



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE QUÍMICA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**“REGULACIÓN DEL COTRANSPORTADOR DE $K^+ : Cl^-$ POR LA
CINASA WNK3”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
PRESENTA**

PAOLA DE LOS HEROS RIOS

México D. F.

2008



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.

“REGULACIÓN DEL COTRANSPORTADOR DE K⁺:Cl⁻ POR LA CINASA WNK3”

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gerardo Gamba Ayala, en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, localizada en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ).

El comité tutorial encargado de asesorar el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra Herminia Pasantes Ordoñez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Gerardo Gamba Ayala	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval durante la realización del presente estudio.

Se reconoce la asesoría técnica de la Q.F.B. Norma Vázquez en el desarrollo de la parte experimental.

El proyecto de doctorado fue apoyado por el proyecto CONACYT 59992.

Durante mis estudios de doctorado fui apoyada con una beca otorgada por el CONACYT con número de registro 167258 y por la fundación TELMEX.

El jurado de examen para obtención del grado de Doctorado estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Herminia Pasantes Ordóñez	IFC, UNAM
VOCAL	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	FQ, UNAM
SECRETARIO	Dr. José de Jesús García Valdés	FQ, UNAM
SUPLENTE	Dra. Laura Escobar Pérez	FM, UNAM
SUPLENTE	Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval	IIB, UNAM

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Propiedades del cotransportador de K^+Cl^-	6
Aspectos generales, biología molecular y propiedades funcionales de las isoformas del transportador de K-Cl	9
Regulación del cotransportador de K^+Cl^-	20
Las cinasas WNK	22
Regulación de los CEN a través de SPAK	27
Objetivos	31
Hipótesis	32
Metodología	33
Resultados	36
Artículos publicados	37
Papel de la interacción de la cinasa SPAK con WNK3, sobre la actividad de los KCCs	38
Discusión	44
Regulación de los cotransportadores electroneutros por la cinasa WNK3	44
Regulación de los cotransportadores de K-Cl ⁻ por la cinasa WNK3 a través de SPAK	49
Conclusiones	56
Otros artículos publicados	57
Referencias	58

RESUMEN

La familia de los cotransportadores electroneutros cloro/catión (CEN), está compuesta por dos ramas principales: una, la de los transportadores de K-Cl (KCCs), formada por cuatro miembros: KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4 y otra, la de los que cotransportan Na-(K)-Cl (NKCCs), compuesta por tres miembros: NCC, NKCC1 y NKCC2. Los KCCs, regulan la salida de Cl de la célula, se inhiben por fosforilación y se activan por defosforilación. Los NKCCs, regulan la entrada de Cl a la célula y se activan por fosforilación. Estos cotransportadores se encuentran mutados en ciertas enfermedades en el humano, son el blanco de diuréticos y están involucrados de manera general en la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y la presión sanguínea. Se ha propuesto que su actividad es regulada a través de una vía de cinasas y fosfatasa; sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurre aún no se conocen. Las cinasas WNK, una familia de cuatro serina-treonina cinasas (WNK1, WNK2, WNK3 y WNK4), han surgido recientemente como proteínas clave en la regulación de los CEN. Las mutaciones en WNK1 y 4, ocasionan una enfermedad hereditaria conocida como pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII), que presenta hipertensión e hipercalemia. WNK4 regula a NCC y a NKCC1, siendo estos efectos, algunos dependientes de su actividad cinasa y otros no, mientras que WNK1 modula los efectos de WNK4 sobre el NCC. Se demostró también que WNK1 activa a las proteínas cinasas SPAK y OSR1, las cuales regulan la activación de diversos canales iónicos epiteliales, incluyendo a los CEN. En el presente estudio nos propusimos analizar el efecto de la WNK3 sobre la actividad funcional de los cotransportadores electroneutros. Nuestros resultados muestran que WNK3 es un regulador de la función de todos los miembros de esta familia: WNK3 *activa* a los cotransportadores de Na-(K)-Cl e *inhibe* a los cotransportadores de K-Cl. Interesantemente, cuando la actividad cinasa de WNK3 es eliminada mediante la mutación D294A, el efecto es completamente revertido. WNK3 D294A *inhibe* a NCC, NKCC1 y NKCC2, y *activa* a los KCCs. La presencia de los inhibidores de las proteínas fosfatasa Caliculina A y Ciclosporina A, previene la activación de los transportadores de K^+Cl^- por WNK3-DA. De manera tal que WNK3-DA parece inducir la defosforilación de los KCCs, a través de las proteínas fosfatasa PP1 y PP2B, mientras que la activación de NKCC1 y NKCC2 por WNK3 es resultado de un aumento en la fosforilación de ambos cotransportadores, la cual se reduce en forma significativa en presencia de WNK3-DA. El análisis de inmunolocalización muestra que WNK3 se co-expresa con los CEN en diversos tejidos. El hecho de que WNK3 regule transportadores que se expresan en la misma célula, en la que funcionan en forma coordinada para determinar la concentración de Cl intracelular sugiere que WNK3 puede ser parte importante del sistema de integración y/o regulación de estos cotransportadores. El papel de SPAK en esta regulación se analizó también en el presente estudio y encontramos que esta cinasa es crucial en la vía de señalización que coordina recíprocamente a los CEN. Nuestros datos sugieren que las WNKs y SPAK, forman parte de los mecanismos de fosforilación y defosforilación que regulan las actividades de los CEN durante la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y la regulación de la presión arterial.

ABSTRACT

The electroneutral cation/Cl⁻ cotransporter family (SLC12A) encompasses two branches: the K-Cl cotransporter branch, composed of four members (KCC1, KCC2, KCC3, and KCC4), and the Na-(K)-Cl cotransporter branch, composed of three members (NCC, NKCC1, and NKCC2). K-Cl cotransporters mediate Cl⁻ efflux, are inhibited by phosphorylation, and are activated by dephosphorylation. Na-(K)-Cl cotransporters mediate Cl⁻ influx and are activated by phosphorylation. These cotransporters are mutated in human disease, are targets of diuretics and are collectively involved in the regulation of cell volume, neuronal excitability, and blood pressure. A single kinase/phosphatase pathway is thought to coordinate the activities of these cotransporters; however, the mechanisms involved are as yet unknown. The serine-threonine WNK kinases (WNK, with no lysine = K): WNK1, WNK2, WNK3 and WNK4, are emerging as key regulatory proteins for the SLC12A family. Mutations in WNK1 and WNK4 cause PHAII, a Mendelian disease that features hypertension and hyperkalemia. WNK4 has been shown to be a regulator of NCC and NKCC1; some of these effects are kinase-dependent, whereas others are independent of WNK4's catalytic activity. Furthermore, WNK1 modulates the effect of WNK4 on NCC. WNK1 has also been found to activate the protein kinases SPAK or OSR1, which regulate activation of various epithelial ion channels including the SLC12A family. The purpose of the present study was to analyze the effect of WNK3 upon the activity of the electroneutral cation/Cl⁻ cotransporters. Our results show that this kinase regulates all the members of the SLC12A family: WNK3 activates the Na-(K)-Cl cotransporter branch and inhibits the K-Cl cotransporters. Interestingly when kinase activity was eliminated by mutation D294A, its effect was completely reverted: WNK3 D294A inhibits NCC, NKCC1 and NKCC2 function and activates the KCCs. Presence of protein phosphatases inhibitors Calyculine A and Cyclosporine A, prevents activation of KCCs by WNK3-DA. This suggests that WNK3-DA induces dephosphorylation of these cotransporters through protein phosphatases PP1 and PP2B and that phosphorylation by WNK3 activates NKCC1 and NKCC2. WNK3 is coexpressed in different tissues with several cation/Cl⁻ cotransporters and regulates their activity. These data suggests WNKs are crucial components of the kinase/phosphatase signaling pathway that coordinately regulates the Cl⁻ influx and efflux branches of the SLC12A cotransporter family and so their activities. We also evaluated if SPAK kinase was involved on WNK3 regulation of the cotransporters. We found that this kinase is crucial on the signaling pathway that reciprocally coordinates the SLC12A family. Our data suggests that WNKs and SPAK kinases are part of the dephosphorylation/phosphorylation events that regulate electroneutral cation/Cl⁻ cotransporters during cellular volume regulation, neuronal excitability and arterial pressure regulation.

INTRODUCCIÓN

Las células eucariontes están provistas con mecanismos de transporte a través de la membrana, que les permiten responder de manera efectiva a cambios osmóticos en el ambiente y mantener así el equilibrio químico del agua. El equilibrio entre el volumen de las células y la concentración de su medio interno, resulta crítico para el desarrollo de su metabolismo, su integración dentro de los órganos y sistemas, así como en la supervivencia del organismo en general. (85). Principalmente la concentración de iones dentro y fuera de la célula establece la osmolaridad extra e intracelular, de manera tal que el transporte iónico a través de la membrana celular, constituye el medio más rápido y eficiente para alcanzar el equilibrio osmótico. (81). El mantenimiento de esta homeostasis iónica intra y extracelular, involucra funciones que van desde la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y funciones que implican la respuesta coordinada de una variedad de células, hasta la regulación de la presión arterial. Para realizar estos procesos, la célula lleva a cabo el movimiento de iones como el sodio (Na^+), el potasio (K^+) y el cloro (Cl^-) a través de diversas proteínas transportadoras, poros, canales y bombas (81), así como proteínas de uniones intercelulares, cuyos mecanismos efectores han sido en general identificados y estudiados a nivel fisiológico, molecular y genómico.

El cotransportador de potasio-cloro o KCC regula el movimiento acoplado de K^+ y Cl^- a través de la membrana plasmática de células animales y contribuye a mantener la homeostasis celular tanto del agua, como de los electrolitos (143). El KCC se descubrió a principios de los años 80 y se describió por primera vez en eritrocitos de oveja (86) como una vía de eflujo de K^+ activada por aumento del volumen celular y por la presencia del compuesto *N*-etilmaleimida (NEM) que modifica los grupos tiol del transportador. Esta proteína pertenece a la familia de los cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloro (CEN), conocida como SLCA12 en la denominación HUGO (*Human Genome Organization*) (42). Esta familia está compuesta por siete genes que codifican para transportadores de membrana de los cuales tres utilizan sodio (con o sin potasio) como el catión acoplado al transporte de cloro, mientras que los otros cuatro cotransportan cloro junto con potasio. La figura 1 muestra el árbol filogenético de esta familia en donde se observa que el grado de identidad entre las dos ramas principales es de 25%. De los que utilizan sodio, un gen codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (NCC) (41), mientras que dos genes codifican para cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensibles al diurético de asa bumetanida (NKCC1 y NKCC2). El NCC se localiza en humano en el cromosoma 16 y se expresa únicamente en la membrana apical del túbulo contorneado distal en el riñón (TD). El NKCC1 se localiza en el cromosoma 15 y se expresa en la membrana basolateral de múltiples tipos celulares y tisulares, así como en células no epiteliales (158). El NKCC2 se localiza en el cromosoma 5 y se expresa exclusivamente en la membrana apical del asa ascendente de Henle en el riñón (41). Los miembros de la familia que utilizan potasio son todos cotransportadores de

K^+Cl^- , conocidos como KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4. En el humano, los genes que corresponden a las isoformas KCC1, 3 y 4 se localizan en los cromosomas 16, 15 y 5 respectivamente y su expresión es ubicua (48; 109). Mientras que el cuarto gen se ubica en el cromosoma 20 y codifica para la isoforma KCC2 que se localiza exclusivamente en las neuronas (114).

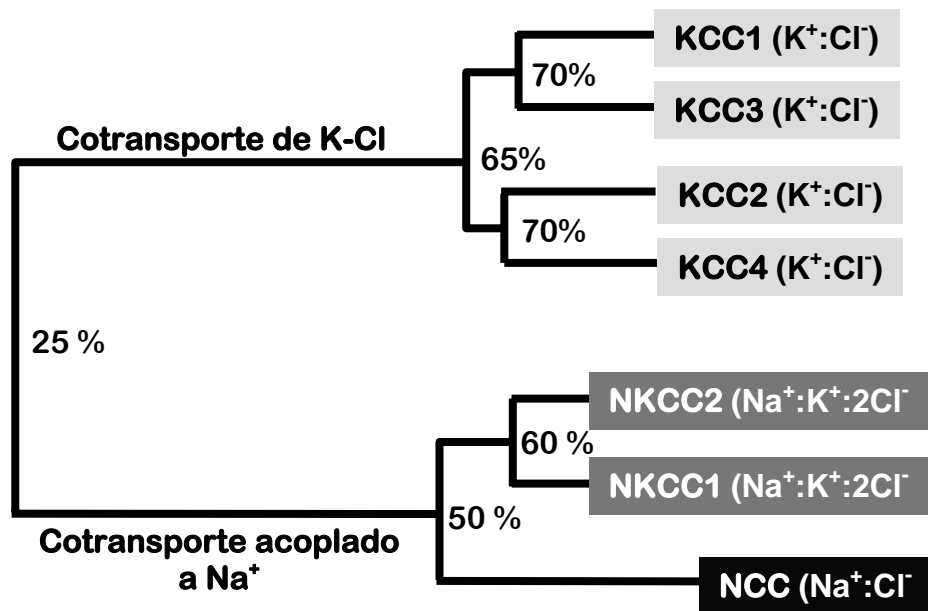


Figura 1. Árbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros de cationes cloro. Existen dos subfamilias. Una compuesta por tres genes que codifican para cotransportadores que utilizan sodio como catión para acoplarse al transporte de cloro (NCC, NKCC1 y NKCC2). La otra está compuesta por cuatro genes que codifican para cotransportadores que solo utilizan potasio como catión acoplado al cloro (KCC1 a KCC4). Los números en porcentaje indican el grado de identidad entre los diferentes miembros de la familia.

Los cotransportadores electroneutros constituyen transportadores secundarios que no hidrolizan ATP para su función, sino que dependen del gradiente generado por la bomba de Na^+K^+ , de tal manera que su actividad no produce un cambio en el potencial de membrana. Por lo tanto, NCC, NKCC1 y 2 (los que utilizan sodio) translocan iones desde fuera hacia adentro de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el sodio, mientras que los KCCs (los que utilizan potasio), lo hacen desde adentro hacia fuera de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el potasio. El sodio que entra a la célula a través del NCC, NKCC1 ó NKCC2 es expulsado por la bomba de sodio-potasio, mientras que el potasio que sale a través de los KCC es regresado a la célula por la misma bomba. Esta capacidad de concentrar o diluir el cloro intracelular constituye una de las principales funciones de los CEN.

Debido a ésta capacidad de llevar a cabo tanto el influjo como el eflujo de iones y a que algunos de ellos se expresan en forma ubicua, otra función importante de los CEN es su participación en la regulación del volumen celular. Su activación es uno de los mecanismos que

diversas células emplean para ajustar su osmolaridad, cuando son expuestas a cambios en la composición extracelular (fig. 2). Cuando la osmolaridad del medio se incrementa, el agua necesariamente sale de la célula, reduciendo su volumen. En respuesta, se induce el transporte de iones hacia el interior de la célula, con el fin de reducir la salida de moléculas de agua. Este proceso se conoce como regulación del incremento del volumen celular o RVI (**Regulatory Volume Increase**) siendo el NKCC1, una de las vías de entrada de iones que se activan con el fin de acumular Na^+ , K^+ y Cl^- en la célula y contribuir así a que recupere su volumen celular inicial (130). Por el contrario, cuando la osmolaridad del medio disminuye, las moléculas de agua ingresan a la célula aumentando su volumen. Con el fin de regresar a su tamaño original la célula activa el mecanismo conocido como regulación de la disminución del volumen o RVD (**Regulatory Volume Decrease**), en el cual se produce la salida neta de moléculas de sal y solutos. Los KCCs constituyen una de las vías activadas para sacar iones de la célula y disminuir así la osmolaridad intracelular y como consecuencia el volumen de la misma (81).

Una tercera función de los CEN es su participación en el movimiento transepitelial de los iones (fig. 2). El NCC se expresa en la membrana apical del túbulo distal, en donde constituye la principal vía de reabsorción de sal y es además el receptor de los diuréticos tiazida, recomendados como la primera línea de terapia antihipertensiva (19). Asimismo, el NKCC2 participa en la reabsorción de sal en el asa ascendente de Henle y es además el receptor de los diuréticos de asa, como la furosemida y la bumetanida. Existen mutaciones inactivantes de estas proteínas que producen síndrome de Gitelman y de Bartter, respectivamente, que producen hipotensión arterial (89) (137). Por otra parte, las isoformas del cotransportador de K-Cl, KCC1, 3 y 4 se expresan en diversos epitelios en donde están involucrados también en el transporte de iones.

PROPIEDADES DEL COTRANSPORTADOR DE $\text{K}^+:\text{Cl}^-$

Las propiedades del KCC se han analizado principalmente en eritrocitos de humano (165) (166), oveja (167) (15), perro (168) (169), conejo (64) (139), caballo (22) (47), pato (95), rana (54), rata (32) (170), ratón (171) pez (67) (10) y lamprea (172). Asimismo, mediante la transfección de su DNA complementario (cDNA), el KCC se ha estudiado en otros modelos celulares (48) (114) (59) (57) (109) Las conclusiones principales de estos estudios, lo reportan como un sistema de transporte ubicuo, involucrado en la regulación del volumen celular, activado por el aumento del volumen celular, la oxidación de grupos tiol por el reactivo NEM, la disminución de Mg^{2+} intracelular, la acidificación ligera (pH 7) y la presencia de inhibidores de proteínas cinasas, como la estaurosporina y la genisteína; mientras que la reducción del volumen celular, la presencia de cationes bivalentes, la acidificación marcada (pH menor de 6.5) y la presencia de inhibidores de

proteínas fosfatasa (PPs), reducen su actividad. De los reguladores de la función del KCC, la activación por aumento del volumen celular y la modificación de los grupos tiol por el reactivo NEM, constituyen los controles positivos básicos para la identificación del transportador en células y tejidos.

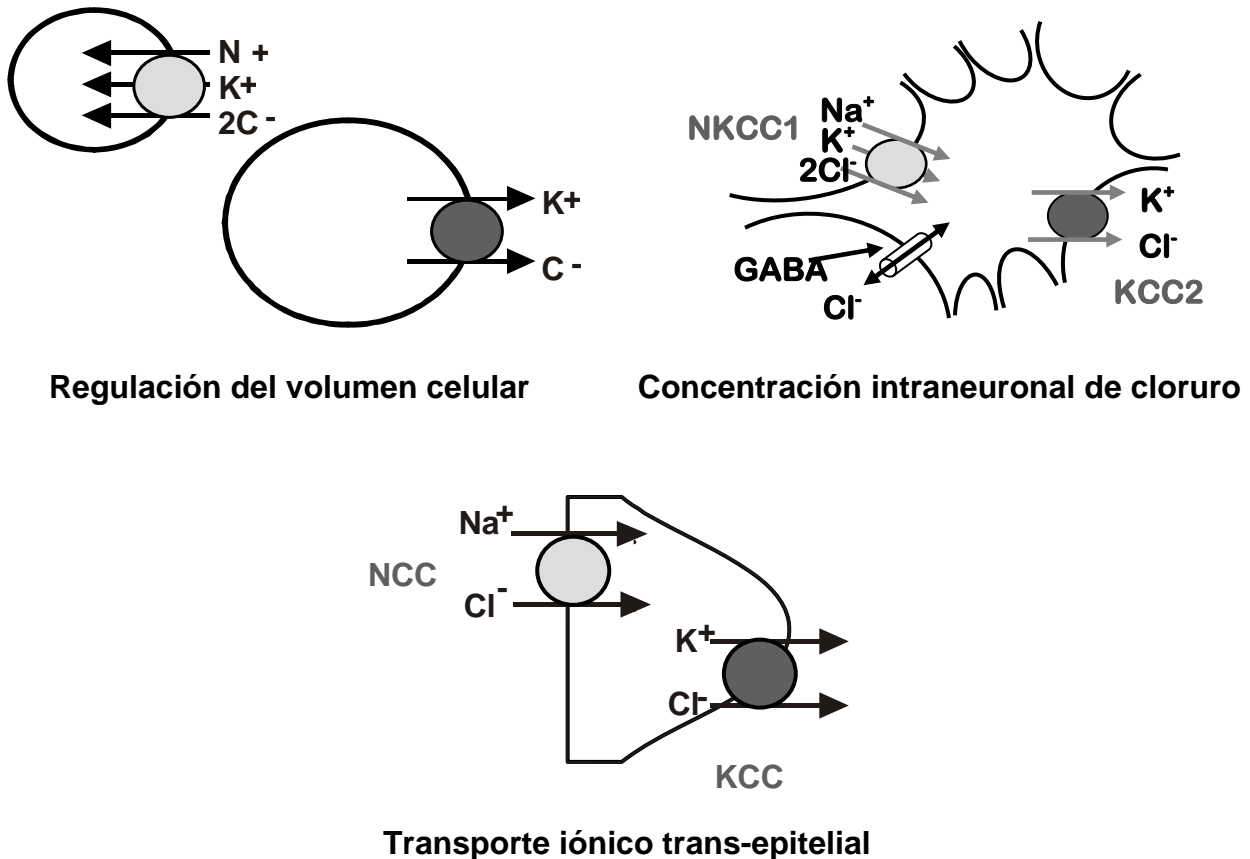


Figura 2. Funciones principales de los cotransportadores electroneutros. Esta familia de proteínas de membrana, se encuentra involucrada en diversos procesos fisiológicos, que incluyen la regulación del volumen celular, establecimiento de la $[Cl^-]_i$ por encima o debajo de su potencial de equilibrio electroquímico, así como la absorción y secreción iónica a través de epitelios.

Por otra parte, se ha reportado también mediante evidencia funcional y fisiológica, la existencia del KCC en diferentes tipos celulares y tejidos, incluyendo neuronas (128), músculo vascular liso (4), endotelio (119), epitelio (7) (53), corazón (161) y músculo esquelético (154). Sitios en donde participa no sólo en la regulación del volumen celular, sino también en la absorción transepitelial de sal, la secreción renal de K^+ (36), la regulación de la pérdida de K^+ en el miocardio durante procesos de isquemia y la regulación de la concentración neuronal de Cl^- .

