la figura 3C.

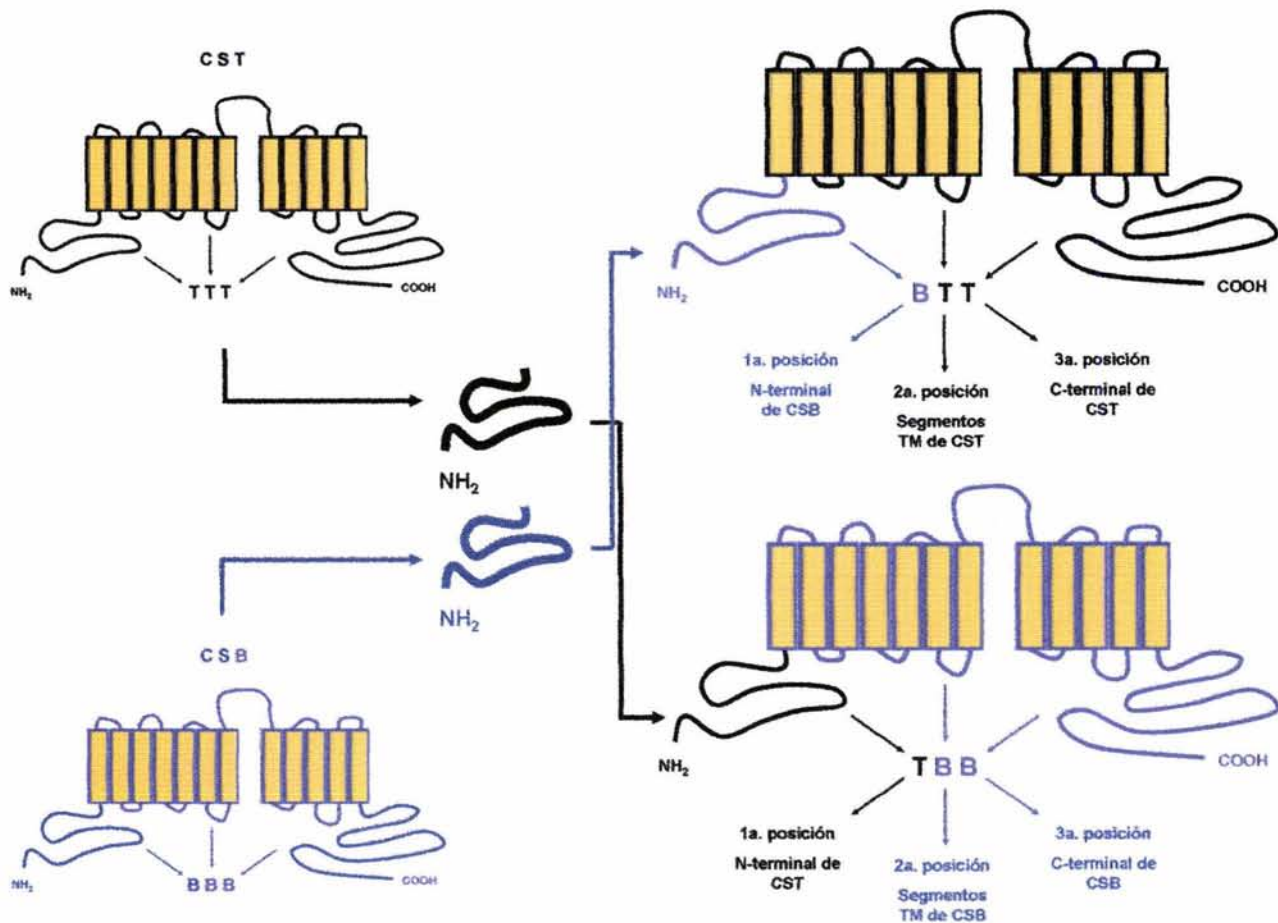


Fig. 3C. Esquema que identifica los nombres de las quimeras del N-terminal construidas. La primera letra corresponde al dominio N-terminal; la segunda, a los segmentos TM; y la tercera, al dominio C-terminal. En negro, los segmentos provenientes de CST; en azul los de CSB1r.

Para realizar dicho cambio nos valimos de un método denominado PCR-overlap extension [82] que consiste en la amplificación por PCR de alguna de las secuencias que se va a intercambiar a la cual se le agrega una extensión que no está presente en el templado, que es idéntica a la secuencia con la que se va a intercambiar el fragmento amplificado. La ventaja de usar este método es que permite llevar a cabo la fusión en sólo dos rondas de PCR, ya que la adición de la extensión en uno de los fragmentos que se va a fusionar permite que se hibride perfectamente con la secuencia a la que se va a fusionar en el segundo PCR. Este método evita la necesidad de insertar sitios de restricción y agiliza la construcción de quimeras.

Este método requiere usar cuatro oligonucleótidos nombrados A, B, C y D (ver Apéndice XIII). El oligonucleótido que contiene la extensión de solapamiento es el B que es capaz de hibridarse o solaparse con el extremo 5' del fragmento C-D. Una vez amplificados, los fragmentos se denominan A-B y C-D. El fragmento A-B corresponde a la parte de la secuencia que codifica para el dominio N-terminal y el fragmento C-D corresponde a los dominios TM. Tanto los fragmentos A-B como C-D tenían insertados un sitio único de restricción hacia el extremo 5' y 3', respectivamente (ver figuras 4A-4D). Estos sitios estaban presentes en el vector al cual se ligarían las secuencias amplificadas, lo que permitiría fusionarlas mediante

las técnicas convencionales. Una vez amplificados los segmentos A-B y C-D, se purifican y se someten a una segunda ronda de PCR, mezclándolos en el mismo tubo y usando los oligonucleótidos A y D. De esta forma se genera un tercer fragmento llamado A-D (Ver figuras 4A y 4C). Una vez purificado este fragmento, era digerido y ligado con el plásmido, también digerido, que contiene el cDNA de CStr o CSB1r, según sea el caso (ver figuras 4B y 4D), de esta forma se sustituye el segmento que se desea reemplazar. Habiendo comprobado que los insertos estuvieran en la orientación correcta en las clonas recombinantes, se procedió a secuenciar los insertos para comprobar que no hubieran mutaciones no deseadas. Si no era el caso, se hacía transcripción *in vitro* para obtener el cRNA que se inyectará a los ovocitos de rana. Los resultados funcionales obtenidos con las quimeras TBB y BTT se presentan en el capítulo IV.

3.2 Síntesis de RNA *in vitro*.

Con el vector de cada quimera ya completo, se llevó a cabo la síntesis de cRNA *in vitro* (ver Apéndice II) y, posteriormente, se inyectó en ovocitos (0.5 µg/µL) para probar si las proteínas resultantes eran funcionales.

El vector pSPORT1 (SuperScript, Life Technologies, Inc., US) en donde estaban previamente clonados todos los cotransportadores y quimeras que probamos, fue linearizado con la nucleasa *Not I* localizada hacia el extremo 3' de cada clona (Boehringer-Mannheim, Germany).

La digestión se purificó mediante el método de fenol-cloroformo. El producto se incubó con Polimerasa de RNA de T7 utilizando el kit mMessage Machine (Ambion, TX, US) siguiendo las instrucciones tal y como recomienda el fabricante (Apéndice II).

Una vez concluida la reacción, el RNA es lavado mediante fenol-cloroformo y se precipita con acetato de amonio (3M). El producto es resuspendido en un volumen adecuado con H₂O hasta alcanzar una concentración de 0.5 µg/µL.

3.3 Preparación de ovocitos de *X. laevis*.

Se extrajeron, defolicularon e inyectaron ovocitos (etapas V-VI) de ranas hembras adultas (adquiridas de Carolina Biological Supply, NC, US), anestesiadas por inmersión en tricaina (0.17%) y mantenidas en hielo durante la cirugía.

Los ovocitos fueron lavados e incubados en medio ND96 s/Ca²⁺ con colagenasa B dos veces por 30 min en frío, para degradar la matriz que mantiene unido el folículo con el ovocito. Una vez concluido el tratamiento, los ovocitos son seleccionados y defoliculados manualmente bajo estereoscopio. Se mantienen en medio Ringer ND96 completo complementado con gentamicina (0.5%) y piruvato de sodio (2.5M). Se incuban una noche a 18 °C.

Una vez defoliculados y lavados, los ovocitos son fijados sobre una malla e inyectados con un microinyector (50 nL de RNA @ 25 ng) por ovocito en la región del polo animal o en el cinturón ecuatorial.

Se incuban de 72-96h a 18 °C en medio ND96 complementado. Una noche antes del experimento se incuban en medio de isetionato de sodio sin cloro (Apéndice V). El medio es cambiado por medio fresco cada 24 h. El protocolo de preparación de ovocitos se resume en la figura 3D.

Preparación de ovocitos para expresión funcional heteróloga

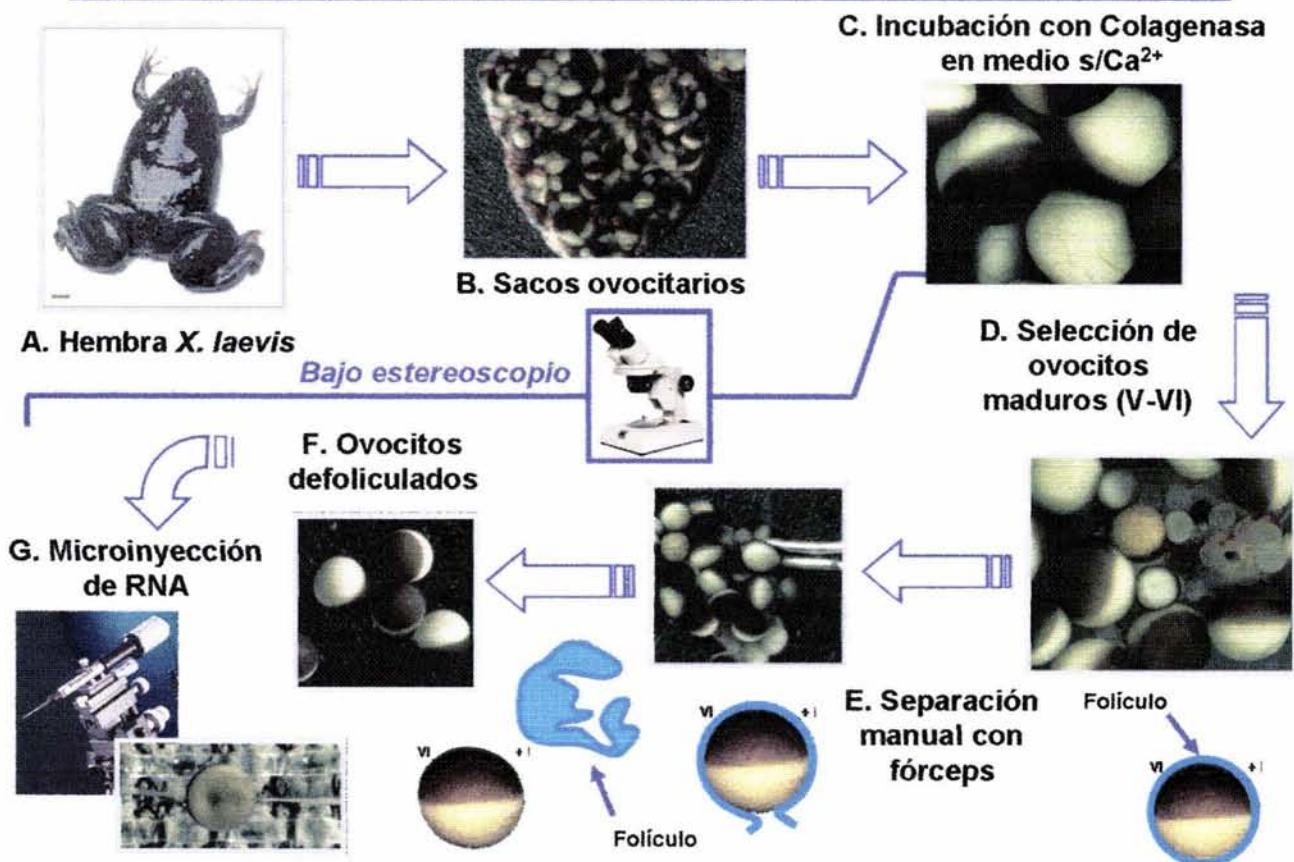


Fig. 3D. El protocolo para la extracción, selección, defoliculación e inyección de ovocitos se detalla en el texto y en el Apéndice V. La inyección de mRNA se hace en el polo animal (en blanco) para evitar perforar el núcleo y favorecer la traducción inmediata en el retículo endoplásmico.

3.4 Experimentos de pre-captación y captación.

La función del cotransportador de Na-K-Cl se llevó a cabo mediante la captura del trazador radioactivo $^{86}\text{Rb}^+$ (NEN Laboratories, US) (Apéndice VI). Para medir el transporte de Na-Cl, se utilizó $^{22}\text{Na}^+$ (NEN Laboratories, US) (Apéndice VII). Dado que los ovocitos presentan transporte endógeno de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ [83-85], todos los controles fueron inyectados con H_2O . La composición de las soluciones usadas previo al experimento son como se indica en el Apéndice VIII. Para los experimentos de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ se siguió el protocolo del Apéndice VI. Las soluciones de precaptación sin cloro, necesarias para inhibir el transporte, bañaron a los ovocitos por 30 min/30 °C en agitación (3000 rpm).

Para la captación, los ovocitos son lavados en Ringer frío e inmediatamente bañados en medio con el marcador. Fueron incubados 30-60 min/30 °C con la misma agitación. Se utilizaron inhibidores de la ATPasa de Na-K (Ouabaína), de canales de Na^+ (Amilorida) en todo momento; además se utilizaron Tiazidas o Bumetanida, dependiendo del ensayo. Las concentraciones usadas se muestran en el Apéndice X. Al terminar la captación, los ovocitos son lavados 5 veces en medio de captación frío @ 4 °C. Ver figura 3E.

Ensayo de captación de $^{22}\text{Na}^+$ o $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos de *X. laevis*

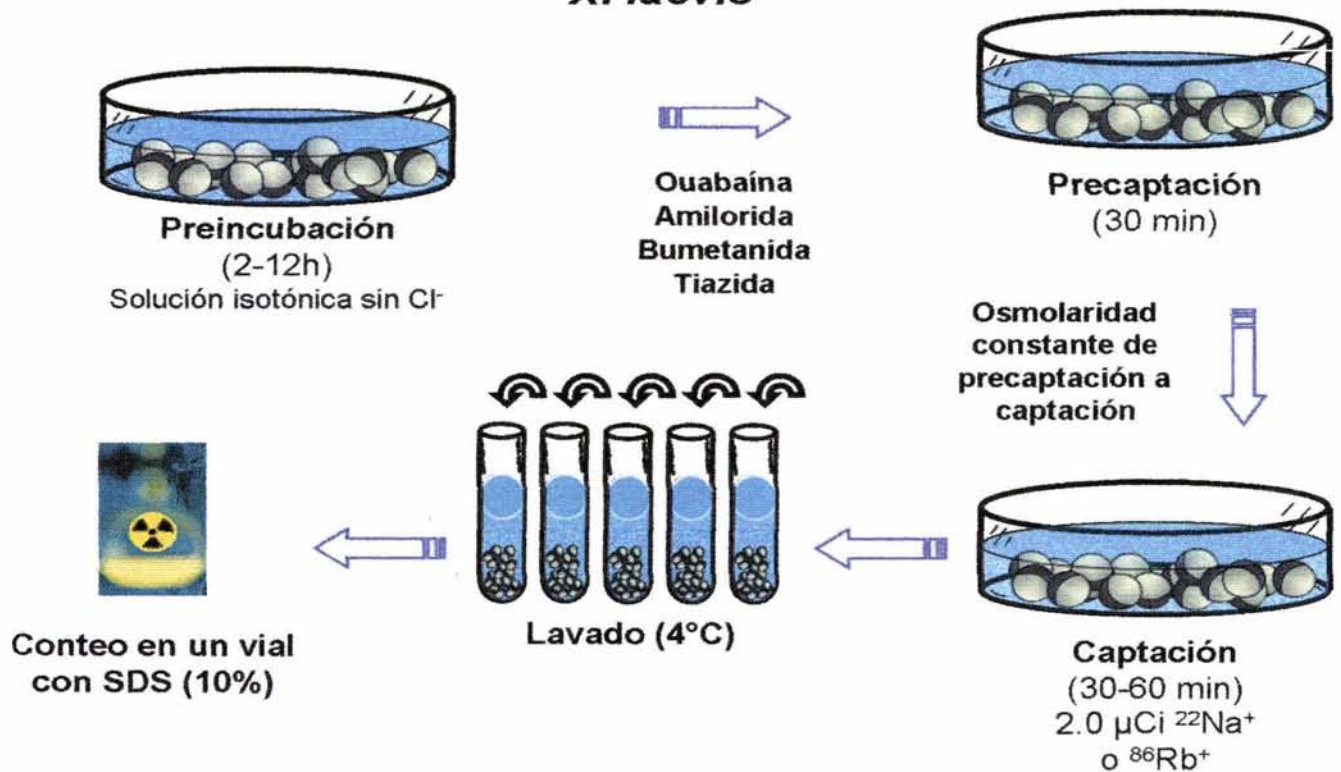


Fig. 3E. Protocolo para los ensayos de transporte de los cotransportadores de $\text{Na}^+:(\text{K}^+):\text{Cl}^-$. Para mayor detalle ver texto y los Apéndices IX y X.