Hasta la fecha, se han identificado cuatro genes que codifican para cotransportadores de K^+ y Cl^- ; estos genes se conocen como *SLC12A4*, *SLC12A5*, *SLC12A6* y *SLC12A7* y codifican a las isoformas KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4 respectivamente.

El cotransporte de K^+ y Cl^- a través de los KCCs es interdependiente y ocurre con una estequiometría 1:1 con constantes de baja afinidad para ambos iones. Aunque las especies iónicas que transporta son principalmente K^+ y Cl^- , diversos estudios han demostrado que tanto el ión Rb^+ como el amonio (NH_4^+) pueden tomar el lugar del K^+ (12) (82). Un análisis cinético llevado a cabo en nuestro laboratorio, mostró que la afinidad por el K^+ y el Cl^- , es muy similar entre las isoformas KCC2, KCC3 y KCC4 mientras que la isoforma KCC1 presenta una menor afinidad por ambos iones. Los valores de K_m para el K^+ en KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4 fueron 25.5 ± 3.2 , 11.7 ± 2.76 , 14.9 ± 2.68 y 10.2 ± 2.4 mM, respectivamente, mientras que los valores de K_m para el cotransporte de Cl^- en el mismo orden fueron: 38.5 ± 11 , 7.23 ± 0.8 , 9.41 ± 1.9 y 5.6 ± 1.1 nM. De esta manera el perfil de afinidad para el K^+ y el Cl^- extracelulares entre los KCCs, es: $KCC2 = KCC4 = KCC3 > KCC1$ (42)

Inhibidores y Activadores del KCC

El KCC no posee inhibidores específicos ya que todos los que se han estudiado se unen o afectan a otros transportadores de membrana como al intercambiador Cl^-/HCO_3^- y al NKCC. Uno de los inhibidores de los KCCs en el eritrocito, es el diurético furosemida, el cual inhibe al cotransportador con una IC_{50} de 0.5mM (83). El alcaloide DIOA (ácido dihidroindeil-oxi alcanólico) es otro inhibidor que puede utilizarse para diferenciar el cotransporte de K^+ y Cl^- con una IC_{50} aproximadamente de 0.01mM (45). Un tercer inhibidor del KCC es el DIDS (ácido disulfónico diisotiocianatoestilbeno-2,2') el cual se une de manera reversible al transportador con un IC_{50} de 60 μ M en eritrocitos de oveja (24). Adicionalmente drogas como la quinina y la quinidina, bloqueadores de canales iónicos, particularmente de canales de K^+ activados por Ca^{2+} , también inhiben al KCC (1).

Otros reguladores

En el eritrocito, el pH regula el cotransporte del KCC. Existe un pH óptimo cerca de 7, mientras que en valores de pH cercanos a 6 y 8, la actividad del cotransportador disminuye. Se ha establecido que la inhibición a pH bajo, involucra algunos sitios de unión a protones en la región citoplasmática del transportador. Debido a que el eritrocito intercambia rápidamente Cl^- con otros aniones, se han realizado estudios de sustitución de iones con el fin de conocer la selectividad relativa del transportador a diferentes aniones. La secuencia establecida en el eritrocito sigue la serie: $Br^- > Cl^- > HCO_3^- > F^- > I^- = NO_3^- = SCN^- > CH_3SO_3^-$ (83) (84). De forma generalizada se asume que

únicamente el Cl⁻ y el Br⁻ son cotransportados, mientras que los otros aniones no son aceptados por el sitio y actúan como aniones acompañantes o de baja afinidad (85).

ASPECTOS GENERALES, BIOLOGÍA MOLECULAR Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS ISOFORMAS DEL TRANSPORTADOR DE K-Cl.

Aspectos Generales de los KCCs

La identificación de los genes que codifican para los cuatro KCCs, fue posible gracias a la estrategia de clonación denominada *in silico*. Esta metodología, se basó en la identificación de secuencias del Genbank, particularmente de la base de datos EST (expressed sequence tag databases), que fueran <50% idénticas al NKCC2, NKCC1 o NCC. Hasta la fecha, se han identificado cuatro genes en cuatro cromosomas diferentes que codifican para las isoformas KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4 (48) (114) (59) (57) (109) (125). Además, existen isoformas por empalme alternativo para KCC3 (104) y KCC2 (172), denominadas KCC3a y b y KCC2a y b. El porcentaje de identidad entre los KCC's es de 65 a 71%. Los análisis filogenéticos indican que KCC1 y KCC3 forman un subgrupo, mientras que KCC2 y KCC4 forman otro, con un porcentaje de identidad entre ellos de 69% para el primero y 71% para el segundo. Las cuatro isoformas, comparten las mismas características estructurales básicas de los cotransportadores electroneutros: 12 segmentos transmembrana (TM) con dominios amino y carboxi terminales hidrofílicos intracelulares, con una asa extracelular entre los segmentos transmembrana 5 y 6 con sitios potenciales de glucosilación (fig. 3). La glucosilación particular de cada isoforma, determina su peso molecular final, el cual varía entre 150 y 160 kDa.

Respecto a las semejanzas y diferencias entre los cuatro transportadores, a pesar de que los segmentos transmembrana se encuentran altamente conservados, ninguno de estos es idéntico entre los cuatro KCC's. Las secuencias de aminoácidos difieren principalmente entre los dominios 2 (TM-2) y 4 (TM-4). Datos previos de un amplio estudio de afinidad iónica en el cotransportador Na⁺:K⁺:2Cl⁻, relacionan al segmento TM-2 con el transporte del catión y al TM-4 con el del anión (109) (62). Lo cual podría corresponder con las diferencias en la afinidad al K⁺ entre las isoformas. En cuanto a las semejanzas, la furosemida parece constituir un inhibidor para las 4 isoformas, mientras que las asas extracelulares de los cuatro KCC's se encuentran poco conservadas, sin embargo, todas contienen tres secuencias idénticas para sitios de glucosilación. En términos de regulación de la función de las cuatro isoformas, todas son estimuladas por NEM. Sin embargo, la respuesta al cambio de volumen varía entre ellas. La mayoría de los sitios consenso para fosforilación se encuentran localizados en el extremo carboxilo terminal, aunque existen algunos en el extremo amino terminal. La distribución de estos sitios varía para cada isoforma e incluyen sitios de fosforilación para proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC).

KCC2 posee 73 residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal, que no están presentes en KCC1, KCC3 ni KCC4. Esta región contiene diversos sitios de regulación putativos, incluyendo un sitio para fosforilación por PKA. Aparentemente, algunos de los segmentos citoplásmicos conservados de la secuencia de aminoácidos de los KCCs, están involucrados en interacciones proteína-proteína (109). Recientemente, Delpire y col. (121) identificaron en el extremo amino de KCC3, una secuencia de nueve aminoácidos que funciona como sitio de unión a las cinasas SPAK y OSR1. En este mismo estudio, la secuencia se identificó también en KCC1 y KCC4, así como en los cotransportadores NKCC1 y NKCC2. Posteriormente en el año 2007, el sitio de unión a SPAK se identificó también en una de las isoformas del KCC2 (172). La función de las cinasas SPAK y OSR1, así como el papel de su interacción con los CEN, se verá más adelante. Por último, a pesar del hecho de que la fosforilación y la defosforilación de los cotransportadores, se ha propuesto como un regulador importante del cotransporte de K-Cl, aún no se ha demostrado la fosforilación y/o defosforilación *in vivo* de los KCCs.

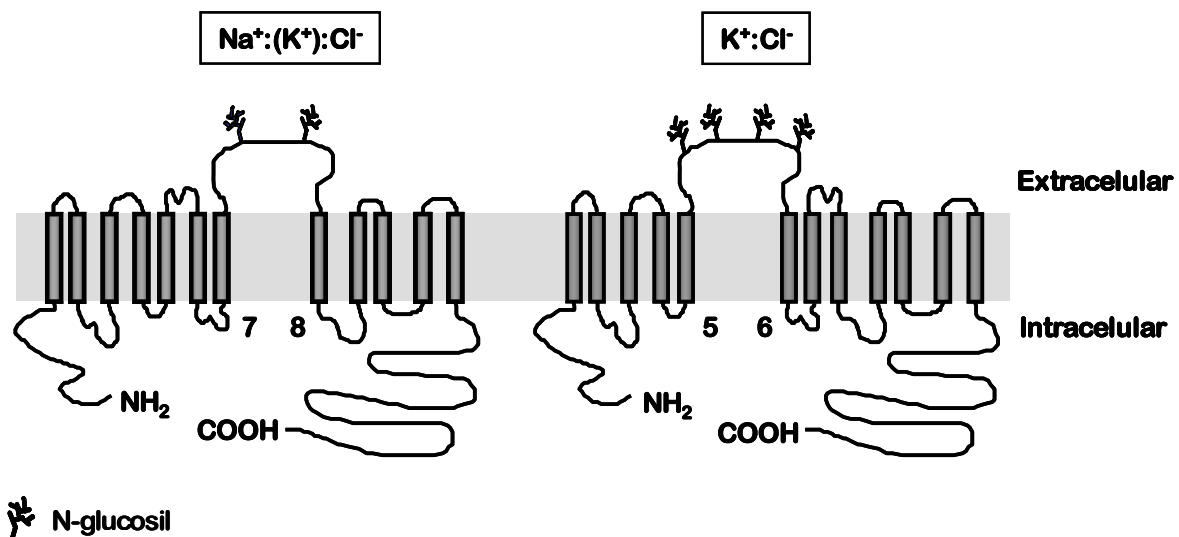


Figura 3. Topología básica de los cotransportadores electroneutros. Las secuencias de aminoácidos de los CEN, predicen por análisis de hidropatía 12 segmentos transmembrana, delimitados por dominios amino y carboxi terminales intracelulares largos. Los transportadores de Na-(K)-Cl, difieren de los cotransportadores de K-Cl en la posición del asa extracelular.

Biología Molecular de los KCCs

KCC1

El cotransportador KCC1 se considera como la isoforma “ama de llaves”, involucrada principalmente en la regulación del volumen celular en la mayoría de las células del organismo. En las diversas especies analizadas (48) (59), los análisis de Northern blot demuestran que el

RNA de esta isoforma se expresa en todos los tejidos examinados, incluyendo cerebro, colon, corazón, riñón, hígado, pulmón, bazo, estómago, placenta, músculo y páncreas. El gen del KCC1 en el humano (SLCA124), se localiza en el cromosoma 16, abarca 28.8 kb y codifica para 1085 aminoácidos, está altamente conservado, con una homología de 96% entre las proteínas del humano, del conejo, de la rata, de la oveja y del ratón. El gen está codificado en 24 exones y se ha identificado que posee la capacidad para generar 3 variantes del RNA mensajero (RNAm) con diferentes extremos 3', denominadas hKCC1a, hKCC1b y hKCC1c. Estos cDNAs codifican para proteínas con diferentes extremos carboxi terminales de 1086, 1068 y 1012 aminoácidos, respectivamente. La presencia de diferentes regiones C-terminal, sugiere la posibilidad de una regulación post-transcripcional diferencial del cotransportador. Sin embargo, con la excepción de dos sitios ausentes en hKCC1c (T¹⁰²¹ y S¹⁰⁵⁰) la mayoría de los posibles sitios de fosforilación los comparten las 3 isoformas (3). Con respecto al papel de la región promotora en la regulación transcripcional del gen, los sitios de inicio de la transcripción y las características intrónicas, aún no se han determinado. Sin embargo, la secuencia del promotor presenta diversas características consistentes con la expresión de un gen "ama de llaves", como son diversos sitios de unión a factores de transcripción ubicuos. De manera tal que aunque el KCC1 es ubicuo, se conoce poco sobre su regulación génica.

KCC2

En el humano, el gen para esta isoforma se localiza en el cromosoma 20 y está codificado en 26 exones que abarcan ~30 kb (78). Su expresión es específica del SNC, principalmente en las neuronas de la corteza, neuronas piramidales del hipocampo y la capa granular del cerebelo (38). Se encuentra ausente en la materia blanca del cuerpo calloso y las células de la glia, que expresan únicamente al KCC1 (113) (38). La expresión específica de esta isoforma en las neuronas, se debe a la presencia de un dominio de 21 pares de bases (pb), localizado corriente abajo del exón 1 del gen, semejante a los elementos de silenciamiento neuronales (NRSE). La presencia de este elemento, controla la regulación transcripcional negativa de genes en células no neuronales (132). La proteína en el humano consta de 1116 aminoácidos con un peso molecular de 123 kDa y su secuencia contiene diversos sitios potenciales para fosforilación por PKA y PKC (141). Como se mencionó anteriormente, posee 74 aminoácidos únicos en el extremo C-terminal, codificados por los exones 21 y 22.

Recientemente se describió la existencia de 2 isoformas del KCC2, generadas por empalme alternativo, denominadas KCC2a y KCC2b (172). KCC2a, es codificada por el exón 1 alternativo denominado exón 1a y constituye una isoforma nueva, no caracterizada hasta antes de este estudio, mientras que KCC2b, corresponde a la isoforma previamente caracterizada. Ambas difieren en 40 aminoácidos del extremo amino terminal y se expresan únicamente en las neuronas

del SNC. La expresión de su RNAm en el cerebro de ratones neonatales, constituye del 20 al 50% del RNAm total del KCC2. Sin embargo, en la corteza cerebral madura del ratón, solamente representa entre el 5 y el 10 % del KCC2 total. Aparentemente la expresión de ambas isoformas ocurre en diferentes poblaciones neuronales. En este estudio, mediante ratones knockout de ambas isoformas, los autores concluyen que la expresión de KCC2a al parecer contribuye a las funciones neuronales vitales en el tallo cerebral y médula espinal, pero no así en la corteza.

KCC3

El gen de KCC3 (SLC12A6) se localiza en el cromosoma 15 del humano y su RNAm se ha identificado en corazón, músculo estriado, riñón, cerebro, células endoteliales, placenta, hígado, pulmón y páncreas (57) (109). El gen existe en dos formas originadas por empalme alternativo: KCC3a y KCC3b, las cuales difieren por 51 aminoácidos en el extremo amino terminal. El exón 1a codifica para 90 aminoácidos mientras que el exón 1b codifica para 39. En esta región existen varios sitios potenciales de fosforilación por PKC (104) (57). En el extremo carboxilo terminal ambas variantes son idénticas con dos sitios para cinasas dependientes de AMP cíclico (AMPc), cuatro sitios para PKC y doce sitios de fosforilación para caseína cinasa II. En células endoteliales y de placenta, ciertos factores como el de crecimiento endotelial vascular y el de necrosis tumoral α (57) activan a este cotransportador. Los análisis de Northern blot muestran que el RNAm de KCC3a se expresa ampliamente en cerebro, riñón, músculo, pulmón y corazón, mientras que el transcrito de KCC3b es más abundante en el riñón que en cualquier tejido.

KCC4

Esta es la isoforma de los KCCs de la cual se tiene menos información. El gen de KCC4 en el humano se localiza en el cromosoma 5 (109) y codifica para una proteína de 1150 aminoácidos, la cual se ha localizado principalmente en corazón y riñón. El gen está codificado en 24 exones localizados en el locus SLC12A7 en donde abarca ~60 Kb, su secuencia completa o de las regiones promotoras, aún no se han reportado. En el humano se han caracterizado al menos tres cDNAs de esta isoforma, dos versiones largas que codifican para proteínas idénticas de 1150 aminoácidos denominadas KCC4a y una versión corta, obtenida a partir de células de un neuroblastoma que codifica para KCC4b, una proteína de 266 aminoácidos generada por empalme alternativo. El papel fisiológico de KCC4b aún se desconoce y es probable que constituya una isoforma no activa. KCC4a de humano es 90 y 71% homóloga a la proteína del ratón y a la de la rata, respectivamente. Su RNAm de 4.2 kb, se expresa en médula espinal, bazo, timo, cerebro, músculo, próstata, páncreas, pulmón, corazón, hígado y riñón (3) (148). Dentro del SNC se localiza principalmente en los nervios craneales (77).

Propiedades Funcionales y Papel Fisiológico de los KCCs

Las características funcionales de los KCCs se han analizado en diferentes organismos y tipos celulares. Esto ha arrojado importantes diferencias funcionales, farmacológicas y de regulación entre las 4 isoformas. Anterior a la identificación molecular de los cuatro genes del KCC, la mayor parte de la caracterización funcional de este sistema de transporte se realizó en eritrocitos (85) (173). Asimismo, se conoce poco aún sobre el papel fisiológico específico de cada isoforma al nivel de órgano o tejido. Adicionalmente, la expresión simultánea de al menos dos isoformas es muy común lo que dificulta la identificación del papel fisiológico de una isoforma en particular.

KCC1

KCC1 fue clonado inicialmente por Gillen y colaboradores en 1996, a partir de sondas derivadas de la base de datos EST (dbEST) (174), con las que pudo identificar clonas completas, a partir de riñón de humano, rata y conejo. La transfección de células HEK-293 con el cDNA de KCC1 de conejo, demostró que éste poseía las características típicas del KCC, es decir: captación de $^{86}\text{Rb}^+$ independiente de Na^+ , dependiente de Cl^- , sensible a furosemida y capaz de activarse en presencia de NEM o aumento del volumen celular. A partir de la clonación inicial del KCC1 por Gillen, el transportador se identificó en otras especies como el ratón (59), el cerdo y el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (118), Estas 3 clonas fueron expresadas también en células HEK-293, en donde muestran un comportamiento típico del transportador de K-Cl, activado por hipotonicidad. Las propiedades funcionales del KCC1 de ratón y de conejo, se han analizado también en el sistema de expresión heterólogo de ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Su, y col., (175) y Mercado y col., (101) demostraron que la activación del transportador por hipotonicidad en estas células, es aún más evidente que en las células HEK. Asimismo, ambos estudios demostraron que la activación del transportador en condiciones de hipotonicidad, se previene en presencia de 100 nM de caliculina A, un inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 (PP1) y 2a (PP2A). Estas observaciones sugieren que tal como se había demostrado previamente en eritrocitos de conejo y de humano (66) (75) (139), la activación del KCC1 por aumento del volumen celular requiere la defosforilación del transportador. Con el fin de diferenciar entre las diversas fosfatasas a la responsable de la activación, se analizó también el efecto del ácido okadaíco en una concentración 1nM, para inhibir específicamente a la PP2A y el efecto del inhibidor de la proteína fosfatasa 2B (PP2B), cipermetrina (13). El estudio (101) demostró que ninguno de los 2 compuestos afecta la activación del KCC1 en ovocitos de *X. laevis*, inducida por un medio hipotónico. Esto parece indicar que la PP1 es la fosfatasa involucrada en la activación del KCC1 durante el aumento del volumen celular (101).

Aparentemente la función principal del KCC1, es la regulación del volumen celular. Asimismo, la mayor parte del cotransporte de K-Cl en eritrocitos se le ha atribuido al KCC1, con

cierta contribución del KCC3 (87). A este respecto, se ha propuesto que el eflujo de K-Cl en el eritrocito es un mecanismo importante para la reducción del tamaño durante la maduración de este tipo celular. Por otra parte, la actividad del KCC se encuentra aumentada en ciertas hemoglobinopatías, tal como la anemia falciforme.

La presencia del KCC1 en las células y tejidos en gran parte está relacionada con su función en la regulación del volumen celular. Sin embargo en ciertos tejidos podría desempeñar otro función, como es el caso de las glándulas salivales, parótidas y pancreáticas, (129) que expresan al transportador en la membrana basolateral. Su presencia en estos epitelios, sugiere que podría estar involucrado en la reabsorción transepitelial de K^+ (131).

Las cuatro isoformas del KCC se expresan en el sistema nervioso central (SNC) (11) (77) (114) (116) en donde, como se discutirá más adelante, la regulación del cloro intracelular por los cotransportadores electroneutros es importante. Los estudios de hibridación *in situ* en este sistema demostraron que la expresión de KCC1 es baja aunque extensa, con mayor presencia en el bulbo olfatorio, hipocampo, cerebelo y plexo coroideo (20) (76). Sin embargo, el papel específico del KCC1 en el SNC aún no se ha identificado y la ausencia de un ratón knockout de esta isoforma, ha retrasado la clarificación de su papel en los diversos órganos donde se expresa.

KCC2

KCC2 fue clonado en 1996 por Payne y colaboradores (114).a partir de dos secuencias EST de cerebro de humano 35% idénticas al NKCC1. Con estas secuencias, se amplificó un fragmento de 286pb a partir de DNA de cerebro de rata mediante PCR y este fragmento a su vez se utilizó como sonda para identificar al KCC2 en una genoteca de cerebro de rata. Posteriormente se identificó también en ratón y en humano (142) (138) (35). En su estudio, Payne estudió al KCC2 de rata expresado en células HEK-293. En este sistema el cotransportador fue funcional en condiciones isotónicas y el tratamiento con NEM incremento su actividad, mientras que el aumento del volumen celular, no tuvo efecto en su función (114). Empleando el sistema de expresión de ovocitos de *X. laevis*, Strange et al (141) y Song et al (138) analizaron las propiedades del KCC2 de rata y humano, respectivamente. En ambos estudios, el cotransportador fue funcional en condiciones isotónicas. Sin embargo, al contrario de lo observado en el estudio de Payne, la actividad del KCC2 aumentó de forma significativa en condiciones hipotónicas. En ambas especies esta respuesta, al igual que en KCC1, fue prevenida en presencia del inhibidor de la PP1, caliculina A. Actualmente es bien conocido que los KCCs se activan con el aumento del volumen celular. El hecho de que esto no ocurra en las células HEK, sugiere la posibilidad de que éstas carezcan de algún elemento necesario para su activación en respuesta al aumento de volumen celular.

Una diferencia importante del KCC2 con las otras isoformas es su actividad en condiciones isotónicas en ovocitos de *X. laevis*. Por lo que se ha sugerido que su secuencia de aminoácidos podría contener “motivos” que le permitan llevar a cabo esta función, como es el caso de los 73 residuos C-terminales, únicos para esta isoforma (42).