Para los experimentos de transporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, utilizamos el protocolo descrito en el Apéndice VII usando las soluciones del Apéndice IX. Los tiempos de incubación, temperatura, inhibidores y lavado son los mismos que en el caso anterior.

Todos los ovocitos se depositan individualmente en viales con líquido de centelleo con SDS (10%) y se agitan vigorosamente para facilitar la lisis de la membrana plasmática. Los viales se depositan en un contador de centelleo (Beckman, MO, US) y se lee con sensibilidad para radiación de tipo β al medir $^{86}\text{Rb}^+$ o $^{22}\text{Na}^+$.

3.5 Análisis estadístico.

El análisis de la captación se llevó a cabo usando el programa Sigma Plot 8.02[®] (SPSS, Chicago, IL, US). Para el análisis cinético se usó el software GraphPad[®] Prism[®] v 4.0, estimando los valores EC50 o Km para cada ión según se indique, graficando \log [ión] vs. V/V_{max} en dicho programa. Todos los resultados presentados se basan en ~15 ovocitos por grupo por experimento como mínimo. El valor p (significancia estadística) fue calculada por las pruebas de t de Student o mediante ANOVA de una sola cola, y las comparaciones múltiples fueron corregidas por el método de Bonferroni, en el mismo software. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar.

Capítulo IV

4. Resultados

4.1 Construcción de las Quimeras.

Para la construcción de TBB, se escogió generar un fragmento A-D *EcoRI*-*AspI* (Fig. 4A) que una vez digerido podía ser insertado correctamente en el vector que contiene a CSB1r, previamente digerido con las mismas enzimas. Todos los fragmentos, por su tamaño, fueron amplificados con polimerasas de alta procesividad, en particular *Pfu* (Promega, Madison, WI, EU.) y *Pwo* (Roche, Mannheim, Alemania).

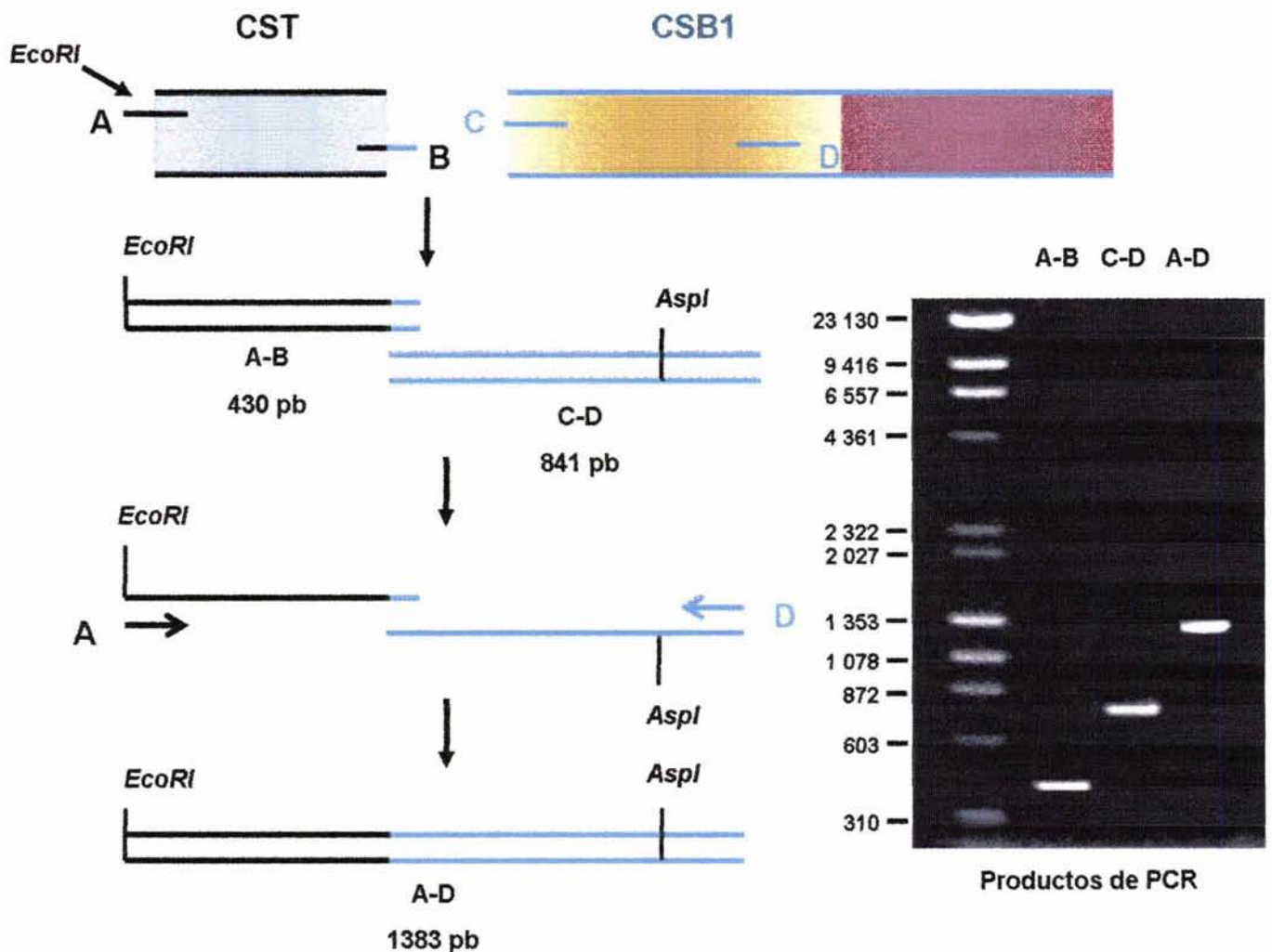


Fig. 4A. Construcción de la quimera TBB. En la parte superior se muestra en azul la porción del cDNA de CST que codifica para el segmento N-terminal. En amarillo y rojo se muestra los segmentos que codifican para la porción central hidrofóbica y el dominio C-terminal de CSB1r, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos obtenidos se muestran debajo de cada fragmento. En el oligo A se incluye un sitio *EcoRI* 5'. El oligo B amplifica un segmento que se hibrida con CSB1r (azul). Cada fragmento, A-B, C-D y A-D, fue obtenido en una ronda de PCR diferente. El análisis de electroforesis se muestra a la derecha. El fragmento A-D fue digerido con las enzimas de sitio único *EcoRI* y *AspI*, para ser ligadas posteriormente con el vector que lleva a CSB1r, y de esta forma completar el ORF.

Una vez digeridos con las enzimas indicadas y purificados tanto el fragmento de PCR A-D como el plásmido pSPORT::CSB1r (MinElute Gel Extraction Kit de Qiagen, Hilden, Alemania; según las instrucciones del fabricante), fueron ligados. *EcoRI* se localiza 5' en el polylinker y *AspI* en la posición 1545 3' de dicho vector. Ambos fragmentos purificados nuevamente (Kit GeneClean de Qiagen, Hilden, Alemania) fueron ligados toda la noche a 16 °C. Ver figura 4B.

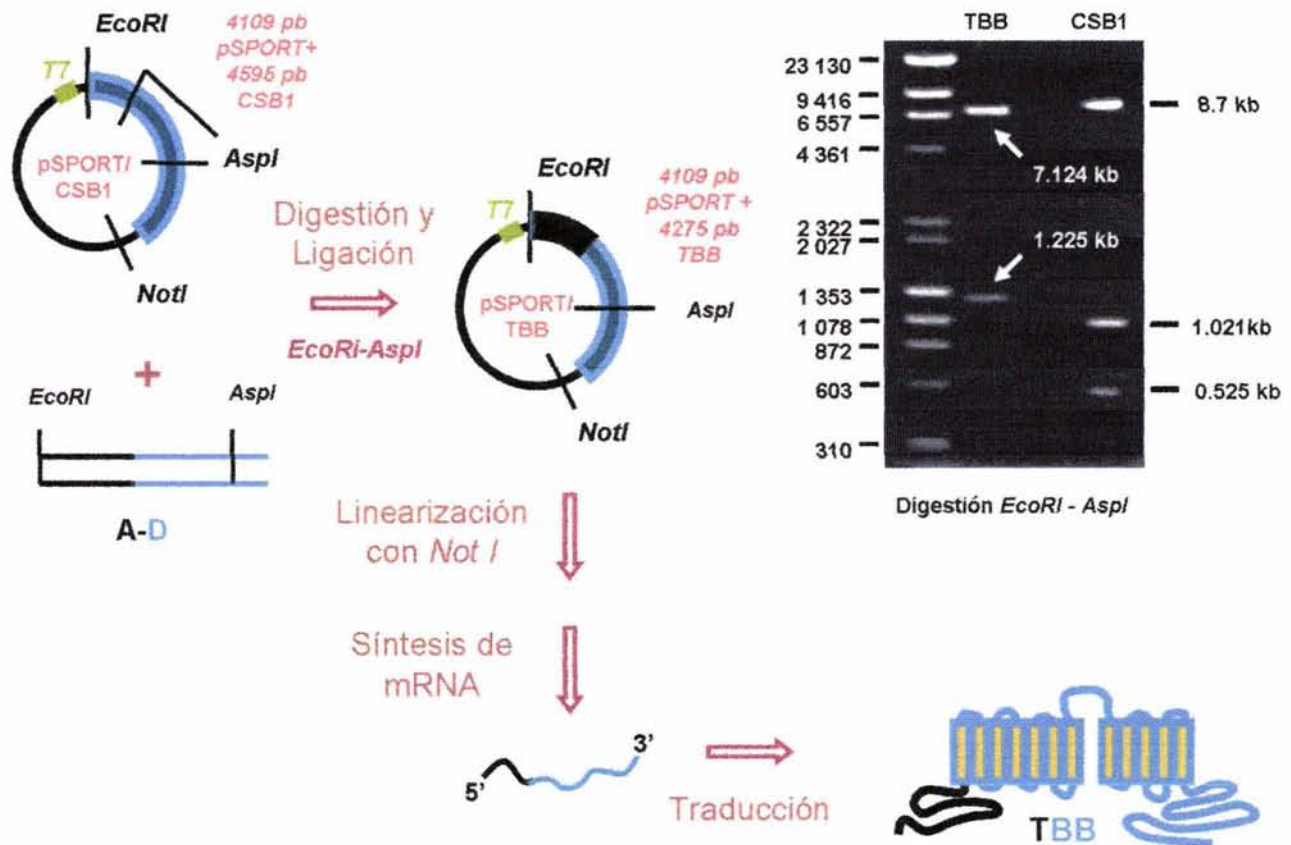


Fig. 4B. La digestión del fragmento A-D (*EcoRI-AspI*) permitió ligar en la dirección correcta y sustituir el segmento correspondiente en el vector de CSB1r, generando la quimera TBB. Para comprobar que el inserto estaba bien orientado, se digirió el vector recombinante TBB (*EcoRI-NotI*), se purificó la banda grande, se volvió a digerir (*AspI*) y posteriormente se analizó por electroforesis (ver gel en la parte derecha). Uno de los sitios *AspI* (posición 525) se pierde en TBB puesto que ahora el segmento correspondiente al N-terminal de CST no lo tiene, lo que explica que sólo se observen dos bandas en lugar de tres.

Una vez ligados los productos recombinantes se usaron para transformar bacterias competentes (DH5 α -T1 de Gibco, Mannheim, Alemania) ya sea por electroporación (800V, 1 s) o por choque térmico (42 °C, 40 s).

Realizada la "miniprep" de diversas colonias positivas (Plasmid Miniprep Kit de Stratagene, La Jolla, CA, EU.), se digirió el plásmido con *EcoRI-AspI* para verificar el tamaño de los fragmentos esperados (gel de la fig. 4B) para verificar que se hubieran ligado en la orientación correcta. Si la clona mostraba los fragmentos esperados después de la digestión, ésta se secuenció para verificar que no acarreará mutaciones no esperadas. Una vez que éstas fueran verificadas, el vector se linearizó con la enzima *NotI* y se hizo la síntesis *in vitro* de RNA para inyectar en los ovocitos.

Mientras se secuenciaba la quimera TBB, hicimos el mismo procedimiento para la construcción de la quimera BTT. Como se resume en la figura 4C, el fragmento A-D contenía un sitio *EcoRI* hacia 5' y un sitio *Clal* hacia el extremo 3', presente en CST.

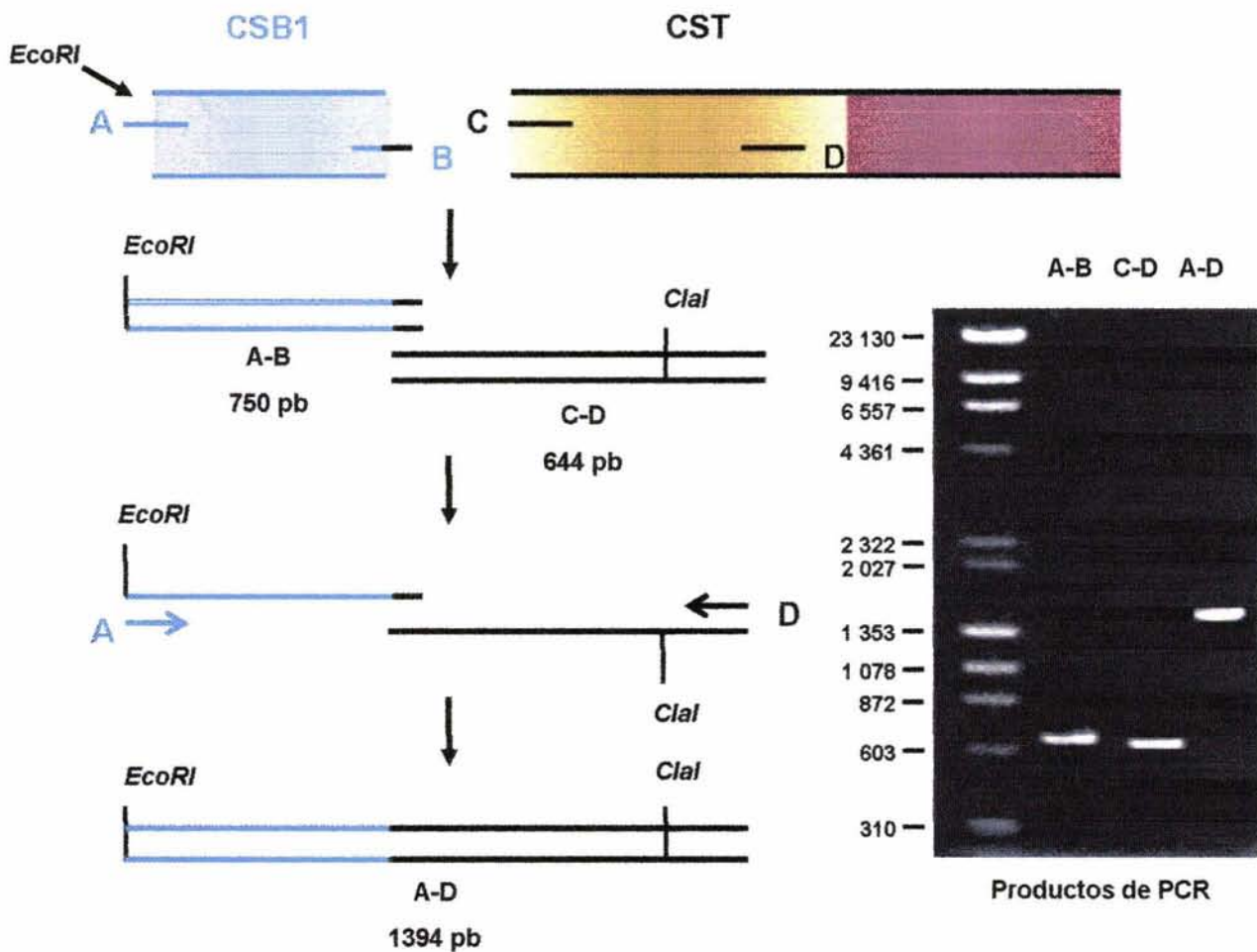


Fig. 4C. Construcción de la quimera BTT. En la parte superior se muestra en azul la porción del cDNA de CSB1r que codifica para el segmento N-terminal. En amarillo y rojo se muestra los segmentos que codifican para la porción central hidrofóbica y el dominio C-terminal de CSTr, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos obtenidos se muestran debajo de cada fragmento. El oligo A se incluye un sitio *EcoRI* 5'. El oligo B amplifica un segmento que se hibrida con CSTr (negro). Cada fragmento, A-B, C-D y A-D, fue obtenido en una ronda de PCR diferente. El análisis de electroforesis se muestra a la derecha. El fragmento A-D fue digerido con las enzimas de sitio único *EcoRI* y *Clal*, para ser ligadas posteriormente con el vector que lleva a CSTr, y de esta forma completar el ORF.

Una vez purificado el fragmento A-D de BTT, fue digerido y ligado para sustituir el segmento correspondiente en el vector de CSTr silvestre. La fig. 4D resume el procedimiento de ligación y la quimera resultante.