Una de las funciones del KCC2 en las neuronas es mantener baja la concentración intracelular del cloro ($[Cl]_i$) y de esta manera contribuir a la hiperpolarización de las neuronas por la apertura de canales de Cl^- acoplados a GABA o glicina, lo que trae como consecuencia la inhibición de las neuronas en respuesta a estos neurotransmisores en ciertas áreas del cerebro (63). Por otra parte, diversos estudios apoyan la hipótesis de que KCC2 está relacionado con la transición de la respuesta al GABA de excitador en neuronas prenatales, a inhibidor después del nacimiento. Las neuronas en desarrollo mantienen una $[Cl]_i$ por encima de su equilibrio electroquímico, mientras que las neuronas maduras, presentan una $[Cl]_i$ por debajo de su potencial de equilibrio (20) (92). Como se muestra en la figura 4, durante las primeras etapas del desarrollo, la expresión del cotransportador NKCC1 es alta y parece ser el responsable de la alta concentración intraneuronal de Cl^- debido a que favorece la entrada de este ión. Sin embargo, la expresión de este transportador disminuye gradualmente después del nacimiento (124) (105). En contraste, los niveles de expresión de KCC2 son muy bajos al nacer pero durante la primera semana de vida y el resto de la vida adulta incrementan en gran medida (127) (152). Debido al eflujo de K-Cl a través del KCC2 la concentración intraneuronal de Cl^- es baja, lo que resulta en una respuesta inhibitoria al GABA.

Cuando KCC2 se transfecta en células HEK293 su afinidad por el K^+ es mucho mayor que la del KCC1. Este hecho llevó a Payne (113) y a otros investigadores (63) (127) a proponer que el KCC2 podría funcionar como un transportador amortiguador del K^+ extracelular que ingresa K^+ y Cl^- a la célula, cuando la concentración de K^+ afuera de la neuronas incrementa debido a una intensa actividad de este tipo celular. A pesar de que el sistema termodinámicamente se encuentra de forma general cerca del equilibrio, existen situaciones pato-fisiológicas en las que el K^+ exterior se eleva. Esto puede ocurrir durante una crisis epiléptica, procesos de isquemia o hipoxia, en los que el K^+ se eleva y como consecuencia la $[Cl]_i$ aumenta debido a la actividad del KCC2, lo que previene la inhibición post-sináptica del GABA a través del influjo de Cl^- (63).

El papel de KCC2 en la fisiología del SNC es tan relevante, que el ratón knockout presenta severos problemas motores con ataques frecuentes generalizados y muere inmediatamente después de nacer (61). De acuerdo con su papel de cambiar la respuesta al GABA de excitador a inhibidor, en este mismo estudio Hubner y col., (61) observaron que tanto este neurotransmisor como la glicina inhibían la respuesta en neuronas de ratones silvestres, mientras que en los ratones knockout, se comportaban como excitadores neuronales. Woo y col., (157), desarrollaron un ratón knockout en el cual se interrumpió el exón 1b del KCC2, conservando la expresión del RNAm de la isoforma KCC2a de este transportador y que les permitió a los ratones sobrevivir por

2 semanas. Esto sugiere que esta isoforma está involucrada en funciones neuronales básicas en el cerebro requeridas para la supervivencia (172). Sin embargo, los ratones presentaban ataques continuos generalizados, ocasionados por estímulos ligeros. La epilepsia constante produjo daño neuronal severo, lo que ocasionó la muerte de los roedores aproximadamente a los 17 días de nacidos. Mientras que los animales con una delección heterocigota para el KCC2 únicamente poseían una mayor tendencia a sufrir ataques epilépticos y mayor resistencia a los fármacos anticonvulsivos (157). Lo anterior constituye una evidencia directa del papel del transportador en la regulación de la excitabilidad neuronal y sugiere un papel para el KCC2 en la inducción de la epilepsia.

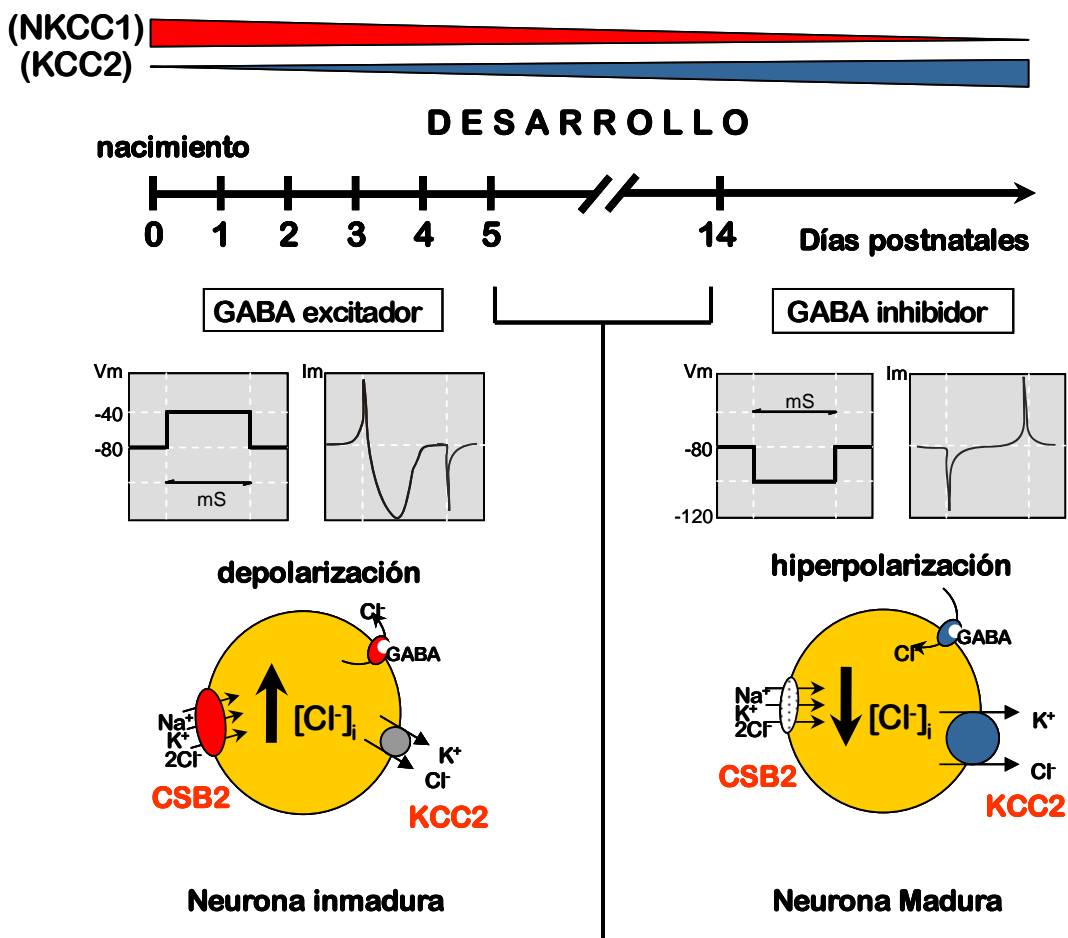


Figura 4. Representación del papel de KCC2 en la regulación del Cl⁻ intraneuronal. En el diagrama se muestra la relación entre la maduración neuronal, el tipo de respuesta al GABA y la expresión de los GEN. La expresión de KCC2 en las neuronas inmaduras (diagrama izquierdo) es mínima mientras que la de el NKCC1 es extensa. La respuesta al GABA en este caso es excitadora como se muestra en el análisis de voltaje clamp de una célula completa. Por el contrario en los días posteriores al nacimiento (diagrama derecho), la expresión de KCC2 se incrementa en gran forma y la de NKCC1 se reduce considerablemente, lo que resulta en una respuesta inhibitoria al GABA (44).

KCC3

En el humano, esta isoforma fue identificada por 3 grupos de manera simultánea mediante dos estrategias diferentes. En un primer estudio, Hiki y colaboradores (57) buscaban identificar en células endoteliales umbilicales de humano (HUVEC), transcritos que cambiaran su expresión al ser tratados con factor de crecimiento endotelial (VEGF). Mediante PCR se encontró una banda sobreexpresada bajo estas condiciones, que se utilizó como sonda para identificar la secuencia de cDNA completa a partir de una genoteca de células HUVEC. Esta correspondía a un transportador de membrana, 77% y 73% idéntica al KCC1 y KCC2, respectivamente; por lo que se le llamo KCC3. El comportamiento de esta clona en células HEK-293 fue el característico de un cotransportador de K-Cl sensible a furosemida, sin embargo, no mostró aumento de su actividad en condiciones hipotónicas. De manera simultánea, Mount y col., (109) identificó al KCC3 siguiendo la estrategia *in silico*, a través de la cual encontró diversas secuencias EST, que le permitió clonar tanto a KCC3 como a KCC4 a partir de una genoteca de músculo de humano. Asimismo, mediante la estrategia *in silico*, Race y colaboradores (125) aislaron al KCC3 a partir de una genoteca de placenta. Mount y Race analizaron las propiedades de KCC3 también en células HEK, en donde el cotransportador fue estimulado por NEM, estaurosporina, niveles bajos de magnesio y ligeramente por aumento del volumen celular, (125) e inhibido por furosemida y DIOA. La isoforma identificada por estos dos autores corresponde al KCC3a, mientras que la identificada por Hiki y col., corresponde a KCC3b. Ambas isoformas, cuando son estudiadas en el sistema de expresión funcional de ovocitos de *Xenopus*, inducen una gran captación de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de cloro, cuando los ovocitos son incubados en condiciones hipotónicas (104). Su afinidad externa por el K^+ es mayor que la de KCC1, por lo que en analogía al KCC2, podría funcionar como un amortiguador de este ión, particularmente en el corazón, en donde las concentraciones extracelulares de potasio aumentan durante la acción forzada o bajo condiciones patológicas como la isquemia (176). Las consecuencias funcionales de la existencia de dos exones 1 alternativos aún no se han establecido. Sin embargo, la regulación diferencial a nivel transcripcional, post-transcripcional y/o post-traducciona, les confieren sin duda amplias posibilidades en las diversas vías de señalización.

A pesar de que esta isoforma se ha identificado en diversos tejidos en el humano, se conoce poco de sus propiedades funcionales. Se ha asociado con la regulación del crecimiento celular (134) (135) (133) y también con la fisiología de la mielinización, ya que la ontogenia de la expresión de KCC3 correlaciona con la mielinización en el SNC del ratón (117). Asimismo, la proteína de KCC3 se ha localizado en la mayoría de las áreas del cerebro, incluyendo el hipotálamo, el cerebelo, el tallo cerebral, la corteza cerebral y la materia blanca (117). KCC3 es abundante también en la médula espinal, mientras que su presencia en la base del plexo coroideo, ha sugerido un posible papel en la reabsorción de K^+ del líquido cefalorraquídeo.

KCC3 se encuentra mutado en una severa neuropatía periférica asociada con agenesia del cuerpo calloso (60) conocida como Síndrome de Anderman. Esta enfermedad hereditaria se transmite de forma autosómica recesiva y se encuentra en altas proporciones en la población de Québec en Canadá. En 81 pacientes de esta localidad, la mutación del nucleótido 2436 ocasiona la delección de una guanidina (delG2436) que produce un cambio en el marco de lectura, dando lugar a una proteína trunca que pierde los últimos 338 residuos de la proteína. El término de la proteína ocurre ~94 residuos después de la región TM12 (60). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad incluyen tanto problemas en el desarrollo de las neuronas, como neurodegenerativos. El síndrome incluye también deficiencias del sistema nervioso central y periférico, así como en la actividad cognitiva.

La delección G2436 produce una proteína que es procesada por la célula normalmente, que es glucosilada e insertada en la membrana; sin embargo, no es funcional, lo que sugiere que la presencia de la mayoría del extremo C-terminal de KCC3 no es necesario para el procesamiento, tráfico e inserción del cotransportador, pero si es requerida para conferirle actividad. La mayoría de los pacientes con el síndrome de Anderman, comparten la misma delección. Existen otras mutaciones reportadas (28) (34); sin embargo, todas truncan a la proteína en el extremo carboxilo.

Los ratones knockout para KCC3 reproducen casi todas las características neurológicas del síndrome de Anderman. (60) (17). Estos ratones presentan un déficit locomotor severo y neuropatía periférica. Sin embargo, no presentan agenesia o malformación del cuerpo calloso. Aún no se conoce, como es que la pérdida del cotransporte a través de KCC3 ocasiona las diversas características del síndrome y aún más, por que la ausencia de esta isoforma no puede ser compensada por alguno de los otros KCCs presentes en las neuronas. La disminución en el crecimiento celular o en la regulación del volumen celular observadas en las neuronas de los ratones knockout (17), podrían estar implicadas en la neurodegeneración progresiva.

KCC3 posee también un papel importante en el desarrollo y función del oído interno (17). Los ratones knockout desarrollan sordera durante el primer año de vida, asociada con un proceso degenerativo de la cóclea. En condiciones normales, KCC3 se expresa en las células ciliares externas e internas, en las células epiteliales del órgano de Corti y en los fibrocitos tipo I y III de la stria vascularis. En estos mismos ratones, la presión arterial se encontró elevada, sin embargo no se conoce el mecanismo por el cual esto ocurre. Podría estar relacionado con la expresión y actividad del KCC3 en las células vasculares del músculo liso (57) o el riñón ya que en diversos estudios, se ha demostrado un papel del óxido nítrico y los vasodilatadores en la regulación de la actividad del KCC3 (5) a través de la vía del GMP cíclico. Lo que sugiere que la función de KCC3 podría estar asociada también con la vasodilatación (4).

KCC4

Mount y colaboradores (109) identificaron por primera vez al KCC4 a partir del RNAm de riñón de ratón y de humano mediante PCR con oligos diseñados a partir de secuencias ESTs. La expresión funcional en ovocitos de *X. laevis*, mostró que KCC4 codifica para un cotransportador de K-Cl, activado en condiciones hipotónicas y/o cuando los ovocitos son expuestos al NEM (103). Posteriormente, Mercado y col., (103) mostraron que al igual que los otros KCCs la activación de KCC4 por aumento del volumen celular, podía ser prevenida en presencia de caliculina A y no así por ácido okadaico o cipermetrina, lo que sugiere un papel importante de la PP1 en la activación del KCC4.

La isoforma para la cual existe menos información relacionada con su papel fisiológico es el KCC4. En el SNC y periférico se expresa principalmente en el tallo cerebral (11), médula espinal y nervios periféricos. Asimismo Karadsheh y colaboradores (77), demostraron que se expresa también en oligodendrocitos y en la membrana apical de las células epiteliales del plexo coroideo, lo que sugiere un papel de este cotransportador en la reabsorción de K^+ . Sin embargo, su función específica en el SNC aún no se ha establecido.

Los ratones knockout para esta isoforma son viables y fértiles, con un peso aproximadamente 10% menor que el de los ratones control y sin manifestaciones aparentes de daño en el SNC al nacer. Sin embargo, a los 10 días de nacimiento el sentido del oído comienza a deteriorarse hasta quedar completamente sordos (16). El gen del KCC4, no parece estar involucrado en el desarrollo normal del oído interno o en la producción de la endolinfa. Sin embargo, en los ratones *Kcc4^{-/-}* al nivel de la cóclea, las células ciliares externas se encuentran ausentes y el órgano de Corti se pierde por completo. En los ratones silvestres KCC4 se expresa en las células de Deiter del oído interno. Se ha sugerido que estas células llevan a cabo el transporte de K^+ a partir de las células ciliares externas hacia las células epiteliales adyacentes. La ausencia del KCC4 en las células de Deiter, ocasiona que el K^+ se acumule en el espacio extracelular que rodea a las células ciliares externas, lo que conduce a su degeneración por estrés osmótico o despolarización de la membrana.

El cDNA de KCC4 fue identificado también por Velázquez y Silva a partir del riñón de conejo (148). En este estudio mediante inmunohistoquímica el KCC4 se localizó en la membrana basolateral de túbulo distal, túbulo conector y túbulo colector. La función del KCC4 en estos sitios de la nefrona, se postuló que podría ser la regulación de la salida de potasio y cloro de la célula, así como su participación en la reabsorción de sal en el túbulo distal. Por otra parte, la localización de KCC4 en el túbulo colector, lo relaciona con la regulación del metabolismo ácido-base. Los ratones knockout para esta isoforma previamente descritos, además de sordera desarrollan también, acidosis tubular renal. La expresión del KCC4 en el túbulo colector se localiza principalmente en las células α -intercaladas, que son las encargadas de la secreción de protones hacia el lumen tubular. Al parecer su actividad es crítica para esta función ya que el

cotransportador está involucrado en la extracción basolateral del Cl^- , que es a su vez requerido para mantener la actividad del intercambiador de aniones tipo I $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. A este respecto, Boettger y colaboradores, mostraron que la orina de los ratones *Kcc4^{-/-}* era más alcalina ($\text{pH } 7.3 \pm 0.1$ vs $\text{pH } 6.4 \pm 0.1$) y que la concentración de Cl^- intracelular de las células α -intercaladas era mayor, con respecto a los ratones control. Bergeron y colaboradores (12) demostraron en ovocitos de *X. laevis* que al igual que los otros KCCs, KCC4 es capaz de transportar NH_4^+ en lugar de K^+ con una afinidad muy similar. En ese mismo estudio se demostró que la actividad de KCC4 en valores de pH menores de 7.0 se induce significativamente, mientras que en valores de pH >7.8 se inactiva. Estas observaciones son importantes dada la expresión de KCC4 en el túbulo colector y su papel en el metabolismo ácido-base discutido anteriormente.

REGULACIÓN DEL COTRANSPORTADOR DE $\text{K}^+:\text{Cl}^-$

Uno de los aspectos que más se han investigado de los KCCs, esta relacionado con los mecanismos de regulación de la función tanto de estas proteínas, como de los otros miembros de la familia de los cotransportadores electroneutros (2) (112). Gran parte de estos estudios se ha enfocado en los procesos de transducción de señales. Siendo estos, mecanismos de señalización que involucran diversos pasos en los que participan hormonas o factores de crecimiento, componentes de la membrana celular que funcionan como transductores y una cascada de enzimas, cofactores y moléculas interactuando unas con otras y con estructuras celulares.

La evidencia disponible indica que la función del KCC está regulada por una compleja vía de transducción de señales que involucra diversos pasos de fosforilación y defosforilación (110). La fosforilación del cotransportador se asocia con la inactividad de la proteína, mientras que la defosforilación incrementa la función del transportador. Esta regulación es la imagen en espejo de lo que ocurre con los transportadores NCC, NKCC1 y NKCC2, en donde la fosforilación incrementa su actividad, mientras que la defosforilación se ha asociado con una reducción de la función.

La primera evidencia de la acción de una cascada de fosforilación/defosforilación sobre el KCC, fue presentada por Jennings y Al-Rohil (65). Ellos demostraron que la activación del KCC en eritrocitos de conejo, se abatía en presencia de caliculina A, el inhibidor de la PP1A. El modelo propone que el KCC es activado por defosforilación a través de una serina/treonina fosfatasa PP1A e inactivado por una serina/treonina cinasa sensible a volumen, que funciona como regulador negativo. Este mismo efecto, se observó en eritrocitos de humano (15). Estudios posteriores en diversos tipos celulares y tejidos han reportado la regulación del cotransportador por cinasas y fosfatasas (22), en los que la activación del KCC por aumento del volumen celular, NEM o urea, es bloqueada por la presencia de inhibidores de las proteínas fosfatasas, como la

caliculina A o el ácido okadaíco. La mayoría de estos estudios sugieren un papel dominante de la PP1A (14), aunque la PP2A también parece estar involucrada en la respuesta a cambios en el volumen celular (14). En cuanto a la identidad de la cinasa sensible a volumen que inhibe a los KCCs aún es desconocida. El inhibidor de proteínas cinasas, estaurosporina, activa el cotransporte de K-Cl en eritrocitos, sin embargo este inhibidor es poco específico lo que dificulta la identificación de la misma. Se ha propuesto que esta cinasa sensible a estaurosporina actúa como un regulador negativo de las proteínas fosfatasa (22) (66) y que es la misma que activa a los NKCCs, ya que estos como se mencionó anteriormente, son activados por disminución del volumen celular e inhibidos por la presencia de estaurosporina, NEM y fosfatasas (94).

Los estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el comportamiento y regulación de los KCCs en ovocitos de *X. laevis*, sigue el mismo modelo que observado en los eritrocitos (103) (138) (104). La inhibición de las proteínas fosfatasas previene la activación del cotransporte de K-Cl inducido por aumento del volumen celular o el agente reductor de grupos tiol, NEM. Al menos en el ovocito el papel de la PP1A parece ser fundamental, ya que su inhibición con caliculina A impide la activación de los KCCs en respuesta al aumento del volumen celular. Mientras que la presencia de ácido okadaíco y cipermetrina, inhibidores de las proteínas fosfatasas 2A y 2B, respectivamente, no afectan la actividad del cotransportador. Dada la localización de los KCCs en los diversos tejidos, la activación de estos por la PP1, podría jugar un papel importante no solo durante la regulación del volumen celular, sino también en el transporte de sal en el riñón y otros epitelios.

De acuerdo a nuestros resultados y a los obtenidos por otros grupos, con respecto al análisis de las propiedades funcionales de los diversos miembros de la familia SLC12A, en ovocitos de *Xenopus laevis* (106) (107) (122) hemos propuesto el siguiente modelo de regulación: Cuando los ovocitos son inyectados con los diversos cotransportadores en condiciones de isotonicidad, los KCCs permanecen inactivos, mientras que el NCC y los NKCCs se activan y cuando son expuestos a hipotonicidad, sucede lo contrario, los KCCs se activan mientras que el NCC y los NKCCs se inhiben (103) (138) (104). La defosforilación de los cotransportadores, se asocia con la activación de los KCCs y la inhibición del NCC y los NKCCs, mientras que la fosforilación de estas proteínas, se asocia con inhibición de los KCCs y la activación de los cotransportadores de Na-(K)-Cl. Lo anterior, sugiere que los CEN comparten una vía de señalización común, ya que los estímulos que activan a una rama de la familia, inhiben a la otra y viceversa. Por ejemplo, el aumento del volumen celular, las concentraciones intracelulares altas de Cl⁻ y la presencia de proteínas fosfatasas, estimulan el transporte a través de los KCCs, pero inhiben a los transportadores de Na-(K)-Cl. Por el contrario, la disminución del volumen celular, las concentraciones bajas de Cl⁻ intracelular y la presencia de inhibidores de las proteínas fosfatasas que promueven la fosforilación, producen el efecto contrario. En esta vía de señalización, el aumento del volumen celular y/o los cambios en la concentración de cloro

intracelular podrían regular la función de una cinasa intracelular que a su vez regula la función de los CEN (37) (96). Ésta correspondería a la cinasa sensible a volumen propuesta por Jennings (66), cuya identidad queda aún por determinarse. Las evidencias recientes de nuestro y otros laboratorios sugieren que dentro de una nueva familia de serina/treonina cinasas, denominadas WNK, podrían encontrarse la o las cinasas que regulan y coordinan la función de los cotransportadores electroneutros.

LAS CINASAS WNK

Las WNK constituyen un pequeño grupo de serina/treonina cinasas dentro de la superfamilia de esta clase de proteínas, identificadas en el año 2000 (159). Fueron llamadas WNK debido a que en el sitio catalítico del dominio cinasa, presentan la sustitución de un residuo de lisina por una cisteína. Esta lisina coordina la unión del ATP (149); es decir, no tienen una lisina en el sitio catalítico, conservada en el resto de las serina/treonina cinasas, por lo que se les llamó cinasas “sin lisina” en inglés “**With No lysine=K**” = WNK. La mayoría de las serina/treonina cinasas conocidas poseen este residuo catalítico en el subdominio II, mientras que en las WNKs este aminoácido se localiza en el subdominio I. Las cinasas WNK están presentes exclusivamente en eucariontes multicelulares. *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* poseen un gen ortólogo. *Arabidopsis thaliana* expresa al menos ocho genes ortólogos y en el humano se han identificado cuatro miembros de esta familia: WNK1, WNK2, WNK3 y WNK4 (74) con un porcentaje de identidad entre ellos de ~40%.

Estructura genómica y distribución de las WNKs

WNK1

Actualmente WNK1 es la isoforma de la cual se ha obtenido más información. Fue la primera en ser identificada durante una búsqueda de nuevos miembros de las MAP cinasas (159). El gen que la codifica consta de aproximadamente 150 kilobases y contiene 28 exones, sin embargo, su transcripción es compleja, ya que existen transcritos de diversas longitudes como se ha demostrado mediante análisis de Northern blot en diferentes tejidos (149) (80). Un segundo promotor dentro del exon 1, produce un transcrito ligeramente más corto. La isoforma más larga se expresa principalmente en el corazón y músculo esquelético, así como en la mayoría de los epitelios de secreción excepto en el riñón. En este órgano la expresión de WNK1 es particular, ya que el transcrito predominante es una isoforma corta producto de un sitio alternativo de iniciación de la transcripción dentro del exón 4, que da lugar a una proteína que carece del dominio cinasa (21).

En el riñón la isoforma corta parece tener una función de regulación sobre la isoforma larga, que a su vez afecta la actividad del NCC (144) y del canal de potasio ROMK (88). Los análisis de inmunolocalización para WNK1 han demostrado una distribución membrana plasmática/citosol tejido-específica. Por ejemplo, en el riñón y en los epitelios del colon y la vejiga, su localización es citoplásmica, mientras que en los conductos biliares del hígado y en los ductos pancreáticos, se localiza principalmente en la membrana.

En el humano, el gen de WNK1 se localiza en el cromosoma 12 y codifica para una proteína de 251 KDa, compuesta de 2,382 aminoácidos. El grado de identidad de las isoformas de WNK1 entre el humano, la rata y el ratón es de ~86% (43).

WNK2

La cinasa WNK2 está compuesta por 2,216 aminoácidos y se localiza en el humano en el cromosoma 9q22.31 (149). La distribución tisular de esta isoforma no se ha analizado aún.

WNK3

En el humano, WNK3 se localiza en el cromosoma Xp11.22 y está compuesta por 1,800 residuos de aminoácidos. Su estructura genómica se publicó en el año 2003 y consiste de 24 exones en 165 Kb. Su transcripción produce dos variantes por empalme alternativo basadas en los exones 18 y 22. Mediante análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), se demostró que su expresión en el humano es ubicua, con una transcripción más abundante en cerebro y riñón (58).

WNK4

La cinasa WNK4 se encuentra codificada por 19 exones a lo largo de 16 Kb y la proteína codificada consta de 1,243 residuos de aminoácidos (155). Hasta la fecha no se han descrito variantes por empalme alternativo y a pesar de que los estudios iniciales sugerían que se expresaba únicamente en el riñón (155), con expresión citoplasmática y en las uniones intercelulares en el túbulo distal y túbulo colector; se ha demostrado que su expresión es abundante en el cerebro y en diferentes epitelios de secreción además del riñón, por ejemplo en colon, páncreas, ductos biliares y el epidídimo, en donde se localiza generalmente en las uniones intercelulares (69). Es importante hacer notar, que todos los tejidos que expresan WNK1 y WNK4 están fuertemente involucrados en el transporte de Cl⁻.

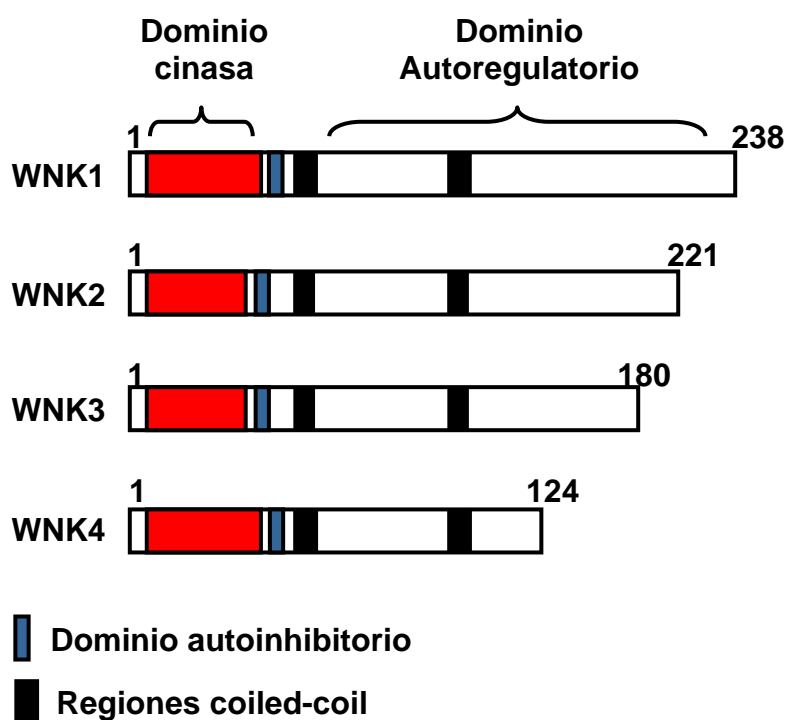


Figura 5. Topología de las cinasas WNK. Existen cuatro isoformas identificadas que en su estructura generalmente poseen un dominio cinasa, mostrado en rojo y un dominio autoinhibidor que se muestra en azul. El resto de la proteína se conoce como el dominio autoregulatorio, dentro del cual se encuentran dos dominios tipo coiled-coil mostrados en negro.

A pesar de que el porcentaje de identidad entre las WNKs es de aproximadamente 40%; los cuatro miembros presentan una topología similar (fig. 5) que consiste de un dominio cinasa altamente conservado, dividido en 12 subdominios localizado en el extremo amino terminal, un dominio autoinhibitorio conservado que regula su actividad y un dominio regulador carboxilo terminal que contiene dos regiones coiled-coil, probablemente importantes en interacciones homo o heteroméricas entre las WNKs y otras proteínas celulares. Hacia el extremo carboxilo del dominio catalítico se localiza una región de 10 aminoácidos cargados, conservados entre las 4 WNKs, conocida como región o dominio ácido. (44) (153). Generalmente, esta clase de proteínas se regulan por autoinhibición lo cual abate su actividad de cinasa, hasta que una señal de activación apropiada libera al dominio auto-inhibitorio. Las evidencias señalan que existe un control similar en las WNKs y que éste involucra su auto-fosforilación (159) (160).

El interés por el estudio de las WNKs surgió a partir del hecho de que en el humano, se encuentran involucradas en la regulación de la reabsorción de sal en el riñón y por lo tanto en el control de la presión arterial. Mutaciones en WNK1 y WNK4 se encontraron asociadas con una forma hereditaria de hipertensión dependiente de sal llamada pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHaII) o síndrome de Gordon (155). El PHaII es una enfermedad autosómica dominante que se

caracteriza por la presencia de hipertensión, hipercalemia (niveles séricos de K⁺ altos), acidosis metabólica e hipercloremia (51). Este descubrimiento provocó una amplia búsqueda de los mecanismos fisiológicos por los cuales las WNKs regulan la presión arterial (90).

Los estudios indican, que existen al menos cuatro genes involucrados en el PHAI localizados en los cromosomas 1, 12 y 17 (97) (30) (98). Wilson y cols., (155) demostraron que los genes causantes de PHAI en los cromosomas 12 y 17 corresponden a las cinasas WNK1 y WNK4, respectivamente. En el caso de la WNK1 la mutación involucra deleciones en el intron 1 que acortan el tamaño del intrón de 42 a 22 kb. La secuencia de la cinasa no se ve afectada, pero si su nivel de expresión, el cual aumenta significativamente, al perderse seguramente algún elemento de regulación negativa localizado en este intrón. El gen mutado en el cromosoma 1 aún no se ha identificado.

En el caso de pacientes con PHAI por mutaciones en el gen de WNK4, las mutaciones son del tipo puntual localizadas en todos los casos, en la región de 10 aminoácidos con carga, conocida como región ácida. El cambio de un residuo negativo por uno positivo es causante de la enfermedad (155), sin embargo, el mecanismo molecular que la produce aún no queda claro.

En el riñón, WNK4 y WNK1 fueron identificadas mediante anticuerpos específicos en el túbulo distal y el túbulo colector. Estos segmentos de la nefrona son importantes en la homeostasis del pH, la reabsorción de NaCl y la secreción del K⁺ en el organismo. El descubrimiento de las mutaciones en los genes *prkwnk1* y *prkwnk4*, junto con el hecho de su localización en la nefrona distal, parecen indicar que estas cinasas forman parte de un nueva vía de señalización, relacionada con el control de la presión sanguínea y la homeostasis de los electrolitos. La regulación de las cinasas, los efectores y reguladores de la vía, así como los mecanismos causantes de la enfermedad, aún no se conocen totalmente, sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo múltiples estudios en los que se ha analizado el papel fisiológico y fisiopatológico de la WNK1 y 4.

Los estudios iniciales para definir las bases genéticas del PHAI se enfocaron en el cotransportador de Na⁺-Cl⁻ sensible a los diuréticos tipo tiazidas (NCC), debido a dos razones principales. La primera es que el fenotipo del PHAI se corrige por completo con el tratamiento con diuréticos tipo tiazidas, los cuales inhiben específicamente al NCC (50) y la segunda razón es que el fenotipo del PHAI es la imagen en espejo del síndrome de Gitelman, una enfermedad de herencia autosómica originada por mutaciones de pérdida de función en el NCC (136). Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que las WNK regulen la función del NCC y que al alterarse esta regulación resulte en hiperfunción del NCC y el consecuente desarrollo de hipertensión. Los estudios de nuestro laboratorio así como los de Ellison y col., (156) (163), demostraron que en efecto WNK4 regula la actividad del NCC. Como se muestra en la figura 6, cuando el transportador se co-expresó en ovocitos de *X. laevis* junto con WNK4, la captación de Na⁺ mediada por el NCC disminuyó en más del 70% comparada con ovocitos inyectados únicamente

con el NCC. Los experimentos realizados con la proteína verde fluorescente unida al NCC y de inmunodetección del NCC en la superficie celular, mostraron que el efecto de WNK4 sobre el NCC está mediado en gran parte por la reducción en la llegada del cotransportador a la membrana plasmática del ovocito. Este efecto fue dependiente de la actividad cinasa, ya que al co-inyectar una mutante de WNK4 sin actividad cinasa, no se produjo ninguna reducción en la función del NCC (156). Cuando se analizó el efecto de las mutaciones de PHAI, éstas eliminaron tanto la inhibición del NCC por WNK4, como la reducción en la expresión del transportador en la membrana. A estas observaciones le siguieron aquellas realizadas en el canal de potasio ROMK y en las claudinas. Utilizando una estrategia similar en ovocitos de *X. laevis*, Kahle y cols., (73) observaron que WNK4 inhibe la función de ROMK y que las mutaciones de WNK4 incrementan la inhibición del canal. El mecanismo no depende de la actividad cinasa de WNK4 y al parecer resulta de la regulación de la expresión de ROMK en la membrana celular por un mecanismo relacionado con la internalización de vesículas vía clatrina. En el caso de las claudinas 1, 2, 3 y 4, consideradas como transportadores paracelulares de cloro, se ha observado que la WNK4 incrementa su función y que las mutaciones de tipo PHAI tienen un efecto positivo, de tipo ganancia en la función (70). Por lo tanto, la propuesta que se acepta en este momento es que la WNK4 inhibe la función del NCC, estimula el tráfico de ROMK e induce la actividad de las claudinas. Las mutaciones de tipo PHAI en WNK4 resultan en pérdida de la función inhibidora del NCC. La consecuencia de esto es el aumento en la tasa de reabsorción de sal con el consecuente desarrollo de hipertensión arterial, mientras que las mutaciones de tipo PHAI en WNK4 al producir ganancia en la función sobre la inhibición de ROMK y la estimulación de las claudinas, resultan en disminución de la secreción de potasio en el túbulo colector, con el consecuente desarrollo de la hipercalemia (43).

A diferencia de WNK4, en la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento, WNK1 no ha mostrado tener efecto directo sobre el NCC u otros sistemas de transporte de la nefrona distal. Al parecer, WNK1 posee un efecto indirecto a través de su interacción y regulación con otras cinasas, incluyendo a WNK4. Por ejemplo, en ensayos de expresión heteróloga del NCC en ovocitos de *X. laevis* se ha observado que WNK1 no tiene efecto sobre la actividad del NCC. Sin embargo WNK1 bloquea el efecto inhibitorio de WNK4 sobre el NCC, es decir, WNK1 inhibe a WNK4 (162) (164). De hecho, se ha observado que existe interacción entre WNK1 y WNK4 y que la actividad de WNK1 regula la auto-fosforilación de WNK4 (90) (162). Asimismo, recientemente se ha observado tanto a nivel bioquímico (108) (150) como funcional (39) que WNK1 regula la actividad de las cinasas SPAK y OSR1. Estas cinasas pertenecen al grupo de las cinasas STE-20 (Ste-20 related proline-alanine-rich kinase) (140) y en los últimos años se ha obtenido evidencia de que interaccionan y regulan la función de algunos miembros de la familia de los CEN (121) (31), particularmente la del NKCC1. Es decir que las evidencias recientes sugieren que WNK1 regula la actividad de los CEN a través de la interacción con SPAK y OSR1.

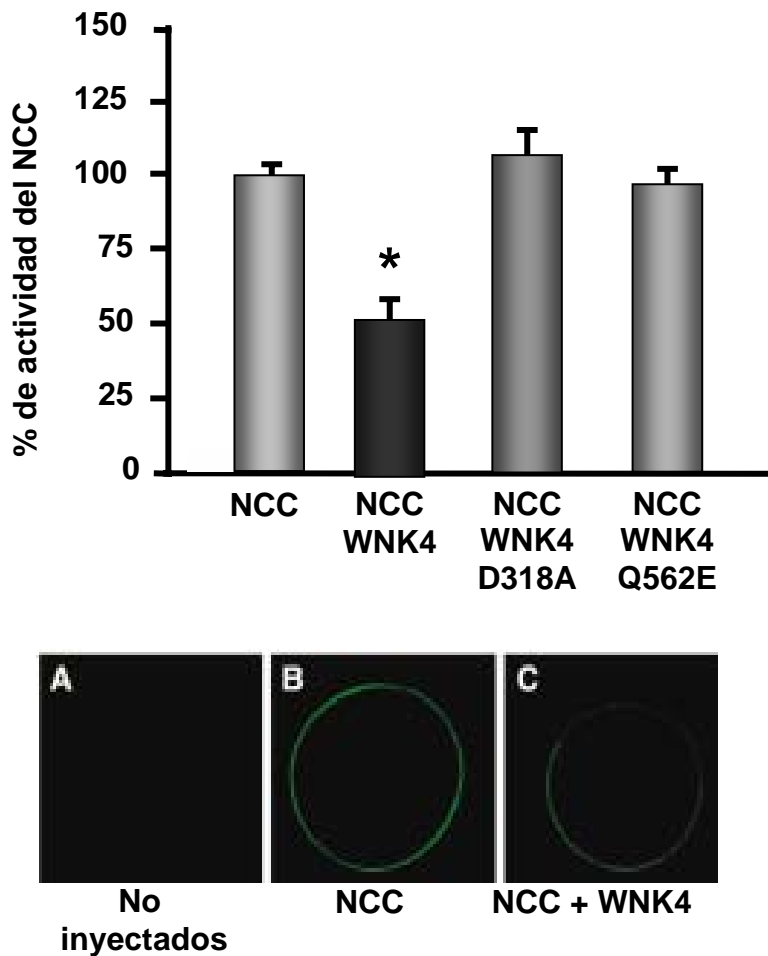


Figura 6. Efecto de WNK4 en la actividad (panel superior) y expresión (panel inferior) del NCC. En ovocitos de *X. laevis*. Los ovocitos se inyectaron con el cRNA de WNK4 silvestre, una mutante sin actividad cinasa (WNK4 D318A) o una mutante de PHAII (WNK4 Q562E). WNK4 inhibe significativamente la actividad de NCC, siendo este efecto dependiente de su actividad catalítica. Mientras que en presencia de la mutante de PHAII, WNK4 deja de inhibirlo. El efecto de esta cinasa se ve reflejado en la expresión del cotransportador marcado con la proteína verde fluorescente, en la membrana del ovocito. Mediante microscopía confocal, se observa que la inhibición de la función del NCC, esta relacionada con una reducción de su expresión en la membrana celular (156).

REGULACIÓN DE LOS CEN A TRAVÉS DE SPAK

Como se mencionó en el párrafo anterior, recientemente se ha observado que la regulación de las WNKs sobre los CEN, podría estar mediada por las cinasas SPAK y OSR1. La cinasa SPAK se clonó en el año 2000 por el grupo de DeAizpurua a partir de una línea celular de páncreas de rata en un estudio en el que se buscaba identificar la expresión de proteínas cinasas involucradas en el desarrollo de células β pancreáticas (177). SPAK es un miembro de la familia de las serina-treonina cinasas STE20. Los estudios en levaduras y en células de mamífero, indican que estas cinasas funcionan corriente arriba de las MAP cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK), donde regulan la activación de las cinasas que responden a estrés, particularmente a través de la vía de JNK/SAPK en mamíferos (18). En el humano, SPAK codifica para una proteína ubicua de 547 aminoácidos, con un peso molecular de 59,641 Da. Posee un dominio catalítico en el extremo amino, que contiene además una región rica en repeticiones de prolina y alanina denominada caja PAPA. El extremo carboxilo de la proteína, posee una secuencia polibásica (RAKKVRR),

homologa a la señal canónica de localización nuclear del antígeno SV40 T. Existe también una región ácida, donde convergen el dominio catalítico y el extremo carboxilo, dentro de la cual se localiza un sitio de reconocimiento para caspasas y una región relativamente larga, que interacciona con motivos R/KFxV/I de diversas proteínas (178) (40).

Las cinasas STE20 se dividen en dos subgrupos, las cinasas PAK que se caracterizan por la presencia de un dominio catalítico en el extremo carboxilo y las cinasas GCKs, cuyo dominio catalítico se localiza en el extremo amino. Las GCKs, están a su vez divididas en ocho subfamilias, la subfamilia seis: GCK6, esta compuesta por las cinasas SPAK y OSR1 (Oxidative stress response 1). Estas cinasas, comparten 66% de identidad en sus secuencias de aminoácidos y poseen una región carboxilo corta y altamente conservada, la cual se ha demostrado que constituye un dominio crítico para la interacción con los motivos RFXV de diversas proteínas involucradas en sistemas de transporte membranal, como los son los cotransportadores electroneutros (178) y los canales de cloro.

En la interacción de WNK1 y WNK4 con SPAK, las evidencias sugieren que esta última actúa como una proteína de andamiaje entre las WNKs y los CEN (179). A través de un análisis realizado con la secuencia de aminoácidos de NKCC1, NKCC2 y KCC3 se encontró que existe en estas proteínas, una secuencia consenso que actúa como motivo de unión para SPAK. Particularmente la interacción de SPAK con NKCC1 se demostró mediante un ensayo de doble híbrido. Con esta evidencia se realizaron experimentos que demostraron que SPAK fosforila directamente regiones reguladoras en el extremo N-terminal del NKCC1, NKCC2 y NCC y que esta fosforilación varía en intensidad en presencia de diferentes cambios de osmolaridad del medio extracelular. La actividad de SPAK y WNK4 sobre los CEN es dependiente de su actividad catalítica, ya que al mutarla para eliminar la actividad cinasa, el efecto regulador se pierde (180) (31). Lo anterior sugiere que la respuesta de los CEN a los cambios en la tonicidad, podría estar mediada por una vía en la cual participan SPAK y WNKs, contribuyendo así a la regulación de la concentración iónica intracelular. De esta manera la regulación del transporte de iones, podría ser una de las principales funciones de SPAK.

Vitari y colaboradores, (150) encontraron que SPAK y OSR1 interactúan específicamente con WNK1 y WNK4, demostraron que SPAK y OSR1 son activadas y fosforiladas por las WNKs. Tanto WNK1 como WNK4 fosforilan a SPAK y a OSR1 en los residuos Ser³⁷³ y Ser³²⁵ respectivamente. Cuando estos residuos de serina fueron mutados por alaninas, la activación de las STE20 por parte de WNK1 y 4 se perdió por completo. De manera tal, que SPAK constituye el blanco de al menos 2 cinasas corriente arriba: WNK4 y WNK1. Asimismo, la fosforilación por parte de estas cinasas, parece ocurrir de manera específica (39). Recientemente se han publicado experimentos donde se co-expresaron diferentes combinaciones de WNK4, SPAK y NKCC1 en ovocitos de rana *Xenopus laevis* bajo distintas condiciones osmóticas. Cuando se midió la función del NKCC1 en presencia de SPAK o WNK4 solos, no hubo diferencia en la

actividad del transportador. Sin embargo cuando se combinaron WNK4, SPAK y NKCC1, se observó una activación significativa del cotransportador, es decir que ambas proteínas son necesarias para regular la función del NKCC1 en esta vía de señalización (fig 7).