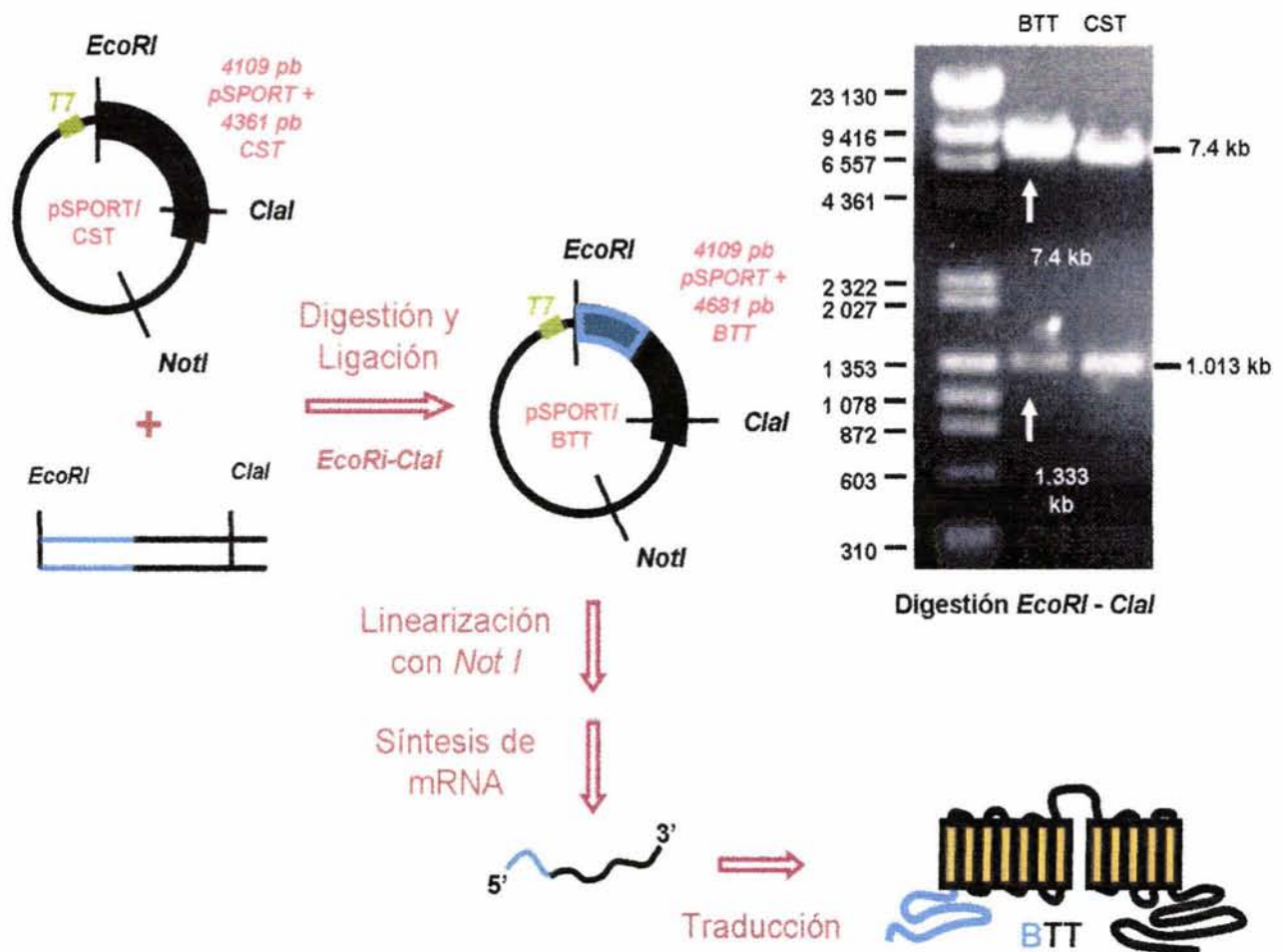


Fig. 4D. La digestión del fragmento A-D (*EcoRI*-*Clal*) y la posterior ligación en el vector de CSB1r, permitió la sustitución del segmento correspondiente, generando la quimera BTT. Para comprobar que la ligación era correcta, se digirió el vector recombinante (*EcoRI*-*NotI*), se purificó la banda grande, se volvió a digerir (*Clal*) y posteriormente se analizó por electroforesis (ver gel en la parte derecha). Como se observa, la banda inferior en BTT tiene un mayor peso dado que el segmento N-terminal proveniente de CSB1r es ~300 pb más grande.

Sin embargo, cuando se tuvo la secuencia de la clona de TBB resultante, ésta acarrea 3 mutaciones en distintos sitios, dos de ellas silenciosas y la otra resultó ser deletérea. Para corregir esta mutante se podían diseñar oligos que revirtieran tal efecto. Otra opción consistió en repetir las rondas de PCR desde el inicio, sin embargo, no fue posible obtener colonias positivas. La tercera opción, surgió al revisar nuevamente a las secuencias de CSTr y CSB1r en busca de sitios únicos que fueran útiles para llevar a cabo el intercambio del segmento N-terminal mediante el uso de enzimas de restricción, para saber si no resultaba más fácil realizar el intercambio o para realizar nuevamente toda la estrategia de PCR-overlap extension por tercera vez. Se encontró que en CST existía un sitio *Nsi I* que se hallaba en la posición 444-449, justo en la Arg¹⁴³ del dominio TM1, que en CSB1r podía ser insertado por mutagénesis dirigida (Quickchange, Stratagene, La Jolla, CA, EU.) mediante una transversión G-A en la posición 761 del mismo a.a (mutación silenciosa). De esta forma sólo se sintetizó un solo oligonucleótido más y se llevó a cabo el intercambio. Ver figura 4E.

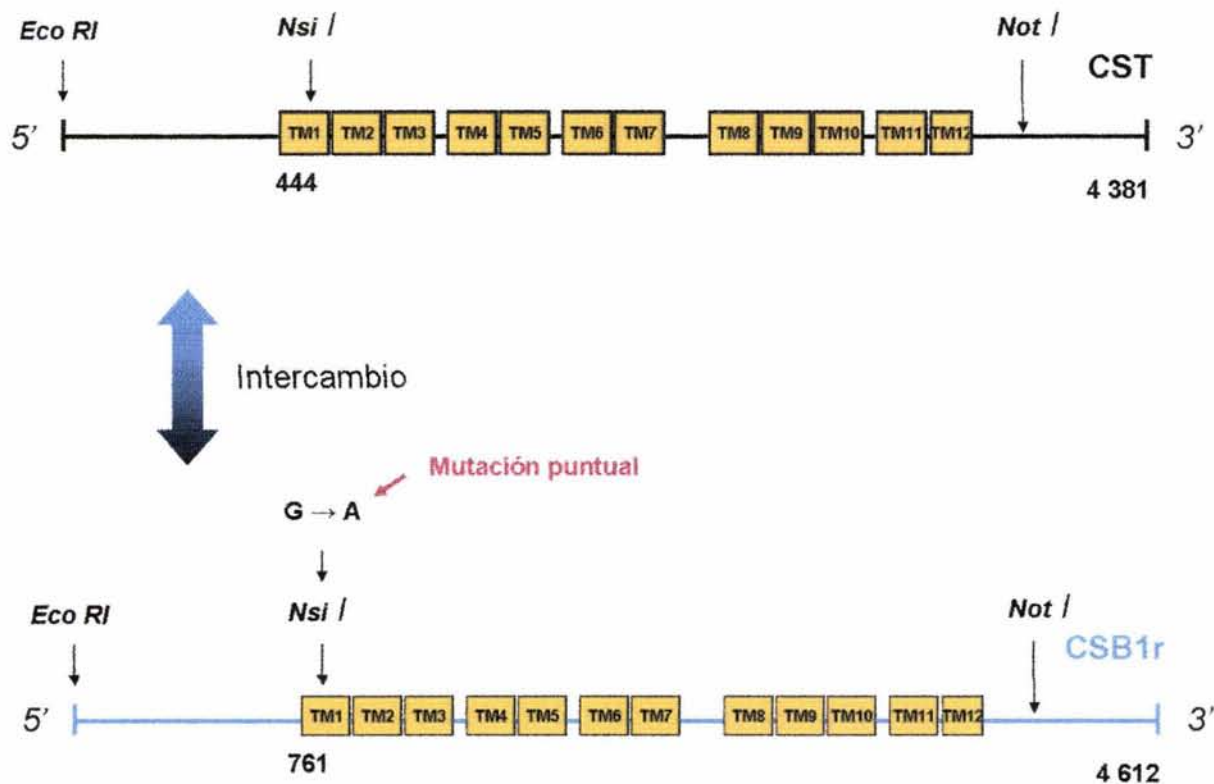


Fig. 4E. Mutagénesis dirigida (G-A) en CSB1 para insertar el sitio único *Nsi I* que se encuentra en CSTr silvestre en la Arg 143 del dominio TM1. Una vez insertado, se lleva a cabo la digestión *EcoRI-NsiI* y mediante intercambio pueden ligarse en los vectores correspondientes, y así generar ambas quimeras. Para llevar a cabo la mutación puntual se utilizó el sistema QuickChange de Stratagene, La Jolla, CA, EU.

Las bandas digeridas, purificadas, ligadas y clonadas fueron secuenciadas para corroborar que no se presentaran mutaciones de nueva cuenta, como efectivamente ocurrió. Hecho esto, se procedió a linearizar los vectores y a hacer transcripción in vitro. Al finalizar este último procedimiento, las muestras se incuban con DNasa, son lavadas, precipitadas y resuspendidas para ser analizadas posteriormente. En todos los casos, las muestras se analizaron por electroforesis en un gel desnaturizante de RNA para comprobar la integridad del mensajero (Apéndice IV). Ver figura 3I.

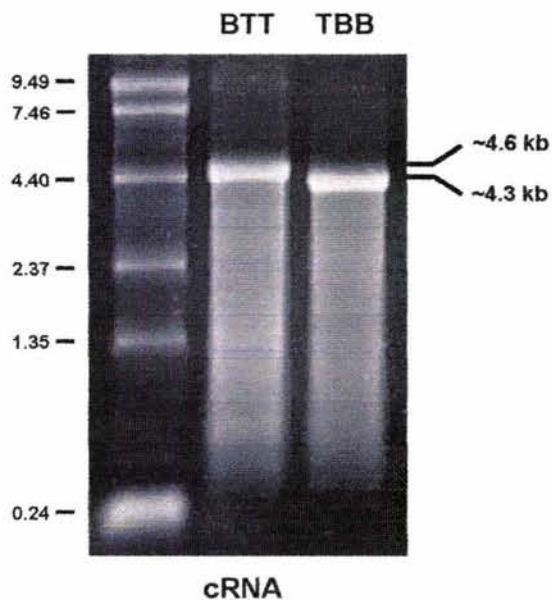


Fig. 4F. El cRNA obtenido fue analizado por electroforesis y cuantificado por espectrofotometría a 260/280 nm (DU640 Beckman, Fullerton, CA, EU.) o por densitometría. Las bandas observadas, corresponden al tamaño esperado para cada quimera e incluye las secuencias de poliadenilación y CAP 5'. Una vez verificada la integridad del cRNA, éste es diluido y alicuotado y congelado a -80°C , hasta usarse.

4.2 Caracterización Funcional de la Quimera BTT.

4.2.1 BTT se comporta como CSTR.

Dado que la mayor parte de la secuencia de aminoácidos de clona de BTT se derivaba de CSTR, esperábamos un comportamiento semejante a éste último. Para determinar si la clona era funcional, realizamos un ensayo de captación de $^{22}\text{Na}^+$ (Fig. 4E).

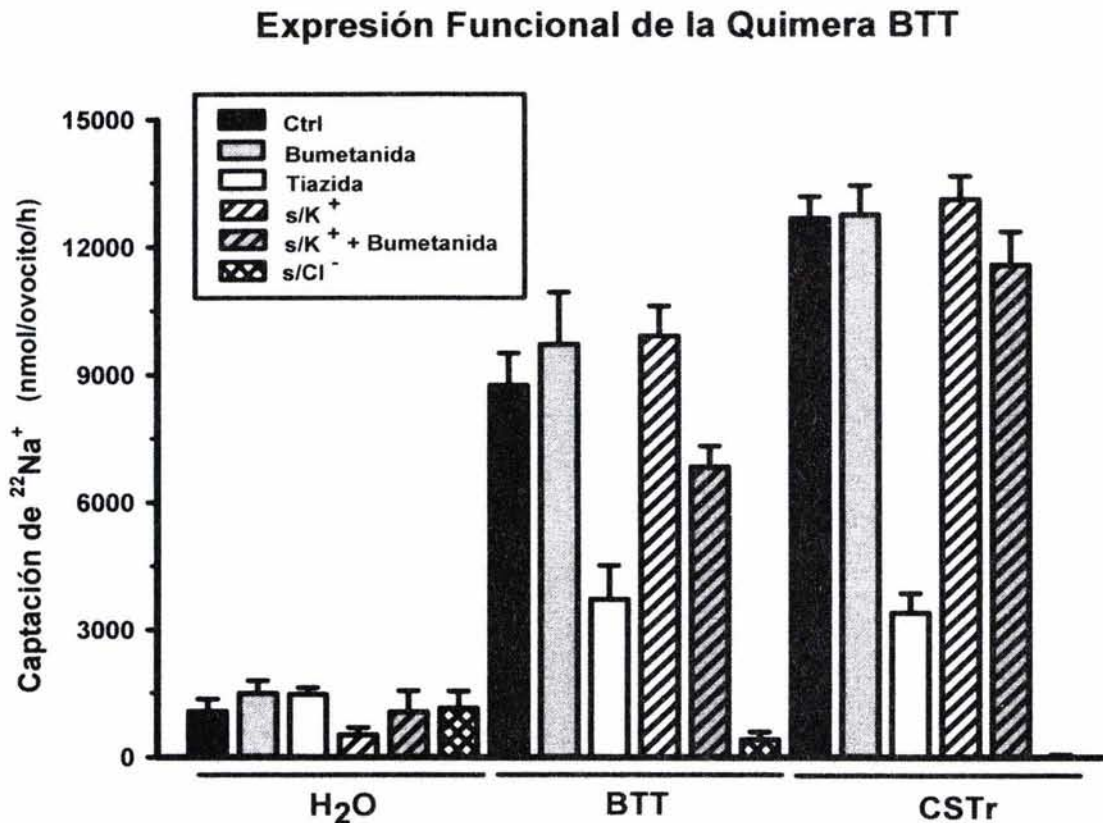


Fig. 4E. Ensayo de captación de $^{22}\text{Na}^+$ ($2 \mu\text{Ci/mL}$) en ovocitos inyectados con agua, mRNA de BTT o mRNA de CSTR. En condiciones de isotonicidad (medio Ringer ND96 de $210 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), la quimera BTT fue insensible al diurético Bumetanida ($100 \mu\text{M}$) pero no a la Triclorometiazida ($100 \mu\text{M}$). La captación de Na^+ no cambia en ausencia de K^+ extracelular (se sustituye por *N*-metil-D-glucamina 30 mM), pero sí disminuye en ausencia de Cl^- extracelular (se sustituye por una solución de gluconatos), mostrando un perfil funcional cualitativo semejante al de CSTR. La osmolaridad de las soluciones fue de $210 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$. Las barras vacías son grupos sin tratamiento con bumetanida ni con tiazida. Ver apéndice IX.

Los ovocitos inyectados con la clona BTT transportan más Na^+ que los ovocitos inyectados con agua ($8.7 \pm 0.7 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ vs $1.0 \pm 0.2 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $p < 0.01$); además, el transporte es dependiente de Cl^- ($0.41 \pm 0.17 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $p < 0.01$) y sensible a triclorometiazida en una concentración de $100 \mu\text{M}$ ($3.7 \pm 0.79 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $p < 0.01$), aunque dicho transporte es independiente de K^+ extracelular ($9.9 \pm 9.06 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $p = \text{ns}$) e insensible a Bumetanida en una concentración de $100 \mu\text{M}$ ($9.7 \pm 1.2 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $p = \text{ns}$). Ver figura 4E.

Con estos resultados, de esta forma la quimera BTT mostró un comportamiento similar a CST. El transporte resultó ser independiente de K^+ , dependiente de Cl^- e insensible a bumetanida pero no a tiazida.

4.2.2. Cinéticas de Na^+ y Cl^- de la Quimera BTT.

El valor de K_M para Na^+ en la quimera BTT resultó ser muy similar el previamente reportado para CSTr (BTT 8.8 ± 1.8 mM vs. CST 7.6 ± 1.6 mM, $p=ns$) (Fig. 4F). El valor de K_M para el Cl^- , sufrió un incremento (BTT 2.5 ± 0.76 mM vs. CST 6.3 ± 1.1 mM, $p<0.01$), aumentando la afinidad (Fig. 4G).