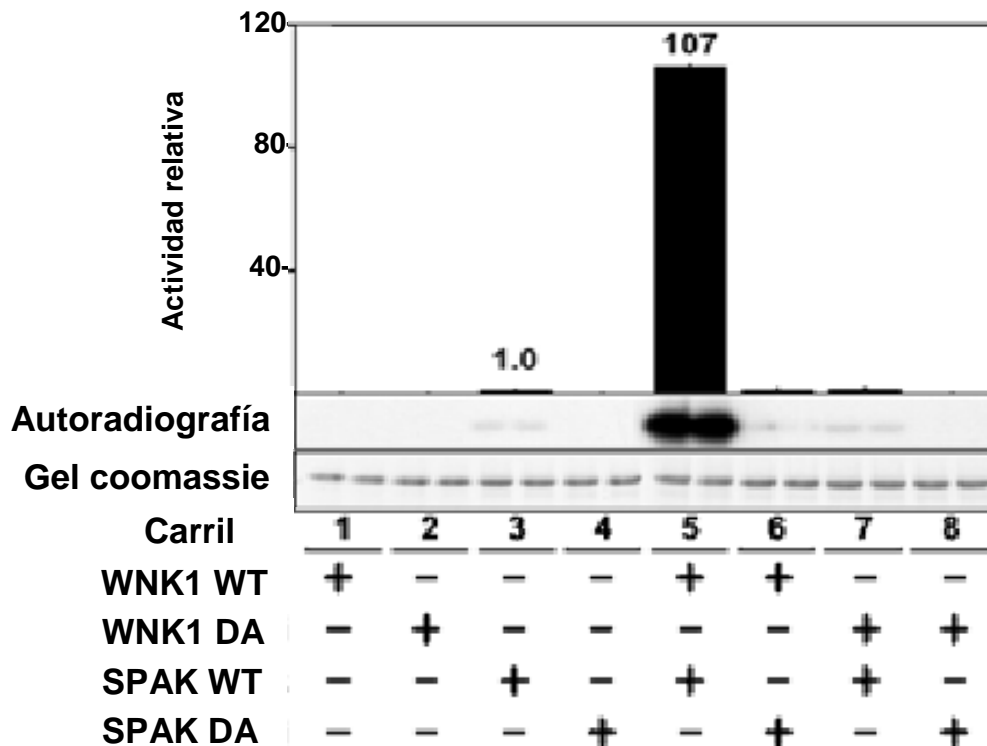


Figura 7. Activación de SPAK por WNK1. Las formas silvestres (WT) o catalíticamente inactivas de ambas cinasas, se probaron en las diferentes combinaciones que se muestran. La actividad de SPAK se evaluó mediante la fosforilación y activación del NKCC1, mediante autoradiografía de la banda del gel de coomassie. El transportador se activa y se fosforila únicamente en presencia de ambas cinasas en su forma silvestre (150)

Los resultados anteriores sugieren que SPAK actúa como una proteína de andamiaje o intermediaria entre el mecanismo sensor de la osmolaridad y/o el mecanismo sensor de la concentración intracelular de cloro y las proteínas efectoras de los cambios adaptativos al medio extracelular, en este caso los CEN.

La interacción entre SPAK y los CEN es mediada por un motivo de unión constituido por la secuencia consenso [R/K]Fx[V/I] (donde x representa cualquier aminoácido). Lo anterior se corroboró ya que mutaciones en esta secuencia provocaron que las cinasas coexpresadas (SPAK y WNKs) con el cotransportador perdieran el efecto regulador sobre el mismo. Cuando se evaluó el efecto de las mutantes en la interacción con NKCC1 mediante ensayos de doble híbrido, se demostró que la interacción con SPAK se perdía completamente (121)

En el 2007, Delpire y Gagnon (180), analizaron el alineamiento de la secuencia de unión a SPAK y OSR1 de 12 proteínas y tomando en cuenta la posición de los aminoácidos y la

frecuencia con la que aparecían, realizaron un análisis en la base de datos del NCBI, en busca de proteínas que presentaran este sitio en sus secuencias. La búsqueda se realizó en los genomas del ratón, del humano, del pez zebra, de la mosca de la fruta y del nemátodo. La búsqueda resultó en la identificación de 131 proteínas en el ratón que contienen el dominio de unión a SPAK/OSR1, de las cuales, más del 50% fueron identificadas también en el humano. Dos tercios de estas proteínas, se encuentran involucradas en funciones celulares de transporte, funciones enzimáticas, funciones de citoesqueleto, funciones nucleares, y funciones ribosomales entre otras. Lo que sugiere que tanto SPAK como OSR1, podrían poseer un papel fisiológico mayor al que se habían asociado. Sin embargo, se requieren aún análisis experimentales para determinar que en efecto las proteínas identificadas, interactúan con estas cinasas. A este respecto, dentro de las cinasas identificadas que poseen sitios de unión a SPAK/OSR1, se encuentran las WNKs. WNK1, posee 2 motivos de unión, mientras que WNK2, WNK3 y WNK4 presentan únicamente un sitio. Las evidencias mencionadas anteriormente, demuestran que SPAK es fosforilada por WNK1 y WNK4 y que esta a su vez regula la actividad de NKCC1, NKCC2 y NCC.

Debido a que las cinasas WNK1 y WNK4 son las causantes del PHAII, se han estudiado con mucho más intensidad que WNK2 y WNK3. En el laboratorio, decidimos realizar la caracterización del efecto de WNK3 sobre la actividad funcional de los cotransportadores electroneutros. Los resultados obtenidos a partir de este análisis constituyen el objetivo y contenido del presente estudio. Nuestros resultados sugieren que la regulación que ejerce WNK3 sobre los CEN tiene implicaciones importantes en la regulación del volumen celular, en la excitabilidad neuronal y en la regulación de la presión arterial.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la cinasa WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores electroneutros y las implicaciones de esta regulación sobre las principales funciones de estos transportadores.

Objetivos particulares

- Analizar el papel de la defosforilación por las proteínas fosfatasas en la regulación de la función de los KCCs por WNK3.
- Evaluar si WNK3 regula la actividad de los cotransportadores de K-Cl, a través de la interacción con la cinasa SPAK.
- Caracterizar las interacciones proteína-proteína entre WNK3, las proteínas fosfatasas y los KCCs.

HIPÓTESIS

La cinasa WNK3 regula la actividad de los cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloro, alterando su estado de fosforilación y defosforilación a través de la interacción con ciertas proteínas reguladoras.

METODOLOGÍA

Parte de la metodología utilizada en el desarrollo de esta tesis se encuentra descrita en los artículos correspondientes. En cuanto a la metodología empleada en la última parte del proyecto, que contiene resultados aún no publicados, es la que se explica a continuación.

Mutagénesis Sitio-Dirigida

La secuencia de aminoácidos de WNK3 se analizó con el programa de computadora DNASTar, empleando el módulo EditSeq, con el fin de identificar posibles motivos de unión de SPAK de acuerdo a la secuencia [R/K]Fx[V/I] (121). Los 3 motivos identificados fueron mutados mediante la técnica de mutagénesis dirigida empleando el estuche comercial de Stratagene “Quick Change[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cambios en la secuencia se realizaron tanto en la secuencia de WNK3 silvestre, como en la de WNK3 D294A (WNK3 DA).

Para llevar a cabo la mutación, se diseñaron 3 pares de oligos específicos con la mutación deseada; un par para cada motivo. La mutación en todos los casos, consistió en cambiar el aminoácido fenilalanina del motivo de unión, por una alanina, con el fin de interrumpir así la interacción entre SPAK y WNK3.

El cambio de aminoácido se realizó mediante una única reacción en cadena de la polimerasa (PCR), al término de la cual, el DNA complementario (cDNA) mutado se empleó para transformar bacterias XL10[®]-Gold. Posteriormente el cDNA obtenido a partir de las clonas transformantes, fue secuenciado automáticamente con el fin de corroborar las mutaciones. Las clonas generadas se denominaron WNK3 F242A, WNK3 F745A y WNK3 F1337A y WNK3 DA F242A, WNK3 DA F745A y WNK3 DA F1337A. A partir de estas mutantes sencillas, utilizando los mismos oligos, se generaron mutantes dobles, es decir clonas con 2 sitios de unión a SPAK mutados. En este caso, el cDNA obtenido a partir de la primera reacción de mutagénesis, se empleó como el templado para una segunda ronda de PCR, empleando el procedimiento antes mencionado. Las clonas generadas se nombraron WNK3 F242A, F1337A y WNK3 F745A, F1337A.

Posteriormente, se realizó la síntesis *in vitro* del RNA complementario (cRNA) empleando el estuche comercial de AMBION “RNA mMESSAGE mMACHINE[®] T7”, diseñado específicamente para sintetizar RNAc para inyección en ovocitos de *X. laevis*.

El RNAc se sintetizó a partir del DNAc de cada clona previamente linearizada en el extremo 3' con la enzima de restricción apropiada. La calidad del RNAc se corroboró mediante gel de agarosa/formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta. La concentración de ambos RNAs se determinó por espectrofotometría de luz ultravioleta a 260nm con un espectrofotómetro Beckman DU640. El RNAc de estas clonas se microinyectó en ovocitos de *Xenopus laevis*, junto con el RNAc del flag-KCC4 ó KCC3 para realizar ensayos de expresión funcional en condiciones isotónicas e hipotónicas.

Extracción, preparación e inyección de ovocitos de rana *Xenopus laevis*.

La expresión funcional de los cotransportadores y el efecto de la WNK3 silvestre, WNK3 DA y/o las mutantes se llevó a cabo en ovocitos de *Xenopus laevis*. Esta metodología se encuentra descrita con detalle en los artículos publicados, adjuntos en la parte de resultados del presente estudio. En breve, los ovocitos se obtienen de ranas hembras maduras mediante cirugía. Se incuban en colagenasa B (2mg/ml) y solución Ringer de rana durante 1 hora y después se defoliculan manualmente. Posteriormente se incuban durante una noche a 18°C en sol. Ringer de rana y al día siguiente se inyectan con 50 nl de agua (control) o el cRNA del cotransportador a estudiar, solo o junto con el cRNA de la cinasa WNK3 silvestre o mutada. Posteriormente, los ovocitos se incuban de 3 a 4 días en sol. Ringer de rana a 18°C, al término de los cuales son expuestos a los ensayos de captación para conocer la actividad de los cotransportadores.

Ensayos de captación

Debido a que los cotransportadores son electroneutros, la actividad de estos no puede evaluarse mediante cambios de voltaje en la membrana del ovocito. Así

que la actividad de los CEN se mide a través de la captación de iones radioactivos. El ión utilizado en este caso fue el $^{86}\text{Rb}^+$ ya que este, atraviesa las membranas celulares por las mismas vías que el K^+ . Nuevamente el protocolo detallado puede revisarse en los artículos publicados. En breve: la actividad de los KCCs se mide como la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ que sea dependiente de Cl^- , en ausencia de Na^+ extracelular. La captación se determina tanto en condiciones isotónicas, como hipotónicas en presencia de 10 mM de K^+ y 50 mM de Cl^- . En todos los experimentos se mide la captación en grupos paralelos de ovocitos en ausencia o presencia de cloro extracelular. Cada grupo está compuesto de 10 a 15 ovocitos y cada observación se estudia en cuando menos tres experimentos diferentes para demostrar reproducibilidad. En todos los casos hay un periodo de pre-captación de 30 minutos en donde los ovocitos son expuestos a las condiciones en que se medirá la captación (tipo de iones, presencia del inhibidor, etc), sin agregar el ión radioactivo. Posteriormente, en un período de captación de una hora, se agrega el ión radioactivo ($^{86}\text{Rb}^+$). Al término de esta hora, los ovocitos son lavados cinco veces en una solución fría (4°C), sin radioactivo. Posteriormente se colocan en forma individual en viales de centelleo con SDS al 10% para lisar al ovocito y determinar la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ para cada ovocito por medio de un contador de centelleo β . El resultado se expresa como la captación del ion radioactivo en pmol/ovocito/h.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir del análisis del efecto de la cinasa WNK3 sobre los cotransportadores electroneutros, dieron lugar a 4 publicaciones. Estos artículos se encuentran adjuntos a continuación y constituyen la parte central de la presente tesis.

En estos resultados se incluyen el efecto de la cinasa WNK3 sobre todos los miembros de la familia de los CEN, con lo cual se abarca el objetivo general del presente estudio. Posteriormente, como parte de los objetivos particulares, tanto el papel de la cinasa SPAK, como la caracterización de las interacciones entre WNK3 y SPAK, se enfocó exclusivamente en los KCCs. Los resultados obtenidos a partir de estos objetivos particulares, aún no han sido publicados, por lo que se encuentran descritos en seguida de las publicaciones.

A lo largo de las publicaciones, se encontrarán los resultados descritos de manera clara y extensa. Sin embargo, al final de esta tesis, se incluye una amplia discusión de los mismos.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl-cotransporters required for normal blood pressure homeostasis.

Rinehart J, Kahle KT, de los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G y Lifton RP. (2005). **Proc Natl Acad Sci U S A** 102: 16777-16782.

2. WNK3 modulates transport of Cl- in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability.

Kahle KT, Rinehart J, de los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I y Lifton RP. (2005). **Proc Natl Acad Sci U S A** 102: 16783-16788.

3. WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway.

de los Heros P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, Mount DB, Lifton RP, Hebert SC y Gamba G. (2006). **Proc Natl Acad Sci U S A** 103: 1976-1981.

4. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases.

Ponce-Coria J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de los Heros P, Juárez P, Muñoz E, Michel G, Bobadilla NA, Gimenez I, Lifton RP, Hebert SC y Gamba G. (2008). **Proc Natl Acad Sci U S A** 105: 8458-8463.

WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis

Jesse Rinehart^{*†}, Kristopher T. Kahle^{*†‡}, Paola de los Heros^{†§}, Norma Vazquez[§], Patricia Meade[¶], Frederick H. Wilson^{*}, Steven C. Hebert[‡], Ignacio Gimenez^{¶||}, Gerardo Gamba^{§||}, and Richard P. Lifton^{*||}

Departments of ^{*}Genetics and [‡]Molecular and Cellular Physiology, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510; [§]Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, 14000, Mexico; and [¶]Department of Pharmacology and Physiology, School of Medicine, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

Contributed by Richard P. Lifton, September 26, 2005

WNK1 and WNK4 [WNK, with no lysine (K)] are serine–threonine kinases that function as molecular switches, eliciting coordinated effects on diverse ion transport pathways to maintain homeostasis during physiological perturbation. Gain-of-function mutations in either of these genes cause an inherited syndrome featuring hypertension and hyperkalemia due to increased renal NaCl reabsorption and decreased K⁺ secretion. Here, we reveal unique biochemical and functional properties of WNK3, a related member of the WNK kinase family. Unlike WNK1 and WNK4, WNK3 is expressed throughout the nephron, predominantly at intercellular junctions. Because WNK4 is a potent inhibitor of members of the cation-cotransporter *SLC12A* family, we used coexpression studies in *Xenopus* oocytes to investigate the effect of WNK3 on NCC and NKCC2, related kidney-specific transporters that mediate apical NaCl reabsorption in the thick ascending limb and distal convoluted tubule, respectively. In contrast to WNK4's inhibitory activity, kinase-active WNK3 is a potent activator of both NKCC2 and NCC-mediated transport. Conversely, in its kinase-inactive state, WNK3 is a potent inhibitor of NKCC2 and NCC activity. WNK3 regulates the activity of these transporters by altering their expression at the plasma membrane. Wild-type WNK3 increases and kinase-inactive WNK3 decreases NKCC2 phosphorylation at Thr-184 and Thr-189, sites required for the vasopressin-mediated plasmalemmal translocation and activation of NKCC2 *in vivo*. The effects of WNK3 on these transporters and their coexpression in renal epithelia implicate WNK3 in NaCl, water, and blood pressure homeostasis, perhaps via signaling downstream of vasopressin.

hypertension | ion transport | protein serine–threonine kinases

In the kidney, the regulation of net renal NaCl reabsorption is a major determinant of blood pressure and is the product of the coordinated function of diverse transcellular and paracellular electrolyte transport pathways distributed along the nephron (1). A key step in this process is the apical entry of Na⁺ with or without Cl⁻. In the thick ascending limb of Henle (TAL) and the distal convoluted tubule (DCT), this is mediated by related kidney-specific electroneutral cation/Cl⁻ cotransporters, the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 (encoded by *SLC12A1*) in the TAL and the Na-Cl cotransporter NCC (encoded by *SLC12A3*) in the DCT. The unrelated epithelial Na⁺ channel (ENaC; encoded by *SCNN1A*, *SCNN1B*, and *SCNN1G*) mediates electrogenic Na⁺ reabsorption in the connecting tubule and collecting duct (CD); ENaC activity is accompanied by paracellular Cl⁻ reabsorption and secretion of K⁺ and H⁺ in these nephron segments. Inherited variation in the activities of these flux mediators or their regulators alters blood pressure in humans, with increased or decreased net NaCl reabsorption raising or lowering blood pressure (1). For example, loss-of-function mutations in the genes encoding NKCC2 and NCC cause Bartter's and Gitelman's syndromes, respectively, inherited disorders

featuring low blood pressure due to renal NaCl wasting (2, 3). Although a number of hormones, such as vasopressin and aldosterone, regulate these transport proteins to maintain NaCl and water and blood pressure homeostasis, the transducers that link hormonal signaling to downstream targets and the mechanisms coordinating the activities of multiple transporters and/or channels are poorly understood (4).

Genetic analysis can provide fundamental insight into the function of complex networks by identifying genes and pathways that, when mutated, disrupt the integration of normally coordinated systems (1). Recent studies have identified WNK1 and WNK4 [WNK, with no lysine (K)] (encoded by *PRKWNK1* and *PRKWNK4*, respectively) as serine–threonine protein kinases that have the biochemical properties and physiologic effects of such integrative regulators (5). Missense mutations in WNK4 cause pseudohypoaldosteronism type II (PHAII), a disease featuring hypertension and hyperkalemia (high serum K⁺ levels) due to a coupled increase in renal NaCl reabsorption and deficiency in renal K⁺ secretion (5). Subsequently, WNK4 has been shown to be a multifunctional regulator of diverse Na⁺, K⁺, and Cl⁻ flux pathways. Wild-type WNK4 is an inhibitor of NCC, NKCC1, the K⁺ channel ROMK1 (or Kir1.1; encoded by *KCNJ1*), and an activator of paracellular Cl⁻ flux; some of these effects are kinase-dependent, whereas others are independent of WNK4's catalytic activity (6–12). Importantly, disease-causing missense mutations in WNK4 cluster within a highly conserved acidic domain (5) and have sharply divergent effects on these downstream targets; PHAII mutations eliminate inhibition of NCC and increase paracellular Cl⁻ permeability, whereas simultaneously increasing inhibition of ROMK1 (6–12). Together, these effects can account for the observed increase in NaCl reabsorption and the decrease in K⁺ secretion seen in affected subjects. These findings demonstrate that WNK4 is a multifunctional molecular switch capable of having opposing effects on multiple ion flux pathways via independent mechanisms, precisely the sort of properties one would expect for an integrator of systems (13). Mutations that increase expression of WNK1 cause a similar phenotype (5). Recent evidence suggests WNK1 is an upstream regulator of WNK4 at NCC (7) and may also regulate ENaC through SGK1 (14, 15).

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

Abbreviations: PHAII, pseudohypoaldosteronism type II; WNK, with no lysine (K); DCT, distal convoluted tubule; TAL, thick ascending limb of Henle; ENaC, epithelial Na⁺ channel; CD, collecting duct; HA, hemagglutinin; ZO-1, zona-occludens-1; PCT, proximal convoluted tubule.

[†]J.R., K.T.K., and P.d.l.H. contributed equally to this work.

^{||}To whom correspondence may be addressed. E-mail: igimenez@unizar.es, gamba@biomedicas.unam.mx, or richard.lifton@yale.edu.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

WNK kinases are characterized by the substitution of cysteine for lysine at a highly conserved residue in the catalytic domain; they are found in both animal and plant species (16, 17). A total of four such kinases exist in the human genome (5, 18), each sharing significant homology in the kinase domain, an autoinhibitory domain, two putative coiled-coil domains, and a short acidic domain. To date, little is known about the two other members of the WNK kinase gene family, WNK2 and WNK3. Thus, it is unknown whether these other WNK family members act in the same pathways as WNK1 and WNK4, or whether they have broadly different functions. If operating in the same pathways, their functions could either be redundant to or different from those of WNK1 and WNK4. *WNK3* transcripts are most abundant in brain and kidney (18, 19), but the protein has not been localized, and its function has not been characterized. Herein, we show WNK3's renal localization, unique among WNK kinases, and explore its biochemical and physiologic functions. Our findings indicate that WNK3 has properties distinct from those of WNK1 and WNK4 and suggest WNK3 participates in the coordinated regulation of NKCC2 and NCC, kidney-specific cation/Cl⁻ cotransporters necessary for electrolyte and blood pressure homeostasis.

Methods

cDNA Constructs. 5' EcoRI and 3' XbaI sites were engineered into PCR primers that were used to amplify *WNK3* from a full-length human *WNK3* cDNA clone (OriGene, Rockville, MD); this amplicon was subcloned into *pGH19* (9). 5' NotI and 3' EcoRI sites and a C-terminal hemagglutinin (HA) tag were engineered into PCR primers that were used to amplify *WNK3* from the Origene *WNK3* cDNA clone, and this product was subcloned into *pCDNA3.1-* (Invitrogen). QuikChange (Stratagene) was used to introduce the D294A or Q545E mutations into *pGH19-WNK3* and *pCDNA3.1-WNK3-HA*. All constructs were verified by DNA sequencing.

pSPORT1-rNCC was used for ²²Na⁺ flux studies (20). *pSPORT1-GFP-rNCC* was used for quantitation of EGFP-NCC surface expression (6). *pSPORT1-rNKCC2* (20) was used for ⁸⁶Rb⁺ influx studies.