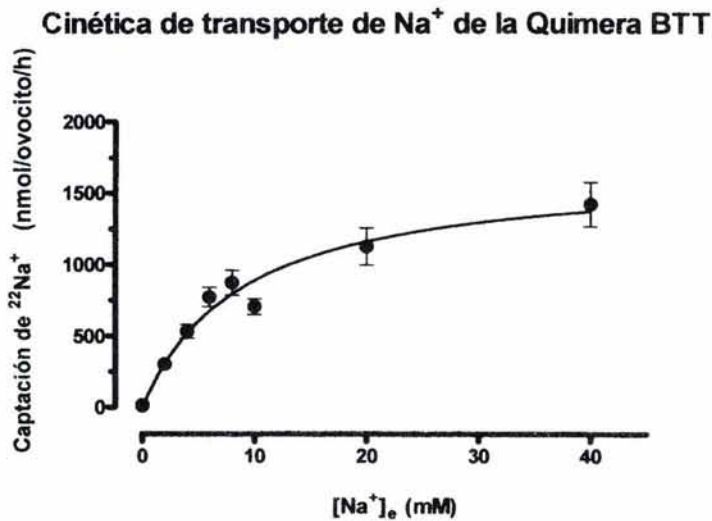
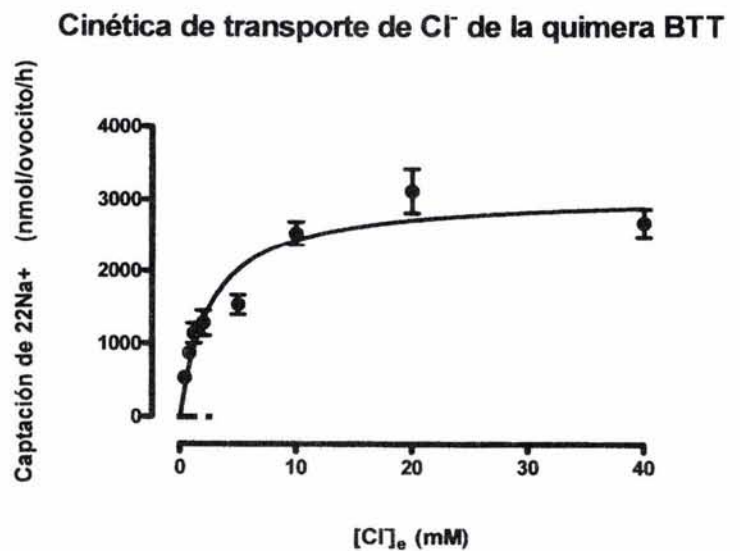


Fig. 4F. Se muestra la cinética de captación de $^{22}Na^+$ ($2 \mu Ci/\mu L$) con concentraciones de sodio extracelular desde 0-40 mM, en ovocitos inyectados con mRNA de la quimera BTT (50 mg/ovocito). La K_M resultante es de 8.8 ± 1.81 mM con una V_{max} de 1.67 ± 0.14 mM. La cada punto equivale al promedio de ~ 15 ovocitos por grupo. El experimento fue realizado en medio isotónico ($210 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$). Todos los puntos son la captación total menos la captación de agua. El experimento se realizó en ausencia de K^+ extracelular y con gluconato de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . La $[Cl^-]_e$ se fijó en 40 mM.

Fig. 4G. Se muestra la cinética de captación de $^{22}Na^+$ ($2 \mu Ci/mL$) en ovocitos inyectados con mRNA de la quimera BTT (25 ng/ovocito). Se probaron concentraciones desde el intervalo de 0-40 mM de cloro extracelular. La K_M resultante es de 2.5 ± 0.76 mM con una V_{max} de 3.07 ± 0.25 mM. La cada punto equivale al promedio de ~ 15 ovocitos por grupo. El experimento fue realizado en medio isotónico ($210 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$). Todos los puntos son la captación total menos la captación de agua. El experimento se realizó en ausencia de K^+ extracelular en una solución de gluconatos. La $[Na^+]_e$ se fijó en 40 mM.



4.2.3 Curva de inhibición por Metolazona.

Para cuantificar si el cambio del segmento amino terminal afectaría la velocidad de transporte de los iones y de la unión del diurético Metolazona, realizamos ensayos de captación modificando la concentración del sustrato y con esto determinar las constantes de afinidad de la clona BTT.

La quimera BTT mostró tener una sensibilidad al diurético tipo tiazida, Metolazona, similar a la reportada para CSTr ($< 1 \times 10^{-6}$ M ó 1 μ M). Ver figura 4H.

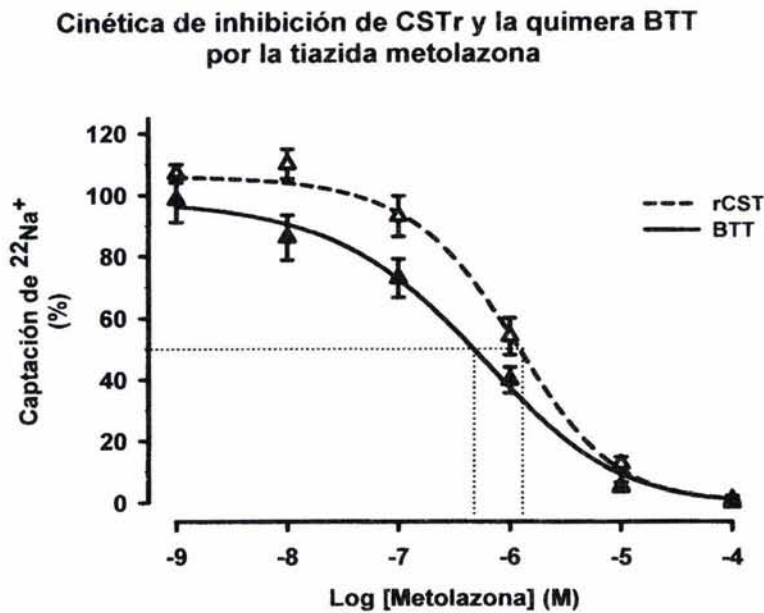


Fig. 4H. Se muestra la curva dosis respuesta de captación de $^{22}\text{Na}^+$ (2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) en ovocitos inyectados con mRNA de la quimera BTT (50 mg/ovocito), probando diferentes concentraciones de metolazona. La K_M resultante es de 0.262 μM para CST vs. 0.127 μM . Cada punto equivale al promedio de ~15 ovocitos por grupo. El experimento fue realizado en medio isotónico (210 $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ H_2O). Todos los puntos de la gráfica son la captación total menos la captación de agua. El experimento se realizó en presencia de 40 mM de Na^+ y 96 mM de Cl^- .

4.2.4 Efecto de la Tonicidad sobre la Función de la Quimera BTT.

Ya se había reportado que CSTr es sensible al cambio de volumen de la célula, especialmente se inactiva en condiciones de hipotonicidad, decidimos determinar si la clona BTT modificaría su función en diferentes condiciones de tonicidad.

La quimera BTT mostró una respuesta a los cambios en la osmolaridad extracelular, similar a CST. Fijando la actividad como 100% para los ovocitos incubados en medio isotónico, la captación de $^{22}\text{Na}^+$ se redujo parcialmente (BTT ~45% vs. CST ~26%, $p < 0.05$) en condiciones de hipotonicidad (160 $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ H_2O) y no se modificó ($p = \text{ns}$) en condiciones control y de hipertonicidad (260 $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ H_2O). Sin embargo, en hipotonicidad claramente existe una resistencia a la inhibición por el diurético triclorometiazida en la quimera BTT. Posiblemente esto se deba a que los sitios de regulación en el aminoterminal se encuentren activados, aumentando la actividad de transporte o bien, la concentración de sodio o cloro extracelulares es muy alta y no podemos ver en ese estado una inhibición completa como ocurre en otras condiciones de tonicidad.

Aunque ahora es un tema de discusión, hay un reporte que habla que las tiazidas compiten únicamente por el sitio de cloro [86], aunque en otro trabajo hecho por A. Monroy y colaboradores se menciona que la isoforma de rata y lenguado de invierno, son capaces de unir metolazona compitiendo tanto por el sitio de unión a sodio como al de cloro [74].

Efecto de la osmolaridad extracelular sobre la actividad de la quimera BTT

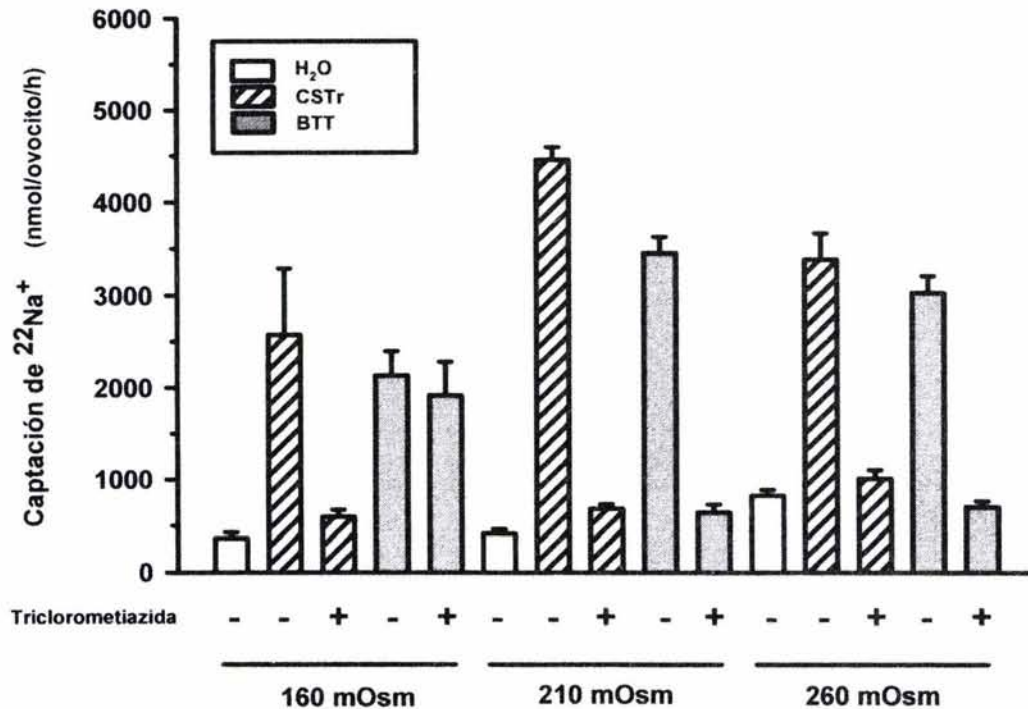


Fig. 41. Perfil de respuesta a los cambios de tonicidad del medio extracelular en la quimera BTT y en CST. Las soluciones hipertónicas (260 mOsm) se lograron adicionando un compuesto no permeable como la sacarosa. La adición de triclorometiazida produce un efecto inhibitorio muy grande en condiciones de isotonicidad e hipertonicidad, tanto para CST como para BTT. Sin embargo, en la condición de hipotonicidad, la quimera BTT muestra una insensibilidad al efecto de la tiazida. Todas las soluciones fueron realizadas en medio con 96 mM de NaCl.

4.3 Caracterización Funcional de la Quimera TBB.

4.3.1 La clona TBB se comporta como CSB1.

Para identificar si la clona TBB era funcional, inyectamos ovocitos con el RNAc y medimos la captación de ⁸⁶Rb⁺ bajo distintas condiciones.

La inyección del mRNA de TBB en ovocitos de *X. laevis* resultó en el incremento significativo de la captación de ⁸⁶Rb⁺ con respecto a los ovocitos inyectados con agua (TBB 4.8 ± 0.31 vs. H₂O 1.0 ± 0.07 nmol·ovocito⁻¹·h⁻¹, p<0.01). La captación de este isótopo es dependiente de Cl⁻ extracelular (0.33 ± 0.049 nmol·ovocito⁻¹·h⁻¹).

¹, $p < 0.01$) y sensible a Bumetanida a una concentración de $100 \mu\text{M}$ ($0.18 \pm 0.13 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $p < 0.01$). Claramente el transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ es independiente de la acción de Metolazona -un tipo de tiazida- ($5.1 \pm 0.45 \text{ nmol-ovocito}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, ns). Ver figuras 4J y 4K.

Comparación Funcional de la Quimera TBB vs. CSB

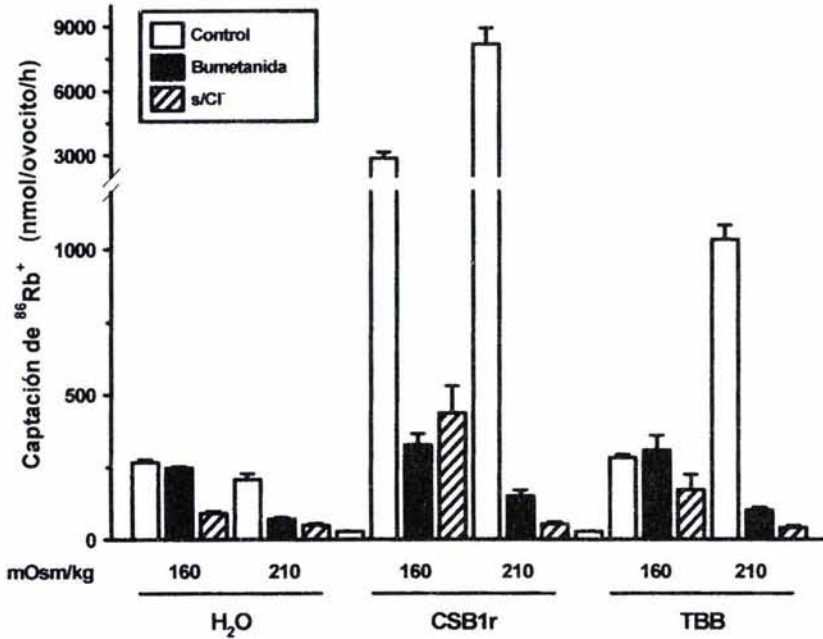


Fig. 4J. Análisis funcional de la quimera TBB mediante la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ ($2 \mu\text{Ci/mL}$) en ringer ND96 de ovocitos inyectados con agua, cRNA de TBB o cRNA de rCSB1. Probamos si el transporte se afectaba en condiciones de hipo o isotonicidad y si el transporte era dependiente de cloro. La quimera TBB fue sensible al diurético Bumetanida ($100 \mu\text{M}$), excepto en condiciones de hipotonicidad. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ disminuye en ausencia de Cl^- extracelular, mostrando un perfil funcional cualitativo semejante al de rCSB1. La osmolaridad de las soluciones es como se indica. Las barras vacías representan grupos sin tratamiento con Bumetanida. Ver Apéndice X.

Estos resultados nos daban una idea de que el comportamiento de TBB tenía un perfil semejante en comportamiento a CSB1. Para corroborar que el transporte de Na^+ era semejante en perfil de transporte de K^+ (recordemos que la estequiometría de transporte es de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$), llevamos a cabo experimentos de captación de $^{22}\text{Na}^+$.

El perfil de transporte fue idéntico; hubo un incremento de la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ que es dependiente de Cl^- extracelular, ya éste es sustituido por un compuesto no permeable como el gluconato (ver Apéndice IX) además dicho transporte disminuye en presencia de bumetanida, pero no en presencia de metolazona (Fig. 4K).

Los resultados mostraron que el intercambio del extremo amino terminal en CSB1r no afectó el perfil de transporte ni de la inhibición por bumetanida. Cualitativamente muestran el mismo comportamiento. Un resultado esperable, puesto que todos los segmentos transmembranales y el carboxilo terminal estaban intactos. Recordemos que se sugiere que la afinidad y selectividad se encuentran determinadas en los segmentos TM.

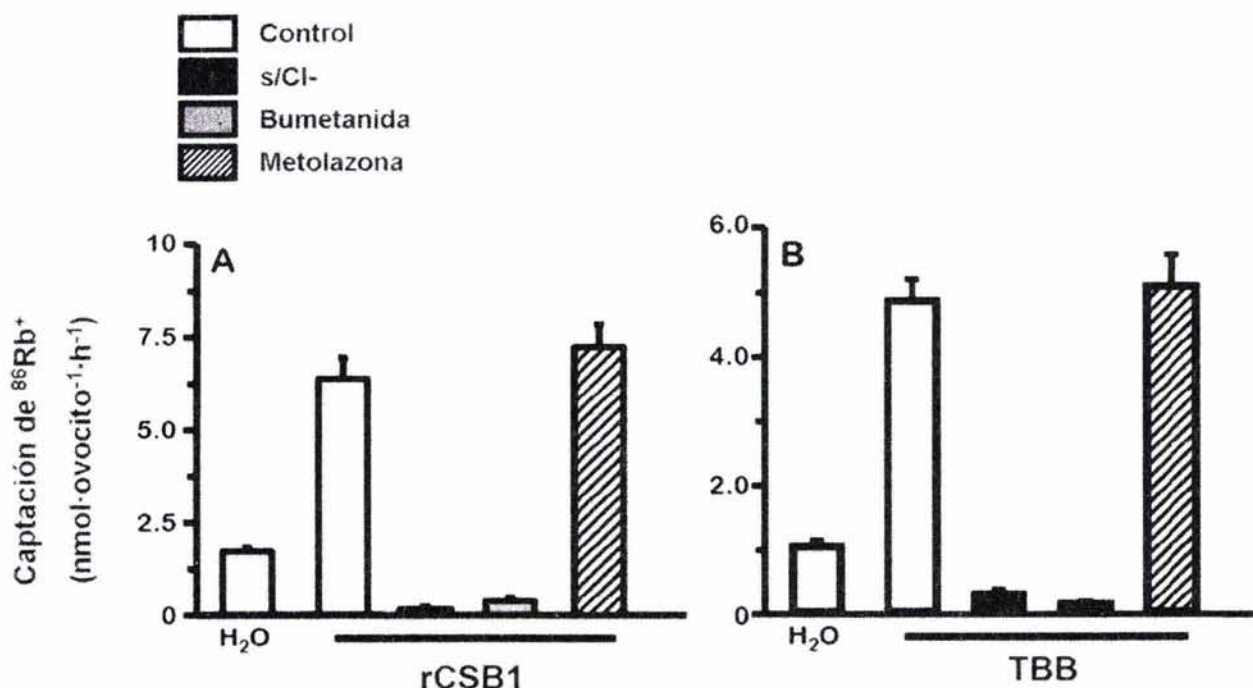


Fig. 4K. Captación de $^{86}\text{Rb}^+$ (2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) en ovocitos inyectados con agua o cRNA de CSB1r o de TBB. La captación se llevó a cabo en condiciones isotónicas en medio Ringer ND96. Los controles representan a la captación sin drogas y en medio completo. Las barras negras representan la ausencia de cloro extracelular, las barras grises en presencia de bumetanida y las barras achuradas representan los grupos con metolazona. En (A) se muestra la captación de CSB1r y en (B) la de la quimera TBB. Nótese que tanto CSB1r como TBB son insensibles al diurético metolazona, y muestran una gran dependencia de la presencia de cloro en el medio.

4.3.2 Cinéticas de Na^+ , K^+ y Cl^- de la Quimera TBB.

Para medir la velocidad de transporte de TBB realizamos curvas dosis-respuesta de sodio y rubidio (potasio), así como una curva de inhibición por bumetanida.

Los valores transporte EC_{50} para Na^+ fueron similares para TBB y CSB1r ($9.1 \pm 1.8 \text{ mM}$ y $10.1 \pm 1.9 \text{ mM}$, respectivamente; $p > 0.01$, ns). En el caso del K^+ , el valor de EC_{50} disminuyó aunque no alcanza significancia estadística (TBB $0.91 \pm 0.17 \text{ mM}$ vs. CSB1 $1.87 \pm 0.8 \text{ mM}$, ns). En el caso del valor de EC_{50} para Cl^- fue mayor en CSB1r que en TBB ($54.4 \pm 7.3 \text{ mM}$ y $32 \pm 4.0 \text{ mM}$, respectivamente, $p < 0.01$). De esta forma establecimos que el perfil por la afinidad este anión era CSB1r < TBB. Ello quiere decir que se incrementó la afinidad significativamente ($p < 0.01$). Figura 4L.

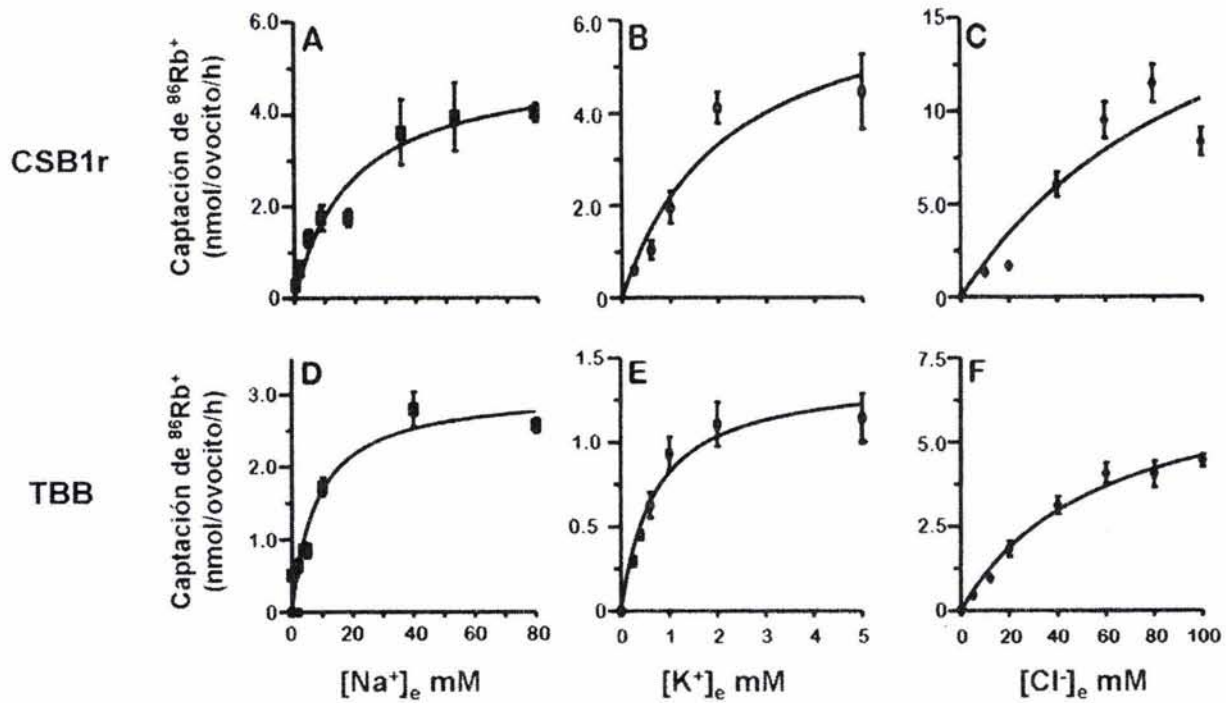


Fig. 4L. Cinéticas de captación de ⁸⁶Rb⁺ (2 μCi/mL) en ovocitos inyectados con RNA de CSB1r o de TBB, cambiando la concentración de Na⁺ de 0 a 80mM (paneles A y D), K⁺ de 0 a 5 mM (paneles B y E) y Cl⁻ de 0 a 100 mM (paneles C y F). La captación se llevó a cabo en condiciones de isotonicidad. Cuando la concentración de un ión fue variado, la concentración de los otros iones se mantuvo fija: Na⁺ 96 mM, K⁺ 10 mM y Cl⁻ 96 mM las concentraciones de K⁺ y Cl⁻ en Los paneles A-C son las cinéticas realizadas en CSB1, y los paneles D-F, las de TBB. Los valores de EC₅₀ se resumen en la Tabla 2. Cada punto representa el promedio de 15 ovocitos aproximadamente.

4.3.3 Curva de Inhibición por Bumetanida.

La Bumetanida es un inhibidor específico de CSB, y tal como lo muestran los ensayos de captación en 5.3.1. Mediante la determinación de la IC₅₀ en presencia de 100 mM de Cl⁻ extracelular, la quimera TBB mostró un afinidad por la bumetanida sensiblemente menor. Mientras que CSB1r tiene una IC₅₀ de 0.95 ± 0.08 μM, TBB muestra el mismo valor en 3.1 ± 0.9 μM (p<0.01) (Figura 4M).

Curva Dosis-Respuesta de Bumetanida en la quimera TBB y CSB1r

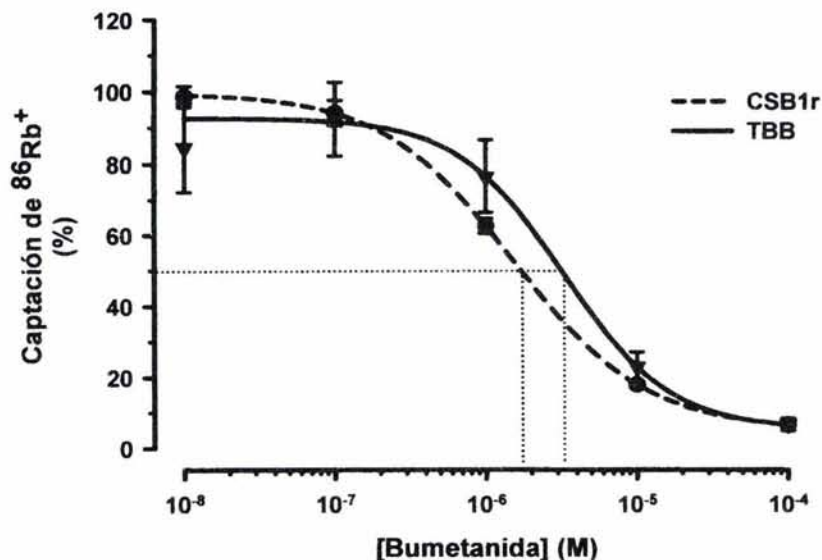


Fig. 4M. Se muestra la cinética de captación de $^{86}\text{Rb}^+$ ($2 \mu\text{Ci/mL}$) en ovocitos inyectados con mRNA (50 mg/ovocito) de la quimera BTT y CSB1r, probando concentraciones de Bumetanida ($100\text{-}0.01 \text{ mM}$). La IC_{50} resultante es de $0.95\text{e-}6 \pm 0.08 \text{ M}$ para CSB1r y de $3.1\text{e-}6 \pm 0.9 \text{ M}$. La cada punto equivale al promedio de ~ 15 ovocitos por grupo. El experimento fue realizado en medio isotónico ($210 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) ND 96 con 40 mM de Cl^- . El 100% de la captación se define como el valor

Dado que la afinidad por cloro aumentó en esta quimera y que la afinidad por la bumetanida fue menor, pensamos que muy probablemente en presencia de 100 mM de Cl^- extracelular, el efecto de la bumetanida fue menor porque el cloro está desplazando continuamente al inhibidor, lo que es consistente con el modelo de Lytle [39] y Forbush [57] para CSB2.

4.3.4 Efecto de la Osmolaridad Extracelular sobre la Función de TBB.

Fijando el valor de captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en condiciones isotónicas ($210 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) como el 100% de la actividad para CSB1r y TBB, hallamos que TBB se volvió más sensible al hinchamiento de la célula dado que disminuye la captación casi en un 100% cuando se incubaba a los ovocitos en medio hipotónico ($160 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$); a diferencia de lo que ocurre con CSB1 que sólo disminuye la captación en un 40% ($p < 0.05$). En cambio, la sensibilidad al encogimiento de las células, en condiciones de hipertonicidad ($260 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), no ejercieron un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad de TBB ($p < 0.01$ con respecto a la captación en medio isotónico). Figura 4N.

Efecto de la tonicidad sobre la función de la quimera TBB

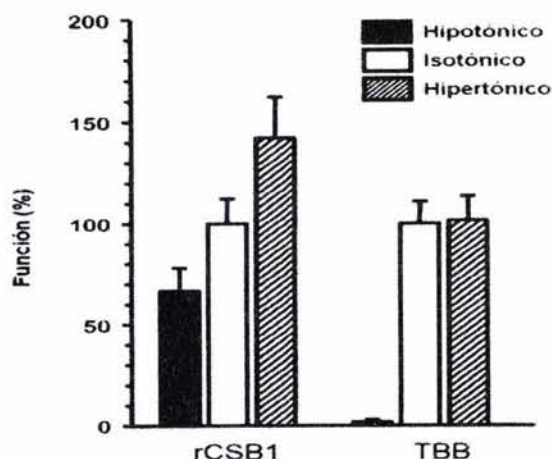


Fig. 4N. Perfil de respuesta a los cambios de tonicidad del medio extracelular en la quimera TBB y en rCSB1. Las soluciones hipertónicas (260 mOsm) se lograron adicionando un compuesto no permeable como la sacarosa. La inhibición de por hipotonicidad en CSB1 (36%) fue menor que TBB (97%). En hipertonicidad, CSB1r muestra una activación (142%), mientras que TBB permanece sin cambio ($p < 0.01$ vs el medio isotónico).

4.3.5 Resumen de resultados.

La Tabla 4A resume los resultados obtenidos sobre la función de las quimeras.

Tabla 4A. Comparación funcional de las quimeras N-terminal de los Cotransportadores CST y CSB1.

Cotransportador	K_M ó EC_{50} (mM)			IC_{50} (μM)		Sensibilidad a la osmolaridad*	
	Na^+	K^+	Cl^-	Tiazida	Bumetanida	Hipo	Hiper
CSTr	7.6 ± 1.6	-	$6.3 \pm 1.1^\ddagger$	0.026	-	\downarrow^\ddagger	ns
BTT	8.8 ± 1.8	-	$2.5 \pm 0.76^\ddagger$	0.012	-	\downarrow^\ddagger	ns
CSB1r	10.1 ± 1.9	1.87 ± 0.8	$32 \pm 4.0^\ddagger$	-	$0.95 \pm 0.08^\ddagger$	\downarrow^\ddagger	\uparrow^\ddagger
TBB	9.1 ± 1.8	0.91 ± 0.17	$54.4 \pm 7.3^\ddagger$	-	$3.1 \pm 0.9^\ddagger$	\downarrow^\ddagger	ns

* Ovocitos incubados en medio Hipotónico (Hipo, 160 mOsm kg^{-1} H_2O) o Hipertónico (Hiper, 260 mOsm kg^{-1} H_2O). $^\ddagger p < 0.001$ con respecto a la captación en medio isotónico.

Tabla 2. Resultados globales de la función de las quimeras. CSTr-BTT se muestran en la misma fila, dado que el comportamiento funcional fue semejante. El mismo criterio se aplica para CSB1r-TBB. Las constantes de K_M o EC_{50} se aplican a CSTr-BTT y a CSB1r-TBB, respectivamente (ver metodología). Los resultados que aparecen como (-) significa que no aplica. La sensibilidad a la osmolaridad se divide en Hipo (Hipotónica) e Hiper (Hipertónica). El símbolo ns significa no significativo, no hubo cambio entre la quimera y la proteína silvestre.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de este trabajo son las siguientes:

- 1) Las quimeras TBB y BTT son funcionales y su función es cualitativamente igual a la función de los cotransportadores silvestres con los que comparten el mayor grado de identidad. Esto es, BTT se comporta como CST y TBB se comporta como CSB1.**

- 2) El dominio N-terminal intracelular de los cotransportadores renales CSTR y CSB1r no determina la selectividad por los iones, la especificidad de inhibición por los diuréticos ni la afinidad por los cationes.**

- 3) El dominio N-terminal modifica la afinidad por el anión cloro y por la unión del diurético bumetanida en la quimera TBB así como la sensibilidad a la hipertonicidad.**

VI. DISCUSIÓN

Efecto del intercambio del segmento N-terminal. En este estudio realizamos la caracterización funcional de quimeras del extremo N-terminal entre los cotransportadores renales CSTR y CSB1r. El análisis funcional mostró que este dominio intracelular no afecta ni determina la selectividad por iones ni por diuréticos en ninguna de las quimeras estudiadas ya que el perfil funcional es similar a los cotransportadores silvestres homólogos a las quimeras. Sin embargo, el intercambio de este dominio entre CSTR y CSB1r afectó la afinidad por el ión cloro en las quimeras BTT y TBB, además, en el caso de la quimera TBB, se modificó la afinidad por el diurético bumetanida en condiciones de isotonicidad así como la sensibilidad a la hipertonicidad.

El papel funcional del dominio N-terminal se ha estudiado anteriormente en la isoforma CSB2 de tiburón por el grupo de Forbush mediante el análisis de tres sitios de fosforilación reguladores. Se describió que, mediante espectrometría de masas y el uso de anticuerpos específicos, bajo condiciones de hipotonicidad y bajo cloro intracelular están fosforilados al menos tres sitios correspondientes a las treoninas 184, 189 y 202 de CSB2. Se sugiere que la fosforilación de al menos un sitio activa a este cotransportador [87]. Este mismo grupo también menciona que dichos sitios están conservados tanto en CSB1, CSB2 y CST. Contrariamente, se ha demostrado que la activación de PKC en ovocitos de rana que expresan CSB1r disminuye el transporte de iones y por otro lado dicho transporte aumenta en condiciones de hipertonicidad [46, 49]. Nuestros resultados, aún cuando no se estudió en este trabajo el papel de la activación de la vía de PKC en ovocitos que expresan a las quimeras, es claro que éstas que mientras la quimera BTT muestra un perfil funcional semejante a CST, la quimera TBB claramente se inactiva en condiciones de hipotonicidad y no es activada en condiciones de hipertonicidad. Al parecer el dominio N-terminal es responsable de emular un efecto similar al observado con la isoforma corta de CSB1r (C4). Si el efecto se debe al tráfico vesicular, está por determinarse. Adicionalmente es necesario determinar si la fosforilación de los potenciales sitios fosfoaceptores en las quimeras participa como parte del efecto observado.

No se ha demostrado hasta el momento qué cinasas se activan en diferentes condiciones de tonicidad en los ovocitos de rana, pero se ha observado que el efecto activador del transporte vía CSB1r en condiciones de hipertonicidad puede simularse mediante la activación de la vía de PKA. Por otro lado las condiciones de inhibición del transporte pueden simularse mediante la activación de la vía de PKC. Si el efecto observado de inhibición del transporte en la quimera TBB es mediado por la vía de PKC es muy probable que el (los) sitio(s) blanco se encuentren fosforilados y esto de alguna forma ejerza un efecto negativo sobre el transporte.

La estrategia usada por el grupo de Forbush al utilizar los ortólogos con un alto grado de identidad (<70%) puede enmascarar sitios importantes que participan en definir la selectividad por iones y diuréticos, impidiendo su detección mediante ensayos funcionales. De esta forma, hay realmente pocas aproximaciones, aunque sugieren qué experimentos se deben realizar. Aunque el grado de identidad entre

las isoformas utilizadas por este grupo con la de CSB1 es muy alto, es posible que las diferencias en la secuencia no revelen sitios clave para la función de estos cotransportadores.

Las propiedades funcionales de afinidad y selectividad se conservan en las quimeras. Tanto BTT como TBB mostraron un comportamiento semejante a CST y CSB1 respectivamente. Esto muestra que el dominio N-terminal no afecta la selectividad y especificidad por los diuréticos. Hasta ahora, datos recientes realizados en quimeras del dominio C-terminal obtenidos por P. Cortés y colaboradores en el laboratorio [artículo en preparación], muestran que este dominio tampoco define los mismos parámetros. Es necesario resaltar que dos de estas nuevas quimeras no mostraron función, éstas son las quimeras TTB y BTB. En este sentido, es posible el dominio C-terminal de alguna forma es requisito indispensable para la función de la proteína, siempre y cuando los segmentos TM sean del mismo contexto que el dominio C-terminal. Posiblemente el plegamiento, oligomerización o localización celular se modifica substancialmente si ocurre lo contrario. De esta forma la conclusión es clara, ni el segmento N-terminal ni el C-terminal definen la selectividad por los iones ni diuréticos. Conclusión que es compartida por los estudios de Forbush utilizando quimeras CSB2 entre humano y tiburón [12].