Antibodies. Anti-WNK3 antibody was obtained from Alpha Diagnostics (San Antonio, TX). Other antibodies used were: anti-ZO-1 (21), anti-Megalin (gift of D. Biemesderfer, Yale University, New Haven, CT), anti-E-cadherin antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-Tamm-Horsfall protein, anti-Calbindin (Swant, Bellinzona, Switzerland), anti-Aquaporin-2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-HA (Santa Cruz Biotechnology), anti-rabbit IgG (Zymed), anti-NKCC2 (T9 antibody), and anti-phospho NKCC2 (R5 antibody) (gifts of B. Forbush, Yale University), and affinity-purified secondary antibodies conjugated to the CY2, CY3, or CY5 fluorors (Jackson ImmunoResearch).

Transfections, SDS/PAGE, and Immunoblotting. Transfections of WNK3 constructs into COS-7 cells were performed by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Lysates of transfected COS-7 cells or lysates from mouse or human tissues were solubilized in sample buffer, and proteins were separated by SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose, blocked, and probed with anti-WNK3 or anti-HA (each at 1:1,000 dilution), as described (6). Membranes were then washed, incubated with secondary antibody, and processed with the enhanced chemiluminescence system (Amersham Pharmacia), as described (6).

Autophosphorylation Assays. Autophosphorylation assays were performed as described (16). WNK3-HA was expressed in COS-7 cells, and total cell lysates were incubated with anti-HA agarose beads (Santa Cruz Biotechnology). Beads were washed in lysis buffer (6) and resuspended in kinase buffer (16).

Reactions were initiated by adding beads with WNK3-HA and 5 μCi γ³²P ATP (1 Ci = 37 GBq) (Amersham Pharmacia) in kinase buffer. The reaction was incubated at 30°C for 30 min and stopped by addition of sample buffer (6). Beads with WNK3-HA were boiled in sample buffer, and phosphorylated proteins were resolved by SDS/PAGE and visualized by autoradiography.

Immunolocalization Studies. Studies were approved by the Yale University Animal Care and Use Committee. Mice were killed by cervical dislocation. Excised tissues were prepared and sectioned as described (21). Tissue sections were processed with primary and secondary antibodies and visualized by immunofluorescence or confocal microscopy (21). Results were consistent among three different mice. Anti-WNK3 immunostaining was competed with a 3-fold molar excess of the immunizing peptide; staining with secondary antibody alone revealed no signal.

Functional Assays with NCC and NKCC2. *Xenopus laevis* oocytes were harvested and injected with cRNA of *NCC* or *NKCC2* alone or together with cRNA of wild-type, kinase-dead, or PHAII-like mutant WNK3, essentially as described (8). After 4 days of incubation, metolazone-sensitive ²²Na⁺ influx (for NCC; ref. 6) or bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ influx (for NKCC2; ref. 22) was determined as described. NCC and NKCC2 measurements were performed in isotonic conditions (200–210 mM). In each experiment, ≈15 oocytes were tested in each group; results were highly reproducible across at least four independent experiments for each condition. The significance of differences between groups of oocytes was assessed by two-tailed Student's *t* test or one-way ANOVA with multiple comparisons using Bonferroni correction, as appropriate.

Surface Expression Studies. Oocytes were injected with EGFP-tagged *NCC* cRNA alone or together with wild-type or mutant WNK3 cRNAs, incubated for 3–4 days, and membrane surface expression of GFP-NCC was assayed by laser-scanning confocal microscopy as described (6, 23). Total membrane fluorescence intensity was calculated for each imaged oocyte by using SIGMASCAN PRO software (Jandel, San Rafael, CA; ref. 6). GFP-NCC results are data combined from four experiments; >12 oocytes were injected per experimental group, and each experiment used oocytes from a different frog. For each injection series, the mean fluorescence value for GFP-NCC alone was set at 100%, and other values were expressed as percentage of this value. The significance of differences between groups was assessed by two-tailed Student's *t* test.

NKCC2 Phospho-Protein Studies. For phospho-protein analysis, oocytes injected with indicated constructs were incubated as described above and exposed to an extracellular tonicity of either 200 or 380 mosM; the higher osmolarity was achieved by addition of sucrose to the medium. At the end of the incubation period, four oocytes per group were immediately homogenized by pipetting in 100 μl of ice-cold antiphosphatase solution: 150 mM NaCl/30 mM NaF/5 mM EDTA/15 mM Na₂HPO₄/15 mM pyrophosphate/20 mM Hepes, pH 7.2) with 1% Triton X-100 and a protease inhibitor mixture. The homogenate was cleared by centrifugation and supernatants collected for Western blot analysis. The equivalent of 6 μl of lysate was loaded per lane. The previously characterized anti-NKCC2 antibody T9 and the antiphospho-NKCC2 antibody R5 (24, 25) were used to detect total and phosphorylated NKCC2, respectively.

Results

WNK3 Localizes to Intercellular Junctions Throughout the Nephron. WNK3 transcripts are expressed in kidney (19). We explored the cellular and subcellular renal localization of WNK3. Light

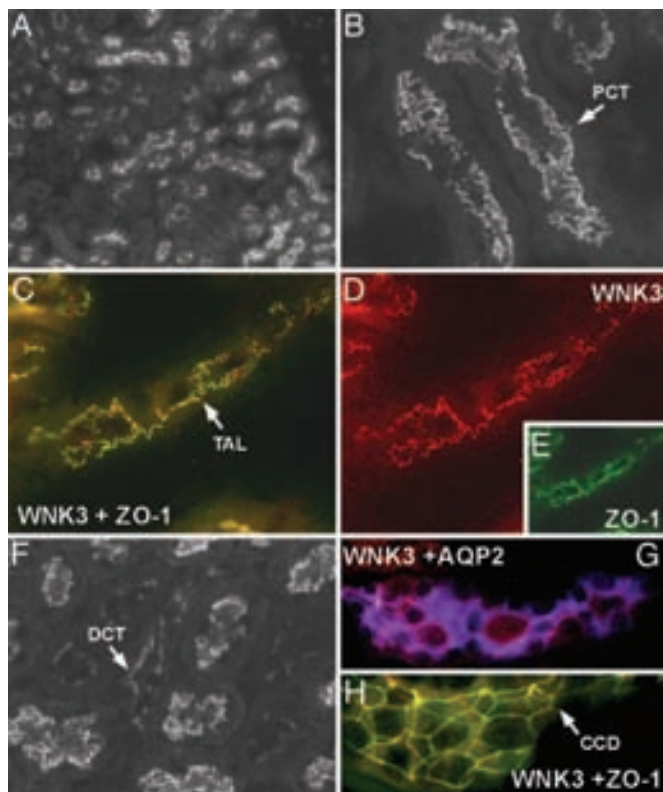


Fig. 1. WNK3 is expressed at intercellular junctions along the nephron. Frozen mouse kidney sections were stained with anti-WNK3 antibody as described in *Methods* and visualized with immunofluorescence light microscopy. (A) WNK3 is present in all nephron segments. Low-power view of renal tubules in cross section stained with anti-WNK3 antibody reveals expression of WNK3 in all nephron segments. It is apparent that WNK3 predominantly localizes to intercellular junctions. (Original magnification, $\times 200$.) (B) WNK3 expression in PCT. Tubule segments were stained with anti-WNK3 antibody and identified by costaining adjacent sections with anti-Megalyn antibody, a PCT marker (not shown). (Original magnification, $\times 630$.) (C–E) WNK3 (red) and ZO-1 (green) immunostaining in the TAL. Tubule segments were determined by costaining experiments with anti-WNK3 and anti-Tamm-Horsfall protein, a TAL marker (data not shown). WNK3 staining overlaps with ZO-1, a marker of tight junctions. (Original magnification, $\times 630$.) (F) WNK3 expression in the DCT and connecting tubule (CNT), as determined by costaining experiments with anti-WNK3 and anti-Calbindin D-28K, a DCT/CNT marker (data not shown). (Original magnification, $\times 400$.) (G) WNK3 expression in the cortical CD (CCD), determined by costaining with anti-WNK3 (red) and anti-Aquaporin-2 (AQP2), a CCD marker (blue). (Original magnification, $\times 630$.) (H) WNK3 (red) and ZO-1 (green) immunostaining in the CCD. Tubule segments were determined by costaining experiments with anti-WNK3 and anti-AQP2. WNK3 staining overlaps with ZO-1, a marker of tight junctions. (Original magnification, $\times 700$.)

immunofluorescence microscopy of kidney sections stained with an antibody specific for WNK3 (Fig. 5, which is published as supporting information on the PNAS web site) revealed that WNK3, like WNK1 and WNK4, is confined to nephrons and localizes predominantly to intercellular junctions, as demonstrated by its colocalization with zona-occludens-1 (ZO-1), a tight junction protein (Fig. 1). Although WNK1 and WNK4 are confined to the distal nephron (DCT and CD) (5), WNK3 is present in all nephron segments (Fig. 1A), with highest expression in the proximal convoluted tubule (PCT, Fig. 1B) and TAL (Fig. 1C–E), and lower levels of expression in the DCT and CD (Fig. 1F–H), as demonstrated by costaining experiments with antibodies that serve as markers of these nephron segments (see *Methods*). Confocal immunofluorescence microscopy of anti-WNK3-stained kidney sections demonstrates that WNK3 ex-

pression extends along the lateral membrane from the level of the tight junction to the adherens junction in all nephron segments (Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site).

WNK3 Is an Active Kinase. To examine WNK3's potential kinase activity, HA-tagged WNK3 was expressed in COS-7 cells and immunoprecipitated from cell lysates (see *Methods*). Incubation of immunoprecipitated WNK3 with $\gamma^{32}\text{P}$ -labeled ATP, followed by electrophoresis, revealed phospholabeling of a ≈ 200 -kDa protein, the expected size of WNK3 (Fig. 2A). The experiment was repeated with a WNK3 mutant harboring a missense mutation in its catalytic domain (WNK3-D294A); aspartate at this position is highly conserved among kinases because of its role in Mg^{2+} binding, and alanine substitution at this site impairs the catalytic activity of WNK1 and other kinases (16, 17). WNK3-D294A shows virtually no autophosphorylation, indicating the dependence of phospholabeling on WNK3's kinase activity (Fig. 2A). In contrast, a Q545E missense mutation in WNK3 that mimics a PHAII-causing mutation in WNK4 (5) does not alter the phospholabeling of WNK3 (Fig. 2A). These observations establish WNK3's kinase activity and validate the use of these kinase-active and -inactive ("dead") forms of WNK3 in subsequent experiments.

WNK3 Regulates NCC and NKCC2 by Altering Their Surface Expression.

The discrete localization of WNK3 to nephrons, along with its localization to Cl^- transporting epithelia outside the kidney (see Kahle *et al.*, ref. 26) and the genetic and physiologic evidence that WNK1 and WNK4 modulate the activity of a number of mediators of electrolyte flux *in vivo*, suggests specific potential targets of WNK3 function. In particular, members of the *SLC12A* family of cation/ Cl^- cotransporters are of interest, because they are known to play important roles in the entry and/or exit of Na^+ , K^+ , and Cl^- in kidney epithelia, and WNK4 regulates a number of different *SLC12A* members (13).

Guided by these considerations, we investigated the effect of WNK3 on NCC and NKCC2, kidney-specific *SLC12A* transporters that mediate apical NaCl reabsorption in the TAL and DCT, respectively, sites that express WNK3. In each case, wild-type WNK3 and WNK3 harboring the D294A mutation (kinase-inactive WNK3) were tested for their effects using coexpression studies in *X. laevis* oocytes, a well characterized system that has been used for the functional cloning and physiologic characterization of these transport proteins and has also proved useful for defining the mechanisms of their regulation (20). We also tested the effect of a WNK3 mutant harboring the Q565E mutation, which mimics a mutation that causes PHAII in WNK4 (PHAII-like WNK3).

In contrast to WNK4's inhibitory effect on NCC in oocytes (6, 7, 12), coexpression of WNK3 with NCC led to a dramatic >3 -fold increase in NCC activity, as measured by metolazone-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake ($P < 10^{-6}$, Fig. 2B). Surprisingly, kinase-dead WNK3 not only failed to increase NCC activity but also markedly inhibited NCC activity by $\approx 85\%$ ($P < 10^{-6}$; Fig. 2B). In contrast, a PHAII-like WNK3 mutant behaved like wild-type WNK3 on NCC (Fig. 2B). Similar effects on $^{22}\text{Na}^+$ influx were seen when WNK3 constructs were coexpressed with NCC tagged with EGFP-NCC (data not shown).

WNK3's modulation of NCC activity is achieved by altering the localization of NCC at the plasma membrane. Coexpression of WNK3 with GFP-NCC increased GFP-NCC surface expression ≈ 3 -fold ($P < 10^{-6}$, Fig. 2C), whereas kinase-dead WNK3 had the opposite effect, decreasing GFP-NCC by 80% ($P < 10^{-6}$, Fig. 2C and D). Thus, WNK3 is a potent regulator of NCC activity, increasing NCC surface expression in its kinase-active state but decreasing NCC surface expression when catalytically inactive.

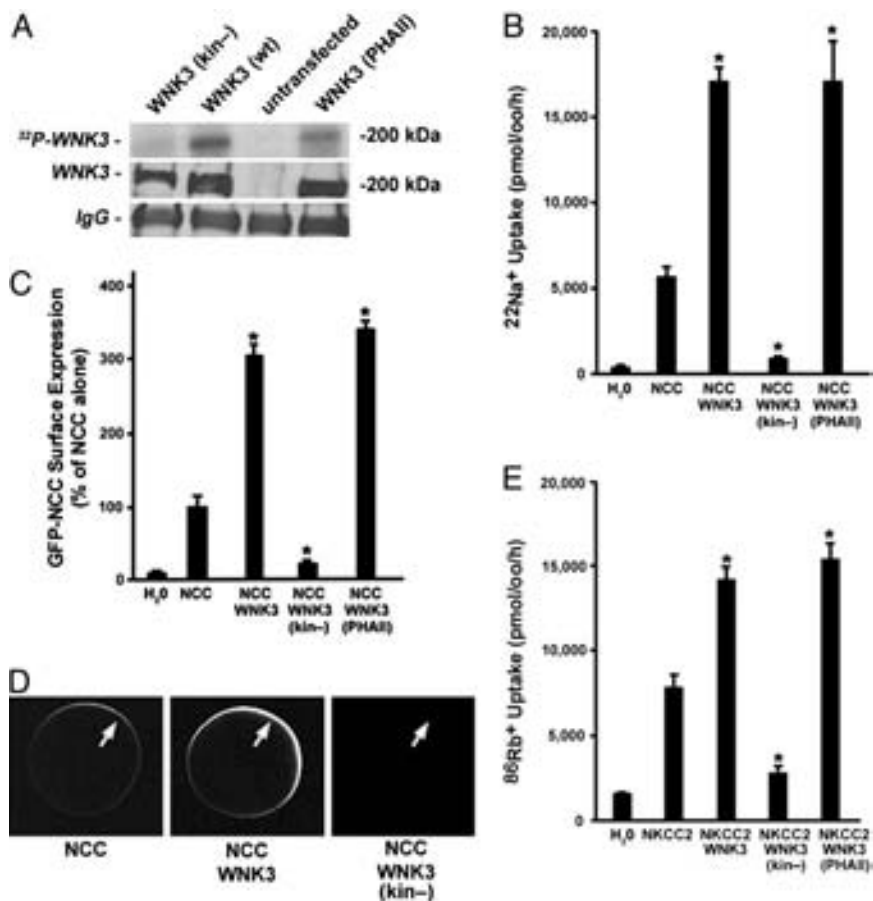


Fig. 2. WNK3 kinase regulates the renal NCC and NKCC2 cotransporters. (A) WNK3 is an active kinase. Wild-type WNK3 (WT), kinase-dead WNK3 (kin⁻), and PHAII-like mutant WNK3 constructs were tagged with HA and expressed in COS-7 cells, purified by immunoprecipitation, and incubated with γ -³²P ATP. The products were separated by SDS/PAGE, exposed to film, and also separately stained with anti-HA antibodies. Phosphorylated WNK3 (³²P-WNK3) species were seen at 200 kDa (the size of WNK3-HA) in assays with WT and PHAII-like mutant WNK3 but were markedly reduced in assays with kinase-dead WNK3. Western blots with anti-HA and IgG demonstrate equivalent protein loading. (B) WNK3 regulates NCC. *Xenopus* oocytes were injected with cRNAs encoding NCC alone or in combination with wild-type WNK3, kinase-dead WNK3 (kin⁻), or PHAII-like WNK3. Metolazone-sensitive ²²Na⁺ influx was measured as described in *Methods*. Results are expressed as mean \pm SE of metolazone-sensitive ²²Na⁺ influx. *, $P < 0.0001$ vs. NCC alone. WNK3 markedly increases metolazone-sensitive ²²Na⁺ influx, kinase-dead WNK3 markedly inhibits this activity, whereas PHAII-WNK3 behaves like wild-type WNK3. (C and D) WNK3 regulates NCC surface expression. (C) Oocytes were injected with cRNAs encoding EGFP-tagged NCC alone or in combination with wild-type or mutant WNK3. Surface expression of NCC was quantitated by confocal microscopy as described in *Methods*. Mean fluorescence seen in oocytes expressing GFP-NCC alone is expressed as 100%; other groups are expressed as a percentage of this value. Effects of WNK3 constructs on NCC surface expression closely parallel its effects on ²²Na⁺ flux. *, $P < 10^{-6}$ vs. NCC alone. (D) Examples of confocal microscopy of oocytes expressing GFP-tagged NCC alone or with wild-type or kinase-dead WNK3. (E) WNK3 regulates NKCC2. Oocytes were injected with cRNAs encoding NKCC2 alone or in combination with wild-type or mutant WNK3; bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ influx was measured as described in *Methods*. Mean \pm SE of bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ influx is shown for each group in a representative experiment. As for NCC, WNK3 increases NKCC2 activity, kinase-dead WNK3 inhibits NKCC2 activity and PHAII-like WNK3 behaves like wild-type kinase.

Similarly, coexpression of WNK3 with NKCC2 in oocytes resulted in a \approx 2-fold increase in NKCC2 activity, as measured by bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ influx ($P < 10^{-6}$, Fig. 2E). Similar to WNK3's effect on NCC, kinase-dead WNK3 inhibited NKCC2 activity \approx 70% ($P < 10^{-6}$, Fig. 2E), whereas PHAII-like WNK3 activated NKCC2 similar to wild-type WNK3 (Fig. 2E).

Together, these data reveal that WNK3 potentially increases the activity of the mediators of apical NaCl entry in the DCT and TAL. The magnitudes of these effects are previously undescribed for any other protein kinase; moreover, WNK3 is shown to regulate both of these transporters (20). WNK3's activation is specific, because its activity is reversed from activation to inhibition by a single amino acid substitution in WNK3's kinase domain. WNK3's specificity is further demonstrated by the fact it has no effect on the activity of ENaC in *Xenopus* oocytes, or on paracellular Cl⁻ flux in Madin-Darby canine kidney II cells (data not shown). These other renal NaCl transport processes are regulated by WNK1 and WNK4, respectively (10, 11, 15).

WNK3 Regulates NKCC2 Phosphorylation. To further explore the mechanism underlying WNK3's action on these transporters, we focused on NKCC2, whose activation in response to vasopressin is associated with phosphorylation of Thr-184 and Thr-189 in its cytoplasmic N terminus (24, 25). Phosphorylation of the analogous residues is necessary for and closely parallels NKCC1 activation and is also conserved in NCC (27). We monitored phosphorylation of NKCC2 at these sites with R5, an antibody that specifically recognizes phosphorylation of Thr-184 and Thr-189 (24, 25). In the absence of WNK3, NKCC2 phosphorylation increases from negligible levels under hypotonic conditions (200 mosM) to high levels under hypertonic conditions (380 mosM). In contrast, coexpression with WNK3 results in robust NKCC2 phosphorylation under hypotonic and hypertonic conditions (Fig. 3). Conversely, when kinase-dead WNK3 is expressed with NKCC2, there is a dramatic reduction in NKCC2 phosphorylation compared with the level seen with NKCC2 expression alone in each condition of tonicity (Fig. 3). This effect

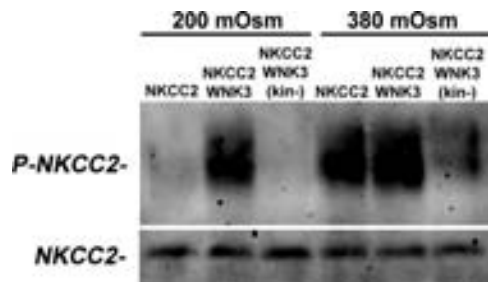


Fig. 3. WNK3 modulates the phosphorylation of NKCC2. *Xenopus* oocytes were injected with the indicated constructs and incubated at varying extracellular osmolarities as indicated. After incubation oocytes were lysed and Western blotting was performed by using the R5 (anti-phospho-NKCC2) or T9 (anti-NKCC2) antibodies as described in *Methods*. Phosphorylation of NKCC2 normally increases from negligible levels under hypotonic conditions (200 mM) to complete phosphorylation under hypertonic conditions (380 mM). In contrast, coexpression of NKCC2 with kinase-active WNK3 results in robust phosphorylation of NKCC2 at all osmolarities. Expression of kinase-dead WNK3 results in marked reduction of NKCC2 phosphorylation under hyperosmolar conditions.

can account for the observed inhibition of NKCC2 by kinase-dead WNK3. These findings indicate that the effects of WNK3 on NKCC2 can be accounted for by altered phosphorylation of regulatory sites of NKCC2.

Discussion

We have shown that WNK3, a member of the WNK kinase family, has effects that are distinct from those of WNK1 and WNK4, demonstrating that its activity is not redundant to these other family members. WNK3 is expressed at intercellular junctions along the length of the nephron, including the TAL and DCT, in contrast to WNK1 and WNK4, which are restricted to the aldosterone-sensitive distal nephron (5). Unlike the inhibitory effect of WNK4, kinase WNK3 is a potent activator of NCC and also NKCC2; these distinct effects suggest that either the upstream regulators of these kinases or the timing of the effects must be distinct to avoid a futile cycle. Kinase-inactive WNK3's action is reversed, strongly inhibiting NKCC2 and NCC activity. Wild-type and kinase-inactive WNK3 regulate transporter activity by altering transporter expression at the plasma membrane.