Para determinar si el efecto deletéreo del cambio del extremo N- o C-terminal depende de una mala maduración, de una deslocalización en la membrana plasmática o bien que la dimerización no se lleve a cabo, es necesario determinar mediante marcaje con anticuerpos y microscopía confocal la localización membranal de todas las quimeras y, por otro lado, se requieren los estudios de Western Blot en condiciones nativas y desnaturalizantes, para determinar si la dimerización ocurre o no. Adicionalmente habrá que demostrar si la fosforilación de uno o más sitios actúa en ambos dominios que a su vez afecte cualquiera de las variables mencionadas; esto se puede lograr mediante la producción de anticuerpos que reconozcan las formas fosforiladas del cotransportador analizadas también mediante Western Blot.

La afinidad por Cl⁻ aumenta en BTT y disminuye en TBB. En condiciones de isotonicidad se encontró que la afinidad por cloro aumentó en la quimera BTT (~2.5X vs CSTr) y disminuyó en TBB (1.7X vs CSB1r). Este cambio puede deberse a que los sitios de unión a cloro sean diferentes en CSTr y CSB1r o bien a que la interacción entre el dominio N-terminal y los segmentos TM no se establezca de la misma forma cuando este dominio es intercambiado. Sin embargo, las condiciones experimentales utilizando 100 mM de Cl⁻ extracelular claramente están describiendo un fenómeno que ocurre en la fase de meseta o de estado estacionario, una vez que se ha alcanzado la V_{max} de la cinética de transporte. Para definir con mayor precisión la cinética de transporte de este anión es necesario analizarla en condiciones de bajo cloro, esto es en condiciones previas al estado estacionario. Esto es importante ya que el modelo de interacción con los iones propuesto por Lytle y Forbush propuesto para CSB2 proponen que uno de los sitios de unión a cloro está relacionado con el sitio de unión a la bumetanida. De esta forma, la IC_{50} observada no muestra el efecto real del dominio N-terminal. Si en condiciones de alto cloro el sitio de unión a cloro está siendo continuamente ocupado, la probabilidad de que la bumetanida se una a su sitio respectivo disminuye.

Por ello se realizaron curvas de inhibición en bajo cloro [10 mM]e en la que se observó que no había una disminución significativa de la afinidad por la bumetanida (fig. 6A). Lo anterior sugiere que los sitios de unión a bumetanida no se afectan si se modifica el segmento N-o C-terminal.

Curva Dosis-Respuesta de Bumetanida en las quimeras TBB y BBT, TBT y CSB1r

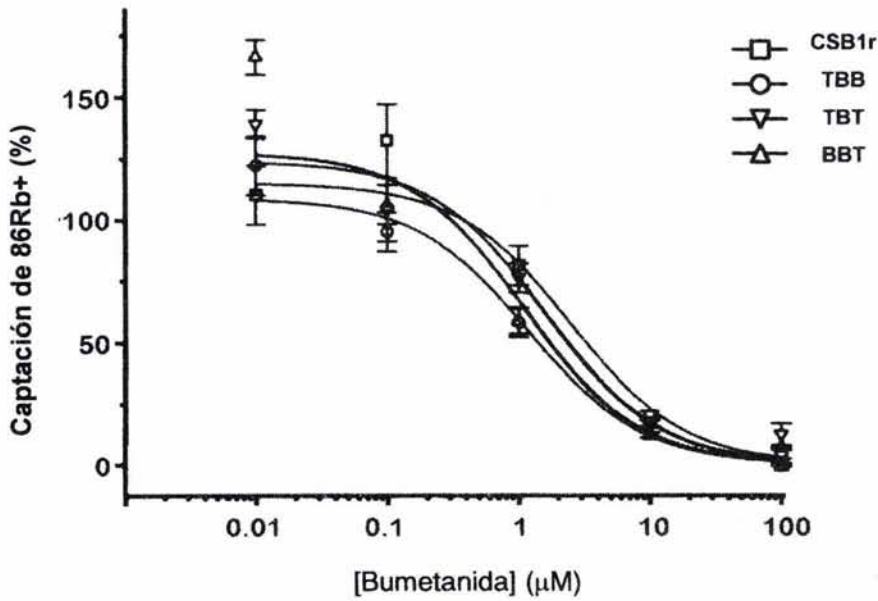


Fig. 6A. Efecto de la dosis de bumetanida (100 mM) sobre diferentes quimeras. La concentración de Cl⁻ extracelular se fijó en 10 mM. El experimento se realizó en un medio isotónico de gluconatos fijando la concentración de sodio en 96 mM y K⁺ en 10 mM.

En este sentido las quimeras que intercambiaron los dominios N-terminal (TBB), C-terminal (BBT) o los dos (TBT) muestran tales intercambios no afectan la afinidad por la bumetanida en condiciones de pre-estado estacionario. Esta observación concuerda con los modelos de interacción antes mencionados.

De los estudios de Isenring y Forbush con las quimeras de CSB2 entre humano y tiburón muestran que el intercambio del segmento N-terminal modifica significativamente la afinidad por Na⁺, K⁺ y Cl⁻. Estas quimeras mostraron que el dominio N-terminal determina la afinidad por los tres iones, ya que cuando es intercambiado, las K_M para todos los iones cambian y son similares a la K_M de la clona silvestre que le dio origen; por ejemplo la quimera HS (humano-tiburón) se comporta como la clona humana, de forma contraria, la quimera SH se comporta como la clona silvestre de tiburón. Este efecto sugiere que el dominio N-terminal es capaz de interactuar de alguna forma con los sitios que translocan a los iones en el cotransportador. Con nuestras quimeras se encontró que sólo la afinidad por cloro se modificaba, lo que indica que sólo el sitio del dominio N-terminal de las quimeras TBB y BTT que interactúa con uno o los dos sitios de unión con cloro se conserva en CST y CSB1r. Sin embargo esto se toma con cautela dado que las cinéticas de cloro realizadas son en presencia de alto cloro (mM) como se explicó anteriormente.

El papel de las diferentes condiciones de tonicidad en ambas quimeras (BTT y TBB) sobre las cinéticas de captación de sodio, potasio y cloro tiene que ser analizado. Se predice que dicha afinidad se modifica, al menos para el caso del cloro.

Para determinar si la cinasa PKC está jugando un rol en estos parámetro, es necesario medir los cambios en cuanto al transporte variando las condiciones de osmolaridad y agregando activadores de PKC como TPA (éster de forbol), Forskolina (activador de PKA), o al adicionar inhibidores como Calphostin C (inhibidor de PKC), y medir la función. Adicionalmente, es necesario determinar si la cinasa CK2 también afecta la función de las quimeras y los cotransportadores silvestres en el ovocito (que se sabe que se expresa muy abundantemente en ovocitos de las etapas V-VI) [88] así como lo que ocurre con el balance Cinasas/Fosfatasas.

La respuesta a triclorometiazida en medio hipotónico se abate en la quimera BTT. A pesar de que la selectividad por los iones y por los diuréticos no cambia, cuando se compara BTT vs. CSTr en las mismas condiciones, la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de triclorometiazida no se reduce bajo condiciones de hipotonicidad celular. Se presenta una disminución en la sensibilidad a la inhibición. El mecanismo que explique por qué ocurre este fenómeno es difícil de imaginar. De acuerdo con el modelo de unión de iones en CST propuesto por A. Monroy et. al., el sitio de unión a la tiazida no es el mismo que el de unión a cloro o a sodio, proponen que éste puede estar en un sitio que comparten ambos iones. Si el dominio N-terminal funciona como una partícula de inactivación en medio hipotónico; es decir, que se establece interacción directa con los dominios donde se une o transporta el cloro, (ya que modifica su afinidad como se discute mas adelante), entonces dicha interacción provoca que el sitio de unión a la tiazida se pierda o por lo menos esté menos expuesto. La predicción es que esta interacción pueda ser modulada por PKC. Sin embargo es claro que la cinética de triclorometiazida no muestra un cambio significativo en la afinidad por este diurético en la quimera BTT comparada con CSTr. De igual forma la concentración de cloro utilizada este experimento también es muy alta (96 mM), muy por encima de la V_{\max} mostrada en la fig. 4G.

La quimera TBB disminuye su actividad en condiciones de hipotonicidad. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos expresando la quimera TBB y en condiciones de hipotonicidad muestran que el transporte decrece cerca del 95% con respecto de CSB1r (que sólo disminuye la captación ~30-40% en las mismas condiciones). En este experimento es claro que el dominio N-terminal de CST le confiere dicha sensibilidad, lo que es concomitante con el efecto observado en CSTr en las mismas condiciones. Aunque la sensibilidad se nota mucho menor en CSTr, cualitativamente el efecto puede ser equiparable. Por un lado, aunque se midieron dos sustratos diferentes y la captación no está en la misma escala, la proporción del decremento puede ser un tanto similar. La expresión de TBB y BTT, medida con el transporte siempre fue menor en todos los casos, por lo que una disminución en la tasa de transporte puede dar como resultado que la poca actividad observada, decaiga substancialmente, lo que podría explicar este resultado.

Mecanicamente, la observación puede bien obedecer a la hipótesis del estado de fosforilación de este dominio propuesto anteriormente.

Posible mecanismo de acción del dominio N-terminal. Una sugerencia para que el segmento N-terminal funcione como un regulador negativo sería si pensamos que éste funciona como un tapón. Cuando está

fosforilado en sitios específicos, esto causa que cambie su estado conformacional y exponga sitios hidrofóbicos que normalmente están escondidos, lo que conlleva un contacto físico con los segmentos TM hidrofóbicos, ya sea de manera ipsilateral o contralateral, esto es, que un monómero se "tapone" a sí mismo o lo haga sobre el otro monómero.

Para determinar esto propongo estudiar en un modelo *in silico* como primera aproximación, cómo cambia el índice de exposición (*buried index*), así como el arreglo de los segmentos en asa, α -hélice y β -plegados que conforman este dominio, antes y después de fosforilar los residuos de Ser. Experimentalmente esto se puede determinar haciendo mutaciones puntuales sobre los sitios de fosforilación y midiendo la función de las quimeras y por otro lado se pueden utilizar metodologías como FRET donde se determina la movilidad molecular de diversos segmentos de la proteína.

Una opción de regulación inexplorada en estos cotransportadores (y que es más aventurada de por sí) es que cuando ocurre un evento de señalización, por ejemplo, cuando disminuye la osmolaridad extracelular, la fosforilación de uno o más sitios del dominio N-terminal cambia la interacción con proteínas del citoesqueleto. Seguramente cuando aumenta el volumen del citosol, la tensión aplicada a filamentos intermedios y microtúbulos es mayor, y de alguna forma el "estiramiento" activa cinasas que transfieren fosfatos al cotransportador y a su vez esto provoque la distensión del dominio N-terminal, taponando el poro del cotransportador e impidiendo la entrada de más iones y por tanto de más agua a la célula.

Para evaluar si es necesario el contacto con otras proteínas, además del que se establece con PKC, son necesarios experimentos de coimmunoprecipitación en diferentes condiciones de osmolaridad. De esta forma se podría determinar si proteínas como la cinasa CK2 que tiene diversos sitios blanco de unión en este dominio, proteínas de anclaje a citoesqueleto como PDZ, entre otras, están interactuando con los cotransportadores.

Ventajas y desventajas del uso de quimeras. Una de las ventajas que tiene nuestro modelo con la construcción de quimeras entre CSTr y CSB1r con un grado de identidad relativamente bajo y con funciones ciertamente distintas, es que puede ser mucho más fácil la identificación de aminoácidos funcionales, que de otro modo se verían enmascarados, como es posible que ocurra en el caso de las quimeras hechas por el grupo de Forbush (usando las quimeras de CSB2 entre humano y tiburón con 74% de identidad en el mismo dominio). Con este razonamiento, creemos que el hecho de usar quimeras del segmento N-terminal tan poco conservado (~20% de identidad) fue un paso importante que inicia el análisis estructuro-funcional, que actualmente está siendo activamente investigado en el laboratorio. Por otro lado, aún cuando el grado de identidad global es reducido, claramente los sitios conservados entre ambas proteínas se localizan en posiciones conservadas. Además es claro que al menos el plegamiento, maduración, estabilidad y función general seguramente están intactos.

Una de las desventajas más grandes de este método es que se corre el peligro de que las interpretaciones basadas en estas quimeras se desvíen de la realidad y la significancia fisiológica sea poca, esto es, que se conviertan en un artefacto o "monstruos" como me gusta llamarlos. Esto sería posible si razonamos que desde el punto de vista estructural, el intercambio de dominios entre proteínas poco relacionadas, pueda provocar la adquisición de nuevas funciones (o la pérdida de otras) en los cotransportadores, que normalmente no ocurren en las proteínas silvestres. Sin embargo, como todo en investigación, bien merece la pena ser intentado. Una forma de defender este punto es que los parámetros de afinidad sólo cambiaron para el cloro en ambas quimeras, manteniéndose estables la afinidad por los otros iones; además, la selectividad no se modificó ni la sensibilidad a los diuréticos, por lo que es posible descartar que estos resultados se deban a un efecto artefactual.

Las perspectivas para este punto son claras: una es, por supuesto, continuar con el análisis estructural, para determinar el papel de los distintos dominios TM, donde se asume que se define el tipo y velocidad de transporte, todo esto mediante la construcción de nuevas quimeras de diferentes dominios TM.

Comentario final. Este trabajo es sólo el comienzo de un nuevo enfoque seguido en el laboratorio que es el estudio de la relación estructura-función de los cotransportadores renales de cationes acoplados a cloro. Se requieren más experimentos, como algunos propuestos en la discusión y otros, para dejar una historia más redondeada del rol que desempeña el segmento N-terminal sobre la función. Se propone un modelo mecanístico acerca de la posible función de este dominio, a reserva de ser verificado o refutado por nuevos datos experimentales. Como sea, la historia se sigue descubriendo y pronto habrá nuevos resultados que ayuden a comprender mejor la estructura y funcionamiento de estas proteínas, participes en funciones elementales para la vida.

APÉNDICES

Apéndice I

Digestión con enzimas de restricción.

1. En un tubo eppendorf estéril se agregan:

cDNA	3 μ L
Buffer 10X	2 μ L
Enzima	2 μ L
H ₂ O calidad biología molecular	1 μ L
TOTAL	20 μ L

2. La reacción se mezcla en vórtex y se centrifuga para bajarla (14000 rpm por 5 s).
3. Se incuba a 37 °C por 1-2 h.
4. Al finalizar la reacción se diluye con agua BM hasta un volumen de 100 μ L.
5. Se agrega 1 volumen de fenol:cloroformo (100 μ L).
6. Se agita en vórtex y se centrifuga 4 min a 4 °C a 14 000 rpm.
7. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo (~95 μ L).
8. Se adicionan la mitad del volumen de Acetato de Amonio más 3 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se vortexea.
9. Incubar la mezcla a -20 °C mínimo 10 min.
10. Centrifugar 20 min a 4 °C a 14 000 rpm.
11. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con alcohol etílico (75%) enfriado a -20 °C. Mezclar por inversión.
12. Centrifugar 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante por decantación.
13. Se recomienda liofilizar la muestra en un desecador al vacío.
14. El pellet puede resuspenderse en 10-15 μ L de H₂O BM. Disolver completamente el DNA mediante agitación en vórtex 4 o 5 veces cada 15 min.
15. Usar 1 o 2 μ L de la muestra para analizarlo por electroforesis en gel de agarosa. El resto de la muestra se almacena a -20 °C.

Apéndice II

Síntesis de mRNA in vitro (mMessage mMachine T7 de Ambion).

1. A 15 μL de cDNA linearizado (1-5 μg μL) se añaden:
 - 2 μL de buffer de transcripción.
 - 10 μL de la mezcla 2x de ribonucleótidos.
 - 1 μL de dGTP
 - 2 μL de la mezcla 10x con la transcriptasa de T7.
2. Después de vortexear ligeramente se incuba la mezcla a 37 °C durante 120 min.
3. Se adiciona 1 μL de DNAsa libre de RNAsas durante 15 min y se incuba la mezcla a 37 °C.
4. Se agregan 115 μL de H₂O (incluida en el kit) y 15 μL de Acetato de Amonio y se agita en el vórtex. (Vol. Final 150 μL).
5. Para aislar el RNA se agregan 150 μL de Fenol-Cloroformo, la mezcla es agitada en el vórtex y es centrifugada a 14000 rpm durante 4 min a 4°C.
6. El sobrenadante se separa y se adicionan 145 μL de isopropanol frío. Se mezcla por inversión. La mezcla debe permanecer a -20 °C al menos por 30 min o más si se quiere mayor rendimiento. Pasado este tiempo, nuevamente se centrifuga a la misma velocidad por 30 min a 4 °C.
7. Se descarta el sobrenadante y se lava con Etanol al 70% frío (1 mL). Se mezcla por inversión y se centrifuga una vez más por 10 min a 14000 rpm a 4 °C.
8. Se descarta el sobrenadante y se seca por centrifugación al vacío (aprox. 1 min).
9. El pellet se resuspende en 12 μL y se agita brevemente en el vórtex cada 15 o 30 min. Mantener en hielo entre cada intervalo.
10. Tomar 2 μL de la muestra resuspendida y diluir en 498 μL de H₂O calidad biología molecular. Agitar y leer en el espectrofotómetro a 260/280/310 nm para verificar concentración y pureza. (D.O. de 1 corresponde a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA/RNA).
11. Las muestras se mantienen a -70 °C hasta que se vayan a utilizar. Se recomienda alicuotar para evitar descongelamiento repetido que afecte la integridad de la muestra.

Apéndice III

Gel de agarosa para análisis de DNA

1. Se pesan 800-1000 mg de agarosa y se disuelve en 100 mL de buffer TAE 1X. La mezcla se calienta en microondas por 40-60 s o hasta disolver completamente la agarosa.
2. Al enfriar suficientemente como para ser tolerado por la mano se coloca en un molde adecuado y se coloca el peine para las muestras.
3. Cuando gelifique, se preparan la muestras a analizar como sigue:

cDNA	1-2 μ L
H ₂ O calidad biología molecular	6-7 μ L
Gel Loading Buffer 5X	2 μ L
Bromuro de Etidio	0.25 μ L
TOTAL	10 μ L

Apéndice IV

Geles desnaturalizantes de agarosa para RNA.

1. Se utilizan 300 mg de agarosa para preparar 30 mL de gel. La agarosa se disuelven en buffer MOPS 10X (3 mL), formaldehído al 37% (1.5 mL) y se afora a 30 mL. Se recomienda disolver la agarosa previamente con un poco de agua calentándola en microondas por 30-50 s. Esperar a que se enfríe suficientemente la agarosa hasta que pueda ser tolerada en la mano como para agregar el formaldehído y el MOPS.
2. Para correr el gel se preparan las muestras como se indica (mezcla por muestra):

RNA	1 μ L
Formamida	5 μ L
Formaldehído	2 μ L
MOPS 10X	1 μ L
Gel Loading Buffer	1 μ L
Bromuro de Etidio	0.25 μ L

3. El gel se somete a electroforesis a 80-100V durante 30-50 min.

Apéndice V

Extracción y preparación de Ovocitos de *X. laevis*.

1. Anestesia de una rana por inmersión en una solución isotónica (ND96) con Tricaína al 0.17% (ácido etilester-3-aminobenzóico). Aproximadamente 20 min.
2. Se realiza una incisión en alguno de los costados inferiores del vientre del animal de no más de 1 cm.
3. Se exponen los lóbulos ovocitarios y se van extrayendo con pinzas hasta que se exponga el ovario, en ese momento se recomienda suturar a la rana con seda (no. 5) incluyendo el peritoneo. Los ovocitos extraídos, cortando con tijeras los lóbulos, se colocan en una solución hipotónica s/Ca²⁺ procurando evitar su rompimiento.
4. Los ovocitos se incuban en una solución de ND96 s/Ca²⁺ adicionada con Colagenasa Tipo II (2 mg/mL) por 30 min en frío dos veces y agitando moderadamente. Lavar con solución limpia entre cada incubación.
5. Al finalizar la incubación se lavan tres veces por decantación con solución limpia. Aquellos ovocitos que todavía conservan la membrana folicular son defoliculados a mano con pinzas finas bajo un estereoscopio.
6. Los ovocitos defoliculados se conservan en medio isotónico de ND96 completo más 2.5 mM de piruvato de sodio y 5mg/100mL de gentamicina durante la noche. Se deben conservar en una incubadora a 18°C.

Inyección de ovocitos para expresión funcional.

1. Se inyectan 50 nL de cRNA de las clonas de interés a una concentración de 50 µg/□L (aprox. 25 ng/ovocito) con un microinyector y una pipeta para registro electrofisiológico. Se recomienda utilizar de 10 a 15 ovocitos por grupo.
2. Los ovocitos inyectados con los controles positivos, negativos (H₂O calidad biología molecular) y los experimentales se incuban en medio ND96 con piruvato de sodio (2.5 mM) y gentamicina (5 mg/mL) hasta por 96h. aproximadamente. Período de transcripción y traducción del cRNA.
3. Doce horas antes del experimento se debe deprimir de cloro el medio de incubación, sustituyendo éste por una solución isotónica con Isetionato de sodio.
4. A la solución ND96 con isetionato de sodio se agregan 2.5 mM de piruvato de sodio y 5 mg/100 mL de Gentamicina, pH 7.4.

Apéndice VI

Ensayos de captación de $^{86}\text{Rb}^+$.

1. Los ovocitos se incuban durante 60 min a 30 °C en una solución de preincubación sin cloro y sin potasio que contiene: 100 μM Hidroclorotiazida, 1mM de Ouabaina, 100 μM Amilorida, necesarios para inhibir la entrada de potasio y sodio por acción de la Na^+/K^+ -ATPasa y por la bomba H^+/Na^+ y canales de sodio, respectivamente. A menos que se indique, todas las soluciones fueron utilizadas aproximadamente a 210 mOsm kg^{-1} H_2O . En el caso de los ensayos de osmolaridad, ésta se cambio añadiendo 90 mM (isotónica) ó 190 mM (hipertónica) de sacarosa.
2. Para el ensayo funcional, los ovocitos son incubados 30 o 60 min a 37°C en una solución con cloro que contiene la misma concentración de las drogas mencionadas más 2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de $^{86}\text{Rb}^+$. Para la inhibición específica de CSB1, se utilizan 100 μM Bumetanida.
3. Después de la captación, los ovocitos son lavados 5 veces en solución de captación sin radioactividad a 4 °C, utilizando una pipeta pasteur de capilar ancho. En este punto se procura tomar la menor cantidad de solución posible entre cada lavado para quitar la mayor cantidad de radioactividad del medio.
4. Cada ovocito es depositado individualmente en viales que contienen 350 μL de SDS 10% y 1 mL de líquido de centelleo. Agitar ligeramente hasta asegurarse de que el ovocito se ha lisado completamente.
5. Cuantificación de la radioactividad se lleva a cabo utilizando el programa de lectura para $^{86}\text{Rb}^+$.

Apéndice VII

Ensayos de Captación de $^{22}\text{Na}^+$.

1. Los ovocitos se incuban durante 60 min a 30 °C en una solución de preincubación sin cloro que contiene: 100 μM de Hidroclorotiazida, 1mM de Ouabaina, 100 μM Amilorida y 100 μM Amilorida. A menos que se indique, todas las soluciones fueron utilizadas a 210 mOsm kg^{-1} H_2O .
2. Para el ensayo funcional, los ovocitos son incubados 30 o 60 min a 30 °C en una solución con cloro que contiene la misma concentración de las drogas mencionadas y 2 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{86}\text{Rb}^+$. Para la inhibición específica de CSB1, se utiliza 100 μM Bumetanida.
3. Después de la captación, los ovocitos son lavados 5 veces en solución de captación sin radioactividad a 4 °C, utilizando una pipeta pasteur de capilar ancho. En este punto se procura tomar la menor cantidad de solución posible entre cada lavado para quitar la mayor cantidad de radioactividad del medio.
4. Cada ovocito es depositado individualmente en viales que contienen 350 μL de SDS (10%) y 1 mL de líquido de centelleo. Agitar ligeramente hasta asegurarse de que el ovocito ha sido lisado completamente.
5. Cuantificación de la radioactividad se lleva a cabo utilizando el programa de lectura para $^{22}\text{Na}^+$.

Apéndice VIII

Soluciones de Incubación.

NOTA: Todas las soluciones se esterilizan por filtración con un filtro con poro \varnothing 0.45 μ M

Solución s/ Ca²⁺ para defoliculación con colagenasa tipo II (pH 7.4)*

Compuesto	mM	Sol. Stock	Volumen de stock para 1 L
NaCl	82.5	1 M	82.5 mL
KCl	2	0.1 M	2 mL
MgCl ₂	1	0.5 M	6 mL
HEPES/Tris	1	1 M	5 mL

*El pH se calibra con NaOH 1N.

Solución Ringer ND 96 (pH 7.4)*

Compuesto	mM	Sol. Stock	Volumen de stock para 1 L
NaCl	96	1 M	96 mL
KCl	2	1 M	2 mL
CaCl ₂	1.8	0.1 M	18 mL
MgCl ₂	1	0.3 M	3.3 mL
HEPES/Tris	5	1 M	5 mL

*El pH se calibra con NaOH 1N. La osmolaridad alcanza a ser de \sim 210 mOsm kg⁻¹ H₂O.

Solución de preincubación de Isetionato de Sodio s/Cl (pH 7.4)*

Compuesto	mM	Sol. Stock	Volumen de stock para 1 L
Isetionato de Na ⁺	96	-	14.2 g
Gluconato de K ⁺	2	1 M	2 mL
Gluconato de Ca ²⁺	1.8	0.1 M	18 mL
Gluconato de Mg ²⁺	1	0.5 M	2 mL
HEPES/Tris	5	1 M	5 mL

*El pH se calibra con NaOH 1N. *Esta solución se usa 12 h previas al experimento.*

Apéndice IX

Soluciones usadas para los experimentos de CST/NCC y BTT.

NOTA: En todos los casos, las soluciones utilizadas no contienen K^+ , a menos que se indique.

Solución de Precaptación para $^{22}Na^+$ (pH 7.4)*

Compuesto	mM	Sol. Stock	Volumen de stock para 1 L
Gluconato de Na^+	96	1 M	96 mL
Gluconato de Ca^{2+}	6	0.1 M	60 mL
Gluconato de Mg^{2+}	1	0.5 M	2 mL
HEPES/Tris	5	1 M	5 mL
Ouabaína	1	22 mg/300 μ L DMSO	
Bumetanida	0.1	1.09 mg/300 μ L DMSO	Se usan 10 μ L por mL de solución
Amilorida	0.1	2.66 mg/100 μ L DMSO	
Tiazida [†]	$10 - 10^{-4}$	1 mg/300 μ L DMSO	

*El pH se calibra usando H_2SO_2 1N. [†]Usualmente se usa 0.1 mM, aunque para las curvas de inhibición, la concentración y tipo de tiazida es variable. Se muestra solución stock de hidrocortiazida.

Solución de Captación para $^{22}Na^+$ (pH 7.4)

Compuesto	mM	Sol. Stock	Volumen de stock para 1 L
$NaCl^{\dagger}$	65	1 M	65 mL
NMDG- Cl^{\dagger}	30	1 M	30 mL
$CaCl^2$	1.8	0.1 M	18 mL
$MgCl^2$	1	0.3 M	3.3 mL
HEPES/Tris	5	1 M	5 mL
Ouabaína	1	22 mg/300 μ L DMSO	
Bumetanida	0.1	1.09 mg/300 μ L DMSO	Se usan 10 μ L por mL de solución
Amilorida	0.1	2.66 mg/100 μ L DMSO	
Tiazida [‡]	$10 - 10^{-4}$	1 mg/300 μ L DMSO	

*El pH se calibra usando H_2SO_2 1N. [†]La relación de la concentración de $NaCl$ y de NMDG- Cl puede variar en los experimentos de cinéticas de Na^+ . En el caso de las cinéticas de Cl^- , se usa una solución de gluconatos y únicamente cambia la $[NaCl]$. En todos los casos la tonicidad del medio era ~ 160 mOsm kg^{-1} H_2O a menos que se especifique lo contrario. [‡]La concentración y tipo de tiazida puede variar dependiendo del experimento, sobre todo en aquéllos de las curvas de inhibición; se muestra la concentración usada en la mayoría de los experimentos. En condiciones de sustitución de Cl^- extracelular se utiliza la misma solución de precaptación sin cloro.

Concentración de Sacarosa en soluciones Iso- e Hipertónicas*

Solución	mOsm	Sacarosa (mM)	Volumen de un stock 1M
Hipotónica	160	-	-
Isotónica	210	45 mM	45 mL
Hipertónica	260	90 mM	90 mL

*La sacarosa al no poseer cargas netas (no polar) no influye en la fuerza iónica de las soluciones. Todas las soluciones donde medimos el efecto de la osmolaridad, tienen 65 mM de $NaCl$ y 5 mM de KCl (~ 160 mOsm kg^{-1} H_2O).

Apéndice X

Soluciones utilizadas para los experimentos de CSB1/NKCC2 y TBB.

Solución de Precaptación para $^{86}\text{Rb}^+$ (pH 7.4)*

Compuesto	mM	Sol. Stock	Volumen de stock para 1 L
Gluconato de Na^+	65	1 M	65 mL
Gluconato de Ca^{2+}	1.8	0.1 M	18 mL
Gluconato de Mg^{2+}	1	0.5 M	2 mL
HEPES/Tris	5	1 M	5 mL
Ouabaína	1	22 mg/300 μL DMSO	
Bumetanida [†]	10 – 10 ⁻⁴	1.09 mg/300 μL DMSO	Se usan 10 μL por mL de solución
Amilorida	0.1	2.66 mg/100 μL DMSO	
Tiazida	0.1	1 mg/300 μL DMSO	

*El pH se calibra usando NaOH 1N. [†]Usualmente se usa 0.1 mM, aunque para las curvas de inhibición, la concentración de bumetanida es variable. Se muestra la concentración inicial de la solución stock.

Solución de Captación para $^{86}\text{Rb}^+$ (pH 7.4)

Compuesto	mM	Sol. Stock	Volumen de stock para 1 L
NaCl^{\dagger}	96	1 M	96 mL
KCl^{\dagger}	10	1 M	10 mL
CaCl_2	1.8	0.1 M	18 mL
MgCl_2	1	0.3 M	3.3 mL
HEPES/Tris	5	1 M	5 mL
Ouabaína	1	22 mg/300 μL DMSO	
Bumetanida [‡]	0.1	1.09 mg/300 μL DMSO	Se usan 10 μL por mL de solución
Amilorida	0.1	2.66 mg/100 μL DMSO	
Tiazida	10 – 10 ⁻⁴	1 mg/300 μL DMSO	

*El pH se calibra usando H_2SO_4 1N. [†]En los experimentos donde se mide la cinética de Na^+ y K^+ , la concentración de NaCl y KCl es variable, por tanto se utilizó *N*-metil-D-glucamina como sustituto de la concentración faltante de ambos cationes (siempre en condiciones de hipotonicidad). Al mismo tiempo, siempre que se cambia la concentración de uno de los iones, se fija la de los otros (Na^+ 96 mM, K^+ 10 mM y Cl^- 96 mM). En el caso de las curvas de Cl^- , siempre se usa una solución de gluconatos y se usa NaCl para cambiar la concentración de cloro. [‡]Usualmente se usa 0.1 mM, aunque para las curvas de inhibición, la concentración de bumetanida es variable. Se muestra la concentración inicial de la solución stock.

Concentración de Sacarosa en soluciones Iso- e Hipertónicas*

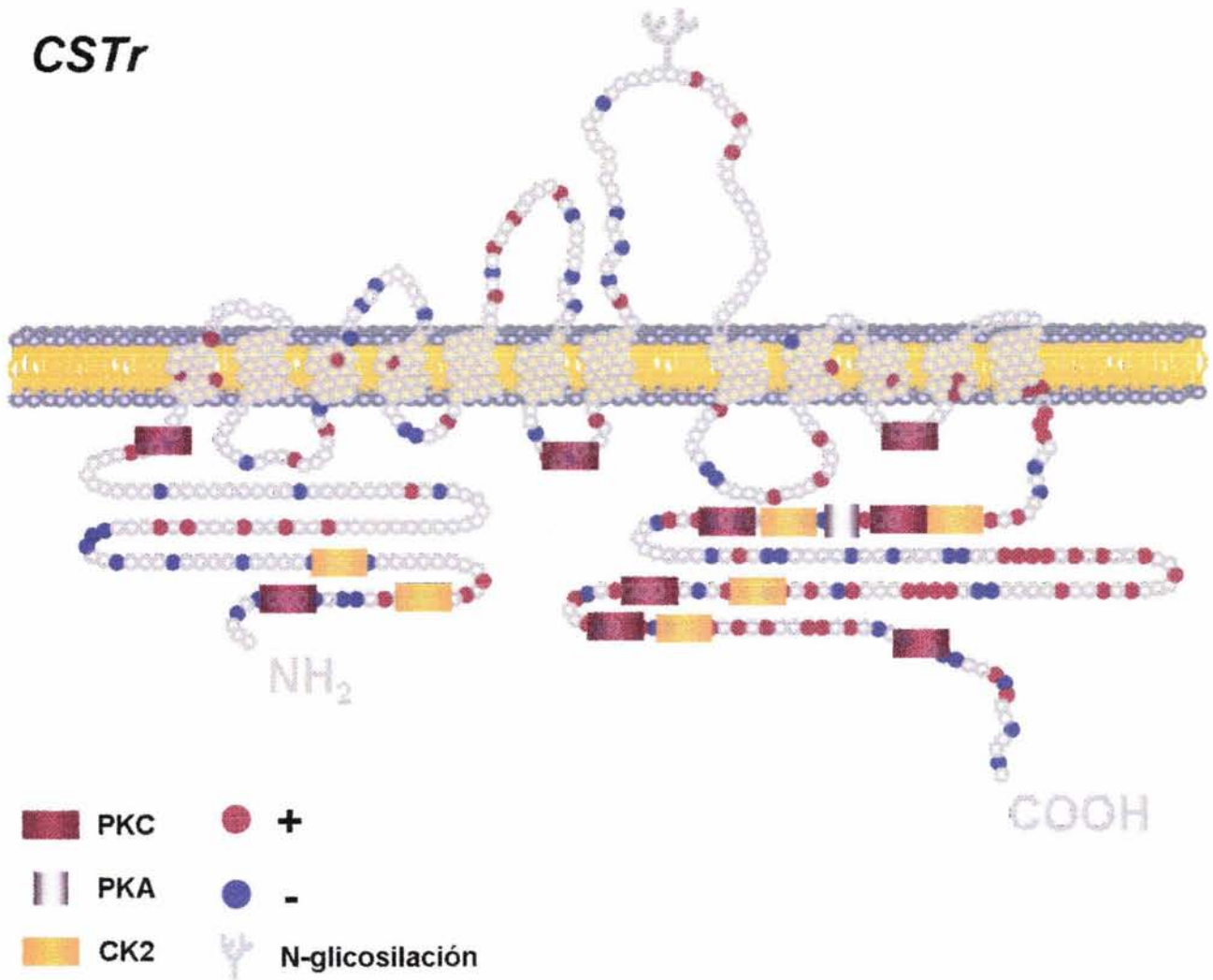
Solución	mOsm	Sacarosa (mM)	Volumen de un stock 1M
Hipotónica	160	-	-
Isotónica	210	45 mM	45 mL
Hipertónica	260	90 mM	90 mL

*La sacarosa al no poseer cargas netas (no polar) no influye en la fuerza iónica de las soluciones. Todas las soluciones donde medimos el efecto de la osmolaridad, tienen 65 mM de NaCl y 5 mM de KCl (~160 mOsm $\text{kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$).