WNK3 regulates the phosphorylation of Thr-184 and Thr-189 of NKCC2; these sites are conserved in NCC. The phosphorylation state of these threonines correlates with NKCC2's activity and plasmalemmal surface expression *in vitro* and *in vivo* (24, 25). Our experiments suggest WNK3 regulates transporter activity by altering protein trafficking via modulation of the transporter phosphorylation state. The reduced phosphorylation of NKCC2 induced by kinase-dead WNK3 cannot be attributed to simple loss of function, because the level of phosphorylation is lower than that seen in the absence of WNK3. This effect of kinase-dead WNK3 could be accounted for by direction of a phosphatase activity to the target protein, inhibition of a kinase that normally maintains phosphorylation of the target, or both. Further experiments will be needed to clarify WNK3's mechanism of action.

WNK3 is not only the most potent activator reported for NKCC2 or NCC; it is also the first kinase reported to regulate both of these transporters (20). In the kidney (Fig. 4), kinase-active WNK3's activities in the TAL and DCT are inferred to promote increased renal NaCl reabsorption in nephron segments that normally mediate the reabsorption of $\approx 30\%$ and $\approx 7\%$ of the filtered NaCl load, respectively. The absence of an effect of WNK3 on ENaC and paracellular Cl^- flux, processes that occur in the more distal CD, suggest that WNK3 activity can shift NaCl reabsorption toward more proximal nephron segments, a key difference from WNK1 and WNK4, whose action

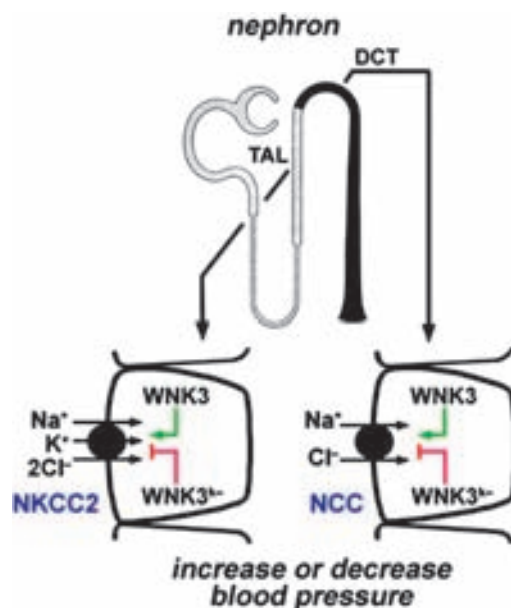


Fig. 4. Proposed role of WNK3 in the kidney. By regulating apical NaCl entry in the TAL and DCT of the nephron, WNK3 could modulate NaCl and water reabsorption and therefore blood pressure. Kinase-active WNK3 might increase NaCl reabsorption, whereas kinase-inactive WNK3 (WNK3 kin⁻) might inhibit NaCl reabsorption. These active/inactive states of WNK3 may be achieved dynamically by ligands (e.g., downstream of vasopressin) binding to or dissociating from the kinase.

has been shown in part to lie downstream of aldosterone in more distal parts of the nephron (14). Nonetheless, the absence of effect on these latter pathways must be interpreted with some caution, because it is possible that additional cellular components required for a regulatory effect of WNK3 are absent from the oocyte and Madin–Darby canine kidney cell systems used in this study. The activity of WNK3 on NKCC2 and its presence in the TAL, where vasopressin is known to regulate NKCC2 activity (24, 28, 29), plus the fact that WNK3 and vasopressin induce phosphorylation of the same N-terminal threonines (24), suggests that WNK3 might lie downstream of vasopressin signaling. This may apply to NCC in the DCT as well (29). Because the reabsorptive capacity of the TAL/DCT for NaCl via NKCC2/NCC is large, activation of this pathway by WNK3 under conditions of intravascular volume depletion and/or high serum osmolarity could promote increased NaCl and water reabsorption, thereby defending intravascular volume and plasma tonicity. The effects of the WNK3 kinase-inactivating mutation on NKCC2 and NCC are intriguing and may mimic a normal *in vivo* phenomenon, perhaps achieved by phosphorylation or altered interaction with other proteins/ligands. In its inactive state, basal repression of NKCC2 and NCC might take place, whereas in its active state, WNK3 could facilitate robust NaCl and water reabsorption.

WNK3's regulation of transporters that are expressed in other nephron segments remains to be fully defined. In contrast to WNK1, WNK3 does not appear to regulate ENaC, the main mediator of NaCl reabsorption in the connecting tubule and CD. Potential targets in the CD include the K^+ channel ROMK1 and the water channel aquaporin 2. The targets of WNK3 in the PCT are also unknown. KCC3 and KCC4, K-Cl cotransporters in the *SLC12A* family highly expressed in the PCT (20), are prime candidates, as is the Cl^- /formate exchanger CFEX (9). Furthermore, the functional significance of WNK3 at the tight junction is unclear; whereas WNK4 facilitates paracellular Cl^- flux in Madin–Darby canine kidney II cells (10, 11), WNK3 has

no effect in the same model system. These issues require future investigation.

Because individual WNK kinases have different expression profiles, unique target specificities, and opposing effects at common targets, it is tempting to speculate that different WNKs may be recruited individually or in combination, enabling modulation of the activities of their targets over a wide range in response to physiological stimuli. For example, it would be logical if WNK4 signaling was downstream of angiotensin II signaling and WNK3 was downstream of vasopressin signaling. Mutations in humans in WNK1 and WNK4 have large effects to alter the balance between NaCl reabsorption and K⁺ secretion, demonstrating their physiologic relevance. Our findings suggest that WNK3 is integral to the regulation of NKCC2 and NCC,

proteins necessary for normal blood pressure homeostasis. These observations add to the growing recognition that WNK family members play diverse and important roles in integrated electrolyte homeostasis.

We thank Gerhard Giebisch, Cecilia Canessa, and Gordon MacGregor for advice and helpful discussions. This work was supported in part by grants from the National Institutes of Health (Specialized Center of Research Grant in Hypertension to R.P.L., DK-36803 to S.C.H. and G.G., and DK-64635 to G.G.) and the Wellcome Trust (GR070159MA to G.G.). K.T.K. is a trainee of the National Institute of Health Medical Scientist Training Program. I.G. is a Ramón y Cajal Investigator of the Spanish Ministry of Education and Science. R.P.L. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

1. Lifton, R. P., Gharavi, A. G. & Geller, D. S. (2001) *Cell* **104**, 545–556.
2. Simon, D. B., Nelson-Williams, C., Bia, M. J., Ellison, D., Karet, F. E., Molina, A. M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H. M., Koolen, M., *et al.* (1996) *Nat. Genet.* **12**, 24–30.
3. Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A. & Lifton R. P. (1996) *Nat. Genet.* **13**, 183–188.
4. Seldin, D. W. & Giebisch, G. H. (2000) *The Kidney: Physiology and Pathophysiology* (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 3rd Ed.
5. Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D. V., Lipkin, G. W., Achard, J. M., *et al.* (2001) *Science* **293**, 1107–1112.
6. Wilson, F. H., Kahle, K. T., Sabath, E., Lalioti, M. D., Rapson, A. K., Hoover, R. S., Hebert, S. C., Gamba, G. & Lifton, R. P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 680–684.
7. Yang, C. L., Angell, J., Mitchell, R. & Ellison, D. H. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 1039–1045.
8. Kahle, K. T., Wilson, F. H., Leng, Q., Lalioti, M. D., O'Connell, A. D., Dong, K., Rapson, A. K., MacGregor, G. G., Giebisch, G., Hebert, S. C., *et al.* (2003) *Nat. Genet.* **35**, 372–376.
9. Kahle, K. T., Gimenez, I., Hassan, H., Wilson, F. H., Wong, R. D., Forbush, B., Aronson, P. S. & Lifton, R. P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2064–2069.
10. Kahle, K. T., Macgregor, G. G., Wilson, F. H., Van Hoek, A. N., Brown, D., Ardito, T., Kashgarian, M., Giebisch, G., Hebert, S. C., Boulpaep, E. L., *et al.* (2004b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14877–14882.
11. Yamauchi, K., Rai, T., Kobayashi, K., Sohara, E., Suzuki, T., Itoh, T., Suda, S., Hayama, A., Sasaki, S. & Uchida, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4690–4694.
12. Golbang, A. P., Murthy, M., Hamad, A., Liu, C. H., Cope, G., Van't Hoff W., Cuthbert, A. & O'Shaughnessy, K. M. (2005) *Hypertension* **2**, 295–300.
13. Kahle, K. T., Wilson, F. H. & Lifton, R. P. (2005) *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 98–103.
14. Naray-Fejes-Toth, A., Snyder, P. M. & Fejes-Toth, G. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 17434–17439.
15. Xu, B. E., Stippec, S., Chu, P. Y., Lazrak, A., Li, X. J., Lee, B. H., English, J. M., Ortega, B., Huang, C. L. & Cobb, M. H. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **29**, 10315–10320.
16. Xu, B., English, J. M., Wilsbacher, J. L., Stippec, S., Goldsmith, E. J. & Cobb, M. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 16795–16801.
17. Min, X., Lee, B. H., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. (2004) *Structure (Cambridge, U.K.)* **12**, 1303–1311.
18. Verissimo, F. & Jordan, P. (2001) *Oncogene* **20**, 5562–5569.
19. Holden, S., Cox, J. & Raymond, F. L. (2004) *Gene* **335**, 109–119.
20. Gamba, G. (2005) *Physiol. Rev.* **85**, 423–493.
21. Choate, K. A., Kahle, K. T., Wilson, F. H., Nelson-Williams, C. & Lifton, R. P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 663–668.
22. Plata C., Meade P., Vazquez N., Hebert S. C. & Gamba G. (2002) *J. Biol. Chem.* **13**, 11004–11012.
23. Hoover, R. S., Poch, E., Monroy, A., Vazquez, N., Nishio, T., Gamba, G. & Hebert, S. C. (2003) *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 271–282.
24. Gimenez, I. & Forbush, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 26946–26951.
25. Gimenez, I. & Forbush, B. (2005) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, in press.
26. Kahle, K. T., Rinehart, J., de los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S. C., Gamba, G., Gimenez, I. & Lifton, R. P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16783–16788.
27. Flemmer, A. W., Gimenez, I., Dowd, B. F., Darman, R. B. & Forbush, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37551–37558.
28. Ecelbarger, C. A., Kim, G. H., Wade, J. B. & Knepper, M. A. (2001) *Exp. Neurol.* **171**, 227–234.
29. Ecelbarger, C. A., Kim, G. H., Terris, J., Masilamani, S., Mitchell, C., Reyes, I., Verbalis, J. G. & Knepper, M. A. (2000) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, 46–53.

WNK3 modulates transport of Cl^- in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability

Kristopher T. Kahle^{*†‡}, Jesse Rinehart^{*‡}, Paola de los Heros^{*§}, Angeliki Louvi[¶], Patricia Meade^{||}, Norma Vazquez[§], Steven C. Hebert[†], Gerardo Gamba^{§**}, Ignacio Gimenez^{||**}, and Richard P. Lifton^{*,**}

Departments of ^{*}Genetics, [†]Molecular and Cellular Physiology, and [¶]Neurosurgery, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510; [§]Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, 14000, Mexico; and ^{||}Department of Pharmacology and Physiology, School of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza 50009, Spain

Contributed by Richard P. Lifton, September 23, 2005

The regulation of Cl^- transport into and out of cells plays a critical role in the maintenance of intracellular volume and the excitability of GABA responsive neurons. The molecular determinants of these seemingly diverse processes are related ion cotransporters: Cl^- influx is mediated by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 and Cl^- efflux via K-Cl cotransporters, KCC1 or KCC2. A Cl^- /volume-sensitive kinase has been proposed to coordinately regulate these activities via altered phosphorylation of the transporters; phosphorylation activates NKCC1 while inhibiting KCCs, and dephosphorylation has the opposite effects. We show that WNK3, a member of the WNK family of serine-threonine kinases, colocalizes with NKCC1 and KCC1/2 in diverse Cl^- -transporting epithelia and in neurons expressing ionotropic GABA_A receptors in the hippocampus, cerebellum, cerebral cortex, and reticular activating system. By expression studies in *Xenopus* oocytes, we show that kinase-active WNK3 increases Cl^- influx via NKCC1, and that it inhibits Cl^- exit through KCC1 and KCC2; kinase-inactive WNK3 has the opposite effects. WNK3's effects are imparted via altered phosphorylation and surface expression of its downstream targets and bypass the normal requirement of altered tonicity for activation of these transporters. Together, these data indicate that WNK3 can modulate the level of intracellular Cl^- via opposing actions on entry and exit pathways. They suggest that WNK3 is part of the Cl^- /volume-sensing mechanism necessary for the maintenance of cell volume during osmotic stress and the dynamic modulation of GABA neurotransmission.

cell volume | GABA | ion transport | protein serine-threonine kinases

A major question in systems biology is how the functions of diverse elements that comprise a system, which may be distributed across different cell types and tissues, are integrated to achieve a coordinated and coherent response to physiologic perturbation. The maintenance of intra- and extracellular electrolyte homeostasis represents one such complex system, which is required for a wide range of essential physiologic processes, including general functions such as the maintenance of proper cell volume, specialized cell functions such as the control of neuronal excitability, and whole-organism properties such as the regulation of blood pressure. In each case, homeostasis is achieved via the regulated movement of Na^+ , K^+ , and Cl^- across cell membranes. The numerous proteins that mediate the entry and exit of these ions across cell membranes have largely been identified. These include ion channels, cotransporters, exchangers, and pumps that execute transmembrane electrolyte flux. The physiological properties of these individual transport proteins are well known; however, the mechanisms that coordinate their actions to achieve and maintain homeostasis remain obscure.

Although the functions of different cells and epithelia are diverse, the mechanisms by which they achieve many aspects of electrolyte homeostasis are strikingly similar (1). The

predominant mechanism by which intracellular volume is maintained in epithelial cells in response to changes in extracellular tonicity is the raising or lowering of intracellular Cl^- concentration ($[\text{Cl}^-]_i$), thereby minimizing transmembrane water flux (2, 3). $[\text{Cl}^-]_i$ is modulated by altering the balance between Cl^- entry and exit. The major mediator of Cl^- entry is the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1; Cl^- exit is largely mediated by the K-Cl cotransporter KCC1 (4–6). These cotransporters are potently regulated by extracellular tonicity: hypertonicity activates NKCC1 and inhibits KCC1, whereas hypotonicity has the opposite effect (7–9). A common mechanism has been proposed to coordinately regulate NKCC1 and KCC1 by a system of sensors and transducers that ultimately result in phosphorylation and dephosphorylation of these transporters (3). Although a volume/ Cl^- responsive kinase has been implicated in the regulation of the response to altered tonicity, the identity of this kinase and of the underlying signaling pathway responsible for the coordination of these homeostatic responses remains to be established (9).

An analogous system plays a key role in the control of neuronal excitability (10). In the adult brain, GABA is the major inhibitory neurotransmitter. GABA acts by opening Cl^- channels on postsynaptic membranes; the ensuing electrical response is determined by the cell's electrochemical potential for Cl^- (10). If $[\text{Cl}^-]_i$ is below its equilibrium potential, Cl^- enters the cell, resulting in hyperpolarization and inhibition. If $[\text{Cl}^-]_i$ is above its equilibrium potential, GABA induces Cl^- efflux, depolarization, and neuronal excitation. The importance of $[\text{Cl}^-]_i$ regulation has been recognized with the discovery that GABA neurotransmission is not uniformly inhibitory; it is predominantly excitatory in the neonatal period (11, 12). Similarly, neurons of the suprachiasmatic nucleus show circadian variation in their response to GABA, demonstrating the ability to dynamically regulate $[\text{Cl}^-]_i$ (13–15). Finally, GABA neurotransmission in the peripheral nervous system is predominantly excitatory (16). Variation in $[\text{Cl}^-]_i$ in these neurons is determined by mechanisms highly similar to those governing cell volume. Cl^- influx largely occurs via NKCC1, whereas Cl^- efflux is mediated via the neuronal-specific K-Cl cotransporter KCC2 (11, 17–19). The importance of this regulation is underscored by the consequences of KCC2 deficiency in mouse, which reduces GABA's inhibitory signaling, resulting in motor defects, epilepsy, and anxiety-like behavior (20–22). The mechanism underlying the dynamic and coordi-

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

Abbreviations: PHAI, pseudohypoaldosteronism type II; WNK, with no lysine (K).

*K.T.K., J.R., and P.d.I.H. contributed equally to this work.

**To whom correspondence may be addressed. E-mail: gamba@biomedicas.unam.mx, igimenez@unizar.es, or richard.lifton@yale.edu.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

nated modulation of NKCC1 and KCC2 activity in neurons is unknown.

The mediators of transcellular Cl^- cotransport (Na-Cl cotransporter, NKCC1, NKCC2, KCC1, and KCC2) are all related members of the *SLC12A* family of cation/ Cl^- cotransporters (Fig. 6A, which is published as supporting information on the PNAS web site); each takes advantage of inward Na^+ or outward K^+ gradients to move Cl^- into or out of cells, respectively. The importance of this family of transporters is underscored by their use as pharmacologic targets (thiazide diuretics act at NCC, and loop diuretics act at NKCC2), and that their mutation results in diverse diseases. Mutations in NCC and NKCC2 result in the NaCl wasting diseases Gitelman's (23) and Bartter's syndromes, respectively (24). Disruption of *NKCC1* in mouse leads to hearing loss, altered pain perception, neuronal excitability, and altered blood pressure (25). Targeted disruption of *KCC2* results in epilepsy (20, 21).

The members of this gene family all are known to be regulated by phosphorylation (9). Phosphorylation increases the activity of NCC, NKCC1, and NKCC2, whereas members of the KCC family are inhibited by phosphorylation (7, 8, 26, 27). Phosphorylation of paralogous threonines in the N terminus of NKCC1 and NKCC2 is essential for their activation; these sites are conserved in NCC (28, 29). The mechanisms underlying the coordinated regulation of these cotransporters are poorly understood.

In the accompanying paper (30), we have shown that the serine-threonine kinase WNK3 is a regulator of Cl^- entry into renal epithelia; kinase-active WNK3 increases the surface expression and activity of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2, expressed in the renal thick ascending limb of Henle, and the Na-Cl cotransporter NCC, expressed in the distal convoluted tubule. The recognition that WNK3 shows highest expression in the brain has led us to investigate its localization in this and other extrarenal sites and to investigate its regulatory effects on other members of the *SLC12A* family.

Methods

cDNA Constructs. Wild-type *pGH19-WNK3* or *pGH19-WNK3* harboring the kinase-inactivating (*D294A*) or pseudohypoaldosteronism type II (PHAII)-like mutation (*Q545E*) were previously described (30). *polI-hNKCC1* (31), *pSPORT1-hKCC1* (32), and *pSPORT1-hKCC2* (32) were used for $^{86}\text{Rb}^+$ influx studies.

Antibodies. Anti-WNK3 antibody was obtained from Alpha Diagnostics (San Antonio, TX). Other antibodies used were anti-GABA_A β_2/β_3 receptor subunits (33), anti-NKCC1 (T4 antibody), and anti-Phospho NKCC1 (R5 antibody; ref. 28) (gifts of B. Forbush, Yale University School of Medicine), and affinity-purified secondary antibodies conjugated to the CY2, CY3, or CY5 fluors (Jackson ImmunoResearch).

In Situ Hybridization. RNA complementary to mouse *WNK3* mRNA corresponding to bases 2685–3681 of human *WNK3* (a unique stretch 5' of the kinase domain) was prepared with incorporation of digoxigenin-UTP (34). Brains were fixed by intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde and 36- μm -thick sections were cut. *In situ* hybridization was performed and specific hybridization detected by using antidigoxin antibodies (35). Specificity of hybridization was demonstrated by the absence of signal after hybridization of *WNK3* sense probes.

Immunolocalization Studies. Studies were approved by the Yale University Animal Care and Use Committee. Mice were killed by cervical dislocation. Tissues were prepared as described (36). Slides were processed with primary and secondary antibodies and visualized by immunofluorescence microscopy (36). Results were similar in threemice. Anti-WNK3 immunostaining was competed with a 3-fold molar excess of the immunizing peptide.

Functional Assays with Cation/ Cl^- Cotransporters. *Xenopus laevis* oocytes were harvested and injected with cRNA of *NKCC1*, *KCC1*, or *KCC2* alone or together with cRNA of wild-type, kinase dead or PHAII-like mutant *WNK3*, as described (37). After 4 days of incubation, bumetanide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ influx (for NKCC1, ref. 38) and Cl^- -dependent $^{86}\text{Rb}^+$ efflux (for KCC1 and KCC2, ref. 39) was determined. NKCC1 measurements were performed in isotonic conditions or after exposure to hypertonic medium (220–380 mM). KCC1 and KCC2 measurements were performed in isotonic conditions or after exposure to hypotonic conditions (110 mM). In each experiment, ≈ 15 oocytes were tested in each group; results were highly reproducible across at least four independent experiments for each condition. The significance of differences between groups of oocytes was assessed by two-tailed Student *t* test or one-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons, as appropriate.

NKCC1 Phospho-Protein Studies. Oocytes injected with indicated constructs were incubated as above and exposed to extracellular tonicity ranging from 180 to 220 mM. Oocytes were immediately homogenized by pipetting in ice-cold antiphosphatase solution (150 mM NaCl/30 mM NaF/5 mM EDTA/15 mM Na_2HPO_4 /15 mM pyrophosphate/20 mM HEPES, pH 7.2) with 1% Triton X-100 and a protease inhibitor mixture. The homogenate was cleared by centrifugation, and supernatants were subjected to Western blotting. The previously characterized anti-NKCC1 antibody T4 (40) and the anti-Phospho-NKCC1 antibody R5 (28) were used to detect total and phosphorylated NKCC1, respectively.