Apéndice XI

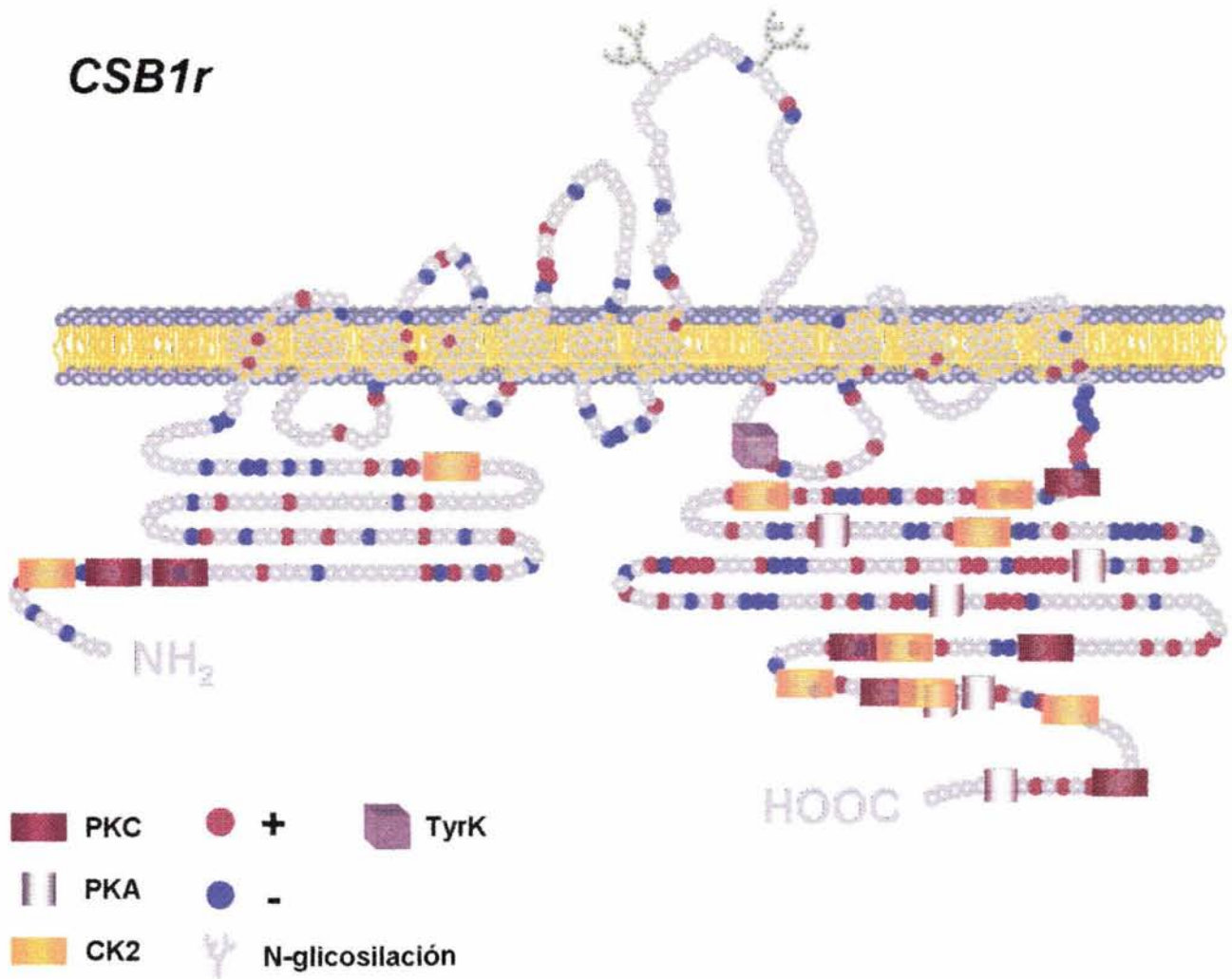
Esquema General de los Sitios de Regulación del Cotransportador $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (CST/NCC)

CSTr



Apéndice XII

Esquema General de los Sitios de Regulación del Cotransportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ (NKCC2/CSB1)



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Apéndice XIII

Secuencias de los oligonucleótidos utilizados (5'- 3').

CSTr (A)

S- CGGAATTCCTCCGGAGCCATA

CSTr (B)

A- TGTTGTGAAGTTTTTCGGCTGGG

CSTr (C)

S- TTCGGCTGGGTCAAGGGAGTG

CSTr (D)

A- CCATCGATGCCTCTCCAGTCGGG

CSB1r (A)

S- CGGAATTCAGAAAGGCGGCT

CSB1r (B)

A- CCCAGCCGAAAACTTCACAACA

CSB1r (C)

S- GGATGGGTGAAAGGTGTGCTGGTG

CSB1r (D)

A- ACGACAGTGTCGTTTCATGCTCCCAGT

CSBrNsi

S- GGTGTGCTGGTGAGATGCATGCTGAACATC

A- GATGTTTCAGCATGCATCTCACCAGCACACC

BIBLIOGRAFÍA

1. Gamba, G., *Electroneutral chloride-coupled co-transporters*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000. **9**(5): p. 535-40.
2. Greger, R., *Physiology of renal sodium transport*. *Am J Med Sci*, 2000. **319**(1): p. 51-62.
3. Hebert, S.C., D.B. Mount, and G. Gamba, *Molecular physiology of cation-coupled Cl(-) cotransport: the SLC12 family*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 580-93.
4. 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*, 1994. **269**(26): p. 17713-22.
5. Delpire, E., et al., *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*, 1994. **269**(41): p. 25677-83.
6. Gamba, G., et al., *Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(7): p. 2749-53.
7. Plata, C., et al., *Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL II. Functional characterization and activation by cAMP*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(3 Pt 2): p. F359-66.
8. Simon, D.B., et al., *Barter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2*. *Nat Genet*, 1996. **13**(2): p. 183-8.
9. Moreno, G., et al., *Electroneutral Na-coupled cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism*. *Hypertension*, 1998. **31**(4): p. 1002-6.
10. Bairoch, A., P. Bucher, and K. Hofmann, *The PROSITE database, its status in 1997*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(1): p. 217-21.
11. Simon, D.B., et al., *Gitelman's variant of Barter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter*. *Nat Genet*, 1996. **12**(1): p. 24-30.
12. Isenring, P. and B. Forbush, *Ion transport and ligand binding by the Na-K-Cl cotransporter, structure-function studies*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2001. **130**(3): p. 487-97.
13. Metzger, T.G. and D.M. Ferguson, *On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity*. *FEBS Lett*, 1995. **375**(1-2): p. 1-4.
14. Arbuckle, M.I., et al., *Structure-function analysis of liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters: expression of chimeric transporters in Xenopus oocytes suggests an important role for putative transmembrane helix 7 in determining substrate selectivity*. *Biochemistry*, 1996. **35**(51): p. 16519-27.
15. Unson, C.G., et al., *Roles of specific extracellular domains of the glucagon receptor in ligand binding and signaling*. *Biochemistry*, 2002. **41**(39): p. 11795-803.
16. Greger, R. and U. Windhorst, *Comprehensive human physiology : from cellular mechanisms to integration*. 1996, Berlin ; New York: Springer. 2 v. (xxiv, 2527).
17. Mount, D.B., et al., *The electroneutral cation-chloride cotransporters*. *J Exp Biol*, 1998. **201 (Pt 14)**: p. 2091-102.

18. Hille, B., *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. 1992, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. xiii, 607.
19. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. 1994, New York: Garland Pub. xliii, 1294, [67].
20. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. 10th ed. 2000, Philadelphia: Saunders. xxxii, 1064.
21. Kim, G.H., et al., *Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(1 Pt 2): p. F96-F103.
22. Ecelbarger, C.A., et al., *Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin*. *Exp Neurol*, 2001. **171**(2): p. 227-34.
23. Estevez, R., et al., *Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion*. *Nature*, 2001. **414**(6863): p. 558-61.
24. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 2000, Worth Publishers: New York.
25. Hebert, S.C. and G. Gamba, *Molecular cloning of the renal diuretic-sensitive electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporters*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1995. **107**(1): p. 76-80.
26. Hebert, S.C. and G. Gamba, *Molecular cloning and characterization of the renal diuretic-sensitive electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporters*. *Clin Investig*, 1994. **72**(9): p. 692-4.
27. Payne, J.A., T.J. Stevenson, and L.F. Donaldson, *Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(27): p. 16245-52.
28. Hebert, S.C., G. Gamba, and M. Kaplan, *The electroneutral Na⁽⁺⁾-(K⁺)-Cl⁻ cotransport family*. *Kidney Int*, 1996. **49**(6): p. 1638-41.
29. Caron, L., et al., *Cloning and functional characterization of a cation-Cl⁻ cotransporter-interacting protein*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(41): p. 32027-36.
30. Carrasco, N., *Minireview Volume on Na⁺-Coupled Cotransporters: A Brief Editorial Overview*. *J Bioenerg Biomembr*, 1998. **30**(2): p. 149-150.
31. Williams, K.A., et al., *Projection structure of NhaA, a secondary transporter from Escherichia coli, at 4.0 Å resolution*. *Embo J*, 1999. **18**(13): p. 3558-63.
32. Williams, K.A., *Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA*. *Nature*, 2000. **403**(6765): p. 112-5.
33. Galili, L., et al., *Trans membrane domain IV is involved in ion transport activity and pH regulation of the NhaA-Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter of Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2002. **41**(2): p. 609-17.
34. Galili, L., et al., *Unraveling Functional and Structural Interactions between Transmembrane Domains IV and XI of NhaA Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ Antiporter of Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(22): p. 23104-13.
35. Noel, L.E. and C.B. Newgard, *Structural domains that contribute to substrate specificity in facilitated glucose transporters are distinct from those involved in kinetic function: studies with GLUT-1/GLUT-2 chimeras*. *Biochemistry*, 1997. **36**(18): p. 5465-75.
36. Levy, O., A. De la Vieja, and N. Carrasco, *The Na⁽⁺⁾/I⁻ symporter (NIS): recent advances*. *J Bioenerg Biomembr*, 1998. **30**(2): p. 195-206.

37. Levy, O., et al., *Identification of a structural requirement for thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism*. FEBS Lett, 1998. **429**(1): p. 36-40.
38. Starremans, P.G., et al., *Dimeric architecture of the human bumetanide-sensitive Na-K-Cl Co-transporter*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(12): p. 3039-46.
39. Lytle, C., T.J. McManus, and M. Haas, *A model of Na-K-2Cl cotransport based on ordered ion binding and glide symmetry*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 1): p. C299-309.
40. Feit, P.W., *Bumetanide--the way to its chemical structure*. J Clin Pharmacol, 1981. **21**(11-12 Pt 2): p. 531-6.
41. Beaumont, K., D.A. Vaughn, and D.D. Fanestil, *Thiazide diuretic drug receptors in rat kidney: identification with [³H]metolazone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(7): p. 2311-4.
42. Gerelsaikhan, T. and R.J. Turner, *Transmembrane topology of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 studied by in vitro translation*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40471-7.
43. Mastroianni, N., et al., *Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3)*. Genomics, 1996. **35**(3): p. 486-93.
44. Sun, A., et al., *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, 1991. **120**(1): p. 83-94.
45. Meade, P., et al., *cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(6): p. F1145-54.
46. Plata, C., V. Rubio, and G. Gamba, *Protein kinase C activation reduces the function of the Na(+):K(+):2Cl(-) cotransporter in Xenopus laevis oocytes*. Arch Med Res, 2000. **31**(1): p. 21-7.
47. Mount, D.B., et al., *Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization*. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 2): p. F347-58.
48. Gimenez, I., P. Isenring, and B. Forbush, *Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8767-70.
49. Plata, C., et al., *Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11004-12.
50. Kaplan, M.R., et al., *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, 1996. **98**(3): p. 723-30.
51. 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, 1994. **91**(6): p. 2201-5.
52. Ramasamy, R., et al., *Protection of ischemic myocardium in diabetics by inhibition of electroneutral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(2): p. H515-22.
53. Yan, Y., et al., *Inhibition of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage*. Brain Res, 2003. **961**(1): p. 22-31.
54. Jang, I.S., H.J. Jeong, and N. Akaike, *Contribution of the Na-K-Cl cotransporter on GABA(A) receptor-mediated presynaptic depolarization in excitatory nerve terminals*. J Neurosci, 2001. **21**(16): p. 5962-72.

55. Payne, J.A., et al., *Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17977-85.
56. Isenring, P. and B. Forbush, 3rd, *Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporter. Importance of transmembrane domains*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24556-62.
57. Isenring, P., et al., *Mutagenic mapping of the Na-K-Cl cotransporter for domains involved in ion transport and bumetanide binding*. J Gen Physiol, 1998. **112**(5): p. 549-58.
58. Isenring, P., S.C. Jacoby, and B. Forbush, 3rd, *The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 7179-84.
59. Isenring, P., et al., *Comparison of Na-K-Cl cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na-L-Cl cotransporter*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11295-301.
60. Gagnon, E., et al., *Functional comparison of renal Na-K-Cl cotransporters between distant species*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): p. C365-70.
61. Starremans, P.G., et al., *Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(6): p. 1419-26.
62. Vargas-Poussou, R., et al., *Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for antenatal Bartter syndrome*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(6): p. 1332-40.
63. Kurtz, C.L., et al., *A common NKCC2 mutation in Costa Rican Bartter's syndrome patients: evidence for a founder effect*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(11): p. 1706-11.
64. Bartter, F.C., et al., *Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome*. 1962. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(3): p. 516-28.
65. Pollak, M.R., et al., *Gitelman's syndrome (Bartter's variant) maps to the thiazide-sensitive cotransporter gene locus on chromosome 16q13 in a large kindred*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(10): p. 2244-8.
66. de Jong, J.C., et al., *The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24302-7.
67. Verlander, J.W., et al., *Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1661-9.
68. Turban, S., X.Y. Wang, and M.A. Knepper, *Regulation of NHE3, NKCC2, and NCC abundance in kidney during aldosterone escape phenomenon: role of NO*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(5): p. F843-51.
69. Wang, X.Y., et al., *The renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as mediator of the aldosterone-escape phenomenon*. J Clin Invest, 2001. **108**(2): p. 215-22.
70. Abdallah, J.G., et al., *Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive Na(+)/Cl(-)-cotransporter abundance: role of aldosterone*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(7): p. 1335-41.
71. Chen, Z., et al., *Adrenocortical steroids increase renal thiazide diuretic receptor density and response*. J Am Soc Nephrol, 1994. **5**(6): p. 1361-8.
72. Nielsen, J., et al., *Sodium transporter abundance profiling in kidney: effect of spironolactone*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(5): p. F923-33.

73. Fera, I., et al., *Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity*. *Kidney Int*, 2003. **63**(1): p. 43-52.
74. Monroy, A., et al., *Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **279**(1): p. F161-9.
75. Hoover, R.S., et al., *N-Glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na(+):Cl(-) cotransporter*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(2): p. 271-82.
76. Vazquez, N., et al., *Functional differences between flounder and rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **282**(4): p. F599-607.
77. Wyse, B., N. Ali, and D.H. Ellison, *Interaction with *grp58* increases activity of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **282**(3): p. F424-30.
78. Lemmink, H.H., et al., *Novel mutations in the thiazide-sensitive NaCl cotransporter gene in patients with Gitelman syndrome with predominant localization to the C-terminal domain*. *Kidney Int*, 1998. **54**(3): p. 720-30.
79. Delpire, E. and D.B. Mount, *Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 803-43.
80. Lin, S.H., et al., *Intrafamilial phenotype variability in patients with Gitelman syndrome having the same mutations in their thiazide-sensitive sodium/chloride cotransporter*. *Am J Kidney Dis*, 2004. **43**(2): p. 304-12.
81. Moreno, E., et al., *A single nucleotide polymorphism alters the activity of the renal Na+:Cl- cotransporter and reveals a role for transmembrane segment 4 in chloride and thiazide affinity*. *J Biol Chem*, 2004.
82. Horton, R.M., et al., *Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension*. *Gene*, 1989. **77**(1): p. 61-8.
83. Mount, D.B., et al., *Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16355-62.
84. Mercado, A., et al., *Functional comparison of the K+-Cl- cotransporters KCC1 and KCC4*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(39): p. 30326-34.
85. Mercado, A., et al., *Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of *Xenopus laevis* oocytes*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **281**(2): p. C670-80.
86. Tran, J.M., M.A. Farrell, and D.D. Fanestil, *Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(4 Pt 2): p. F908-15.
87. Darman, R.B. and B. Forbush, *A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37542-50.
88. Wilhelm, V., et al., *Expression of the subunits of protein kinase CK2 during oogenesis in *Xenopus laevis**. *Eur J Biochem*, 1995. **232**(2): p. 671-6.