Results

WNK3 Expression in the Brain. In contrast to *WNK1* and *WNK4*, *WNK3* mRNA is most highly expressed in brain (41, 42). *In situ* hybridization with *WNK3*-specific antisense probes reveals prominent *WNK3* expression in hippocampus and dentate gyrus; transcripts are also detected in cortical layers and in thalamic and hypothalamic nuclei (Fig. 1A). *WNK3* is strongly expressed in the supraoptic and suprachiasmatic nuclei (Fig. 1A). Moving posteriorly, *WNK3* transcripts are highly expressed in the dorsal raphe nucleus (Fig. 1C), the locus ceruleus (Fig. 1D), the Purkinje layer of the cerebellum (Fig. 1F), and the reticular formation (Fig. 1F). Expression of *WNK3* is strongly developmentally regulated. In the hippocampus and cerebellum, it is virtually absent at postnatal day 10 and becomes highly expressed by postnatal day 21 (Fig. 1A and E; see also Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). Interestingly, the spatial and temporal expression pattern of *WNK3* closely parallels that of KCC2, the neuron-specific K-Cl cotransporter, in the hippocampus (43). *WNK3* transcripts are also abundant in the choroid plexus and the epithelial lining of the ventricles (epithelia that secrete and modify the cerebrospinal fluid, respectively; data not shown).

Immunofluorescence microscopy with highly specific anti-WNK3 antibodies (30) shows that *WNK3* localizes to intercellular junctions in the epithelium lining the third and lateral ventricles (Fig. 1G–L), as well as the choroid plexus (data not shown). Within brain parenchyma, *WNK3* localizes to the cell bodies of neurons expressing ionotropic GABA_A receptor subunits (Fig. 1M–O) but is not expressed in glia (marked by glial fibrillary acid protein GFAP; data not shown). These neurons are known to express NKCC1 and KCC2 (11).

WNK3 in Extrarenal Epithelia. *WNK1* and *WNK4* are expressed in a number of extrarenal epithelia (31, 36). A survey of *WNK3*'s tissue expression by using immunofluorescence microscopy after staining tissue sections with anti-WNK3 antibody revealed sites that overlapped with *WNK1* and *WNK4* expression, including pancreatic ducts (Fig. 2A–C), bile ducts (Fig. 2D–F), and

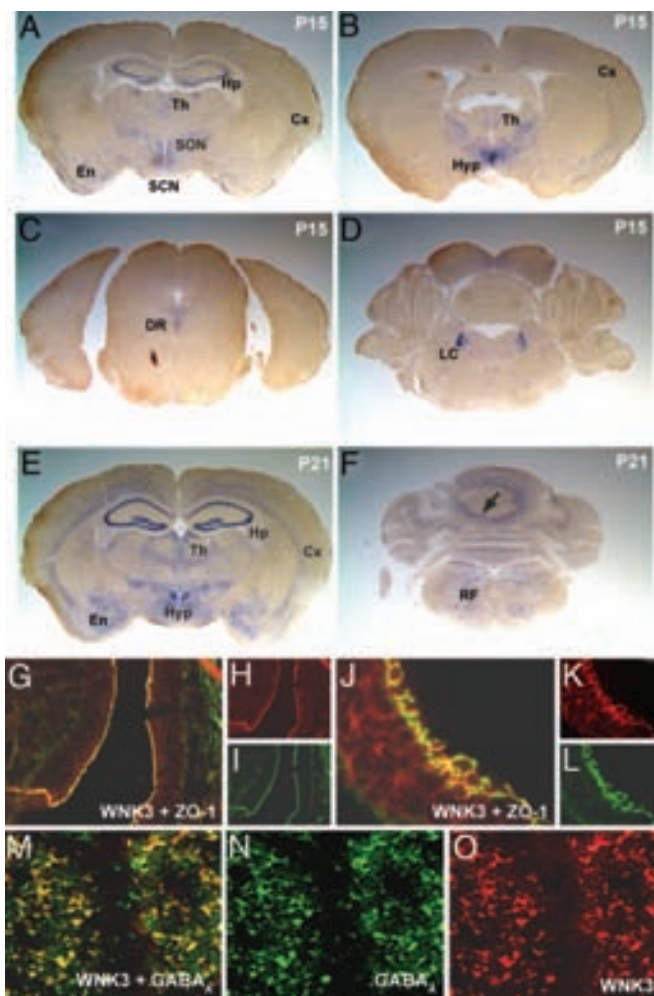


Fig. 1. *WNK3* expression in brain. (A–F) Antisense riboprobe to *WNK3* was prepared, hybridized *in situ* to mouse brain sections, and visualized as described in *Methods*. Coronal sections at postnatal day 15 (P15; A–D) and P21 (E and F) are shown. (A) *WNK3* expression is high in the hippocampus (Hp), thalamus (Th), layers of the cerebral (Cx), and entorhinal (En) cortices and in the supraoptic (SON) and suprachiasmatic nuclei (SCN). (B) Strong *WNK3* expression is seen in hypothalamus (Hyp), Cx, and thalamus (Th). (C) *WNK3* is expressed in the dorsal raphe nucleus (DR). (D) Intense *WNK3* expression in the locus ceruleus (LC). (E) *WNK3* expression is higher at P21, especially in Hp, Cx, and En. *WNK3* expression in Hyp is also strong. (F) At P21, *WNK3* is expressed in the Purkinje layer (arrow) of the cerebellum (Cb) and the medullary reticular formation (RF). (G–L) Expression in brain epithelia. Sections were stained with anti-*WNK3* (red) and anti-zona-occludens-1 (green). *WNK3* localizes to intercellular junctions in the epithelium (arrow) lining the third and lateral ventricles (Vn) of mouse brain. (Original magnification: G–I, $\times 200$; J–L, $\times 630$.) (M–O) Expression in brain parenchyma. Sections were stained with anti-*WNK3* (red) and anti-GABA_A receptor (green). A section of hippocampus is shown. *WNK3* localizes to the cell bodies of neurons expressing the ionotropic GABA_A receptor; similar results are seen in cerebellum and cortex. (Original magnification: $\times 350$.)

epididymis (not shown); in these epithelia, *WNK3* localizes to intercellular junctions. In other tissues, the distribution of *WNK3* is distinct from that of *WNK1* and *WNK4*. For example, in the gastrointestinal tract, *WNK3* is expressed in the small intestine (Fig. 2 G–I) and stomach (Fig. 2 J–L) but not the colon, a pattern opposite that of *WNK1* and *WNK4*. In the small intestine, *WNK3* localizes to intercellular junctions of the highly absorptive surface epithelium and enterocytes in the crypts of Lieberkuhn, glands that secrete a HCO₃⁻-rich protective mucus. In the stomach, *WNK3* localizes to intercellular junctions of the Cl⁻-secreting cells of the gastric glands.

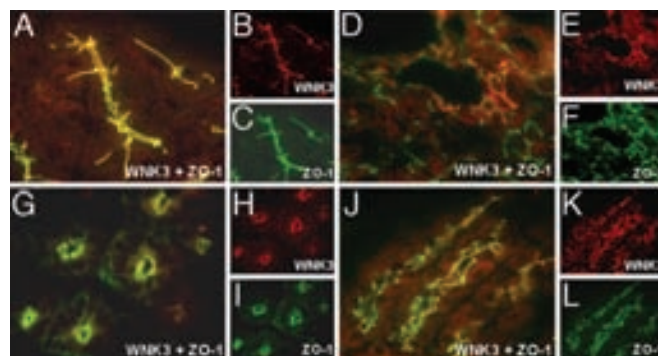


Fig. 2. Localization of *WNK3* in Cl⁻-transporting extrarenal epithelia. Frozen mouse tissue sections were stained with anti-*WNK3* (red) and anti-zona-occludens-1 (green) and analyzed with immunofluorescence light microscopy. Composite views (large) and staining by each antibody alone (small) are shown. (A–C) Pancreas. *WNK3* localizes to intercellular junctions of large main exocrine pancreatic ducts. (D–F) Liver. *WNK3* localizes to intercellular junctions of epithelial cells that line bile ducts. (G–I) Small intestine. *WNK3* is in enterocytes in the crypts of Lieberkuhn. (J–L) Stomach. *WNK3* is at intercellular junctions of HCl-secreting epithelial cells lining gastric glands. (Original magnification: $\times 630$.)

***WNK3* Activates NKCC1 and Inhibits KCC.** The localization of *WNK3* to diverse epithelia involved in electrolyte transport and to neurons that are known to modulate intracellular Cl⁻ concentration, along with prior evidence that *WNK3* regulates NKCC2 and NCC, motivated the examination of *WNK3*'s effect on the activities of NKCC1 and members of the KCC family. In each case, wild-type *WNK3* and *WNK3* harboring the D294A mutation (kinase-dead *WNK3*) were separately tested for effects by coexpression studies in *X. laevis* oocytes. For some targets, we also tested the effect of a *WNK3* mutant harboring the Q565E mutation, which mimics a mutation that causes PHAII in *WNK4* (PHAII-like *WNK3*).

NKCC1 and KCC are normally regulated by extracellular osmolarity in mammalian cells and *Xenopus* oocytes (39). When expressed alone, NKCC1 is inactive under hypotonic conditions (≤ 180 mosM; Fig. 3A), partially active under isotonic conditions (200 mosM; Fig. 3A), and fully activated under hypertonic conditions (≥ 220 mosM; not shown). Coexpression with *WNK3* had a striking effect on NKCC1 regulation, resulting in maximal activity regardless of tonicity (Fig. 3A). This stimulatory effect of *WNK3* is opposite to *WNK4*'s inhibition of NKCC1 (31). Conversely, coexpression of kinase-dead *WNK3* with NKCC1 markedly inhibited ⁸⁶Rb influx in all osmolarities ($P < 0.0001$, Fig. 3A). PHAII-like *WNK3* had the same effect as wild-type *WNK3* (Fig. 3A). These findings indicate that *WNK3* potently regulates NKCC1 activity and eliminates the normal requirement of hypertonicity for NKCC1 activation in *Xenopus* oocytes.

In contrast to *WNK3*'s activation of NCC, NKCC2 (30), and NKCC1, kinase-active *WNK3* was a potent inhibitor of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2 under hypotonic conditions in which it is normally maximally active ($P < 0.0001$, Fig. 3B). Kinase-dead *WNK3* not only fails to display this inhibitory effect but actually further increases the activity of KCC2 when oocytes were incubated in hypotonic medium ($P < 0.0001$, Fig. 3B). When expressed in oocytes under isotonic conditions, KCC2 (unlike other KCCs) is partially active (32). *WNK3* inhibited KCC2-induced ⁸⁶Rb⁺ influx activity under these conditions ($P < 0.0001$, Fig. 3B). Most strikingly, however, kinase-dead *WNK3* induced a dramatic 22-fold increase of KCC2 activity under isotonic conditions ($P < 0.0001$, Fig. 3B).

Similar results were obtained with the ubiquitously expressed K-Cl cotransporter KCC1, which normally requires hypotonic conditions for activation. Like KCC2, in hypotonic conditions,

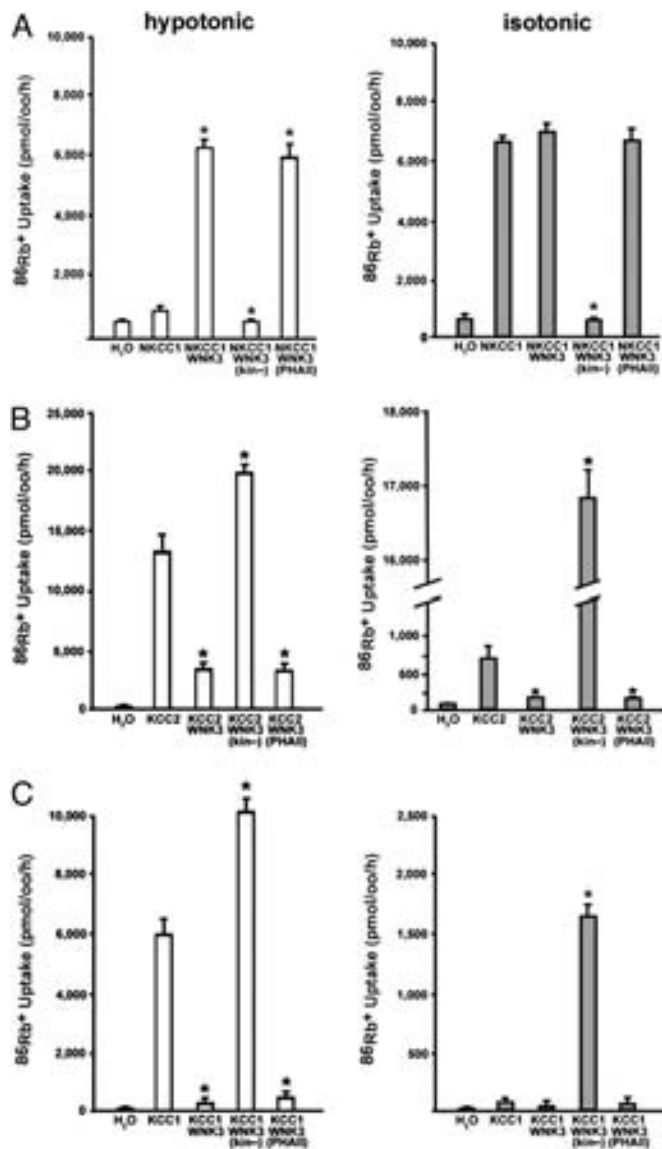


Fig. 3. WNK3 has opposing effects on NKCC1 and KCC1/KCC2. *Xenopus* oocytes were injected with cRNAs encoding either NKCC1 (A), KCC2 (B), or KCC1 (C) alone or in combination with wild-type or mutant WNK3. NKCC1-dependent $^{86}\text{Rb}^+$ influx (A) or efflux (B and C) was determined as described in *Methods*. Data show the mean \pm SE of $^{86}\text{Rb}^+$ flux and are representative of at least four independent experiments. (A) WNK3 regulates NKCC1. NKCC1 normally shows negligible activity under hypotonic conditions (180 mosM) and is partially active in isotonic conditions (200 mM). WNK3 increases NKCC1 to maximal activity in both conditions. Conversely, kinase-dead WNK3 strongly inhibits NKCC1 activity. *, $P < 0.0001$ vs. NKCC1 alone. (B) WNK3 regulates KCC2. KCC2 alone is partially active under isotonic conditions and induced under hypotonic conditions. WNK3 inhibits KCC2 under both conditions. In contrast, kinase-dead WNK3 strongly activates KCC2 under both hypotonic and isotonic conditions. *, $P < 0.0001$ vs. KCC2 alone. (C) WNK3 regulates KCC1. KCC1 alone is inactive under isotonic conditions and induced under hypotonic conditions. WNK3 inhibits KCC1 under both conditions. In contrast, kinase-dead WNK3 strongly activates KCC1 under both hypotonic and isotonic conditions. *, $P < 0.0001$ vs. KCC1 alone.

KCC1 is strongly inhibited by wild-type WNK3 ($P < 0.0001$, Fig. 3C). Conversely, kinase-dead WNK3 further increased activity of KCC1 ($P < 0.0001$ vs. KCC1, Fig. 3C). When oocytes were incubated in isotonic medium, KCC1 alone showed no significant activity. Similar to KCC2, however, kinase-dead WNK3 induced a dramatic increase in KCC1 activity under isotonic conditions ($P <$

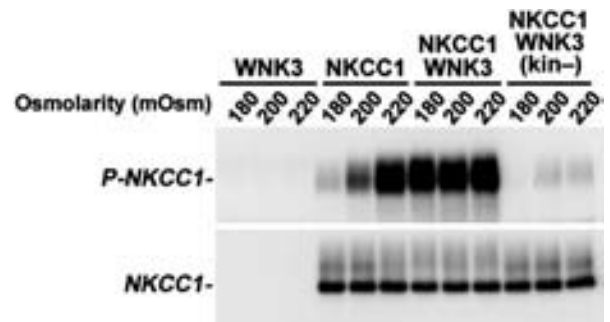


Fig. 4. WNK3 regulates the phosphorylation of NKCC1. *Xenopus* oocytes were injected with the indicated constructs and incubated at varying extracellular osmolarities. After incubation, oocytes were lysed, and Western blotting was performed by using the R5 (anti-Phospho-NKCC1) or T4 (anti-NKCC1) antibodies, as in *Methods*. Phosphorylation of NKCC1 normally increases from negligible levels in hypotonic conditions (180 mM) to complete phosphorylation in hypertonic conditions (220 mM). In contrast, coexpression of NKCC1 with kinase-active WNK3 results in robust phosphorylation of NKCC1 at all osmolarities. Conversely, expression of kinase-dead WNK3 results in marked reduction of NKCC1 phosphorylation.

0.0001, Fig. 3C), conditions under which KCC1 normally shows no activity. These observations that kinase-dead WNK3 can bypass the normal requirement of hypotonicity for activation of KCCs are analogous to the finding that kinase-active WNK3 eliminates the need for hypertonicity to activate NKCC1.

WNK3 Regulates NKCC1 Phosphorylation. The activation of NKCC1 requires phosphorylation of Thr-212 and Thr-217 in its cytoplasmic amino terminus (28). Phosphorylation of the paralogous residues are integral for NKCC2 activation and are conserved in other cation/ Cl^- cotransporters (29). We monitored phosphorylation of NKCC1 at these sites with anti-R5, an antibody that specifically recognizes phosphorylation of Thr-212 and Thr-217 (28). NKCC1 phosphorylation closely parallels its transport activity (ref. 28 and Fig. 4). In the absence of WNK3, NKCC1 phosphorylation increases from negligible levels under hypotonic conditions to high levels under hypertonic conditions. In contrast, coexpression with WNK3 results in robust NKCC1 phosphorylation under hypotonic and isotonic, as well as hypertonic, conditions (Fig. 4). Conversely, when kinase-dead WNK3 is expressed with NKCC1, there is a dramatic reduction in NKCC1 phosphorylation compared with the level seen with NKCC1 expression alone (Fig. 4). This effect can account for the observed inhibition of NKCC1 by kinase-dead WNK3.

These findings indicate that the effects of WNK3 on NKCC1 are associated with altered phosphorylation of its known regulatory sites. The reduced phosphorylation of NKCC1 induced by kinase-dead WNK3 is not simply due to loss of function, because the level of NKCC1 phosphorylation is lower than that seen in the absence of WNK3. Kinase-inactive WNK3's dominant negative effect could be accounted for by direction of a phosphatase activity to the target protein, inhibition of a kinase that normally maintains phosphorylation of NKCC1, or both.

Discussion

These findings establish that WNK3 has potent and opposing effects on mediators of Cl^- entry (NKCC1) and Cl^- exit (KCC1 and KCC2). The colocalization of WNK3 with NKCC1 and KCC in extrarenal epithelia and GABA-responsive neurons suggests the relevance of these effects *in vivo*. Like WNK3's effect on renal mediators of Cl^- entry (NKCC2 and NCC), kinase-active WNK3 is a potent activator of NKCC1, whereas it is an equally potent inhibitor of KCC1 and KCC2, mediators of Cl^- efflux. These combined effects are expected to increase intracellular

Cl^- . Interestingly, when WNK3's kinase activity is eliminated by point mutation, its effects at these targets are reversed, resulting in strong inhibition of Cl^- entry and activation of Cl^- exit. These divergent effects on mediators of Cl^- entry and Cl^- exit are strikingly different from the activities of WNK4, which generally inhibit members of the *SLC12A* cotransporter family (31).

The effects of WNK3 are mediated via altered phosphorylation and surface expression of its downstream targets. Kinase-active WNK3 increases phosphorylation at sites necessary for NKCC1's activation; in contrast, kinase-dead WNK3 decreases phosphorylation at these same sites. This altered phosphorylation can account for the observed changes in activity. Because NCC (26), NKCC1 (7), and NKCC2 (8) are all positively regulated by phosphorylation, whereas KCC1 and KCC2 are inhibited by phosphorylation (27), these observations suggest that kinase-dependent WNK3 effects lead to phosphorylation of downstream targets, whereas kinase-independent effects promote dephosphorylation. Because hypertonicity can lead to robust phosphorylation of NKCC1 in the absence of exogenous WNK3 in the oocyte system (see Fig. 4), and because of evidence that the kinase PASK may be responsible for the direct phosphorylation of regulatory sites of NKCC1 (44, 45), we presume that WNK3 is not directly phosphorylating its targets but instead is regulating downstream kinases/phosphatases that ultimately act at the target. WNK3's localization to intercellular junctions, distant from the apical sites of these transporters, is consistent with this speculation.

The observation that kinase-dead WNK3 has effects opposite those of kinase-active WNK3 at each target is intriguing. We presume that these mirror-image effects mimic a normal biochemical event *in vivo* for several reasons. First, the magnitudes of these effects are very large and uniform for all five members of the *SLC12A* family studied. Second, the biological simplicity of switching from promotion of increased $[\text{Cl}^-]_i$ to decreased $[\text{Cl}^-]_i$ via regulation of WNK3 kinase activity is intuitively attractive and matches functions that are known to modulate $[\text{Cl}^-]_i$ *in vivo*. Third, mutations in the related protein WNK4 that cause the human disease PHAII (46) alter the balance between kinase-dependent and -independent functions of this protein, which alters the balance between NaCl reabsorption and K^+ secretion, an analogous switch (37, 47). It is tempting to speculate that WNK3 is itself regulated by posttranslational modification that switches its function from promoting to inhibiting phosphorylation of downstream targets. In this regard, it is interesting that WNK1 is activated by both hypertonic and hypotonic stress, and that the autoinhibitory domain of WNK1 can inhibit the activity of a number of different WNK kinases (48, 49). This suggests that WNK kinases are components of the sensors that monitor changes in $[\text{Cl}^-]_i$ and/or cell volume. Elucidation of the details of the upstream and downstream signaling pathways will require further investigation.

WNK3's discrete expression and its activity at specific targets suggest a role for this kinase in a number of fundamental extrarenal physiologic processes. For example, in neurons harboring ionotropic GABA_A receptors, WNK3 kinase activity is inferred to increase Cl^- entry and inhibit Cl^- exit, thereby increasing $[\text{Cl}^-]_i$ (Fig. 5A). Increased resting $[\text{Cl}^-]_i$ would drive GABA signaling from inhibitory toward excitatory. In contrast to the predominant inhibitory effect of GABA signaling in the adult, excitatory GABA signaling occurs in the neonatal period, varies from inhibitory to excitatory with circadian rhythm in many brain centers, and is excitatory in the peripheral nervous system (13–16). In contrast, kinase-dead WNK3 inhibits NKCC1 and activates KCC2, which would reduce $[\text{Cl}^-]_i$ and promote inhibitory GABA signaling. These observations suggest that WNK3 allows the dynamic modulation of $[\text{Cl}^-]_i$ and plasticity in response to GABA. These observations have potential implications for diverse processes in the CNS, including the regulation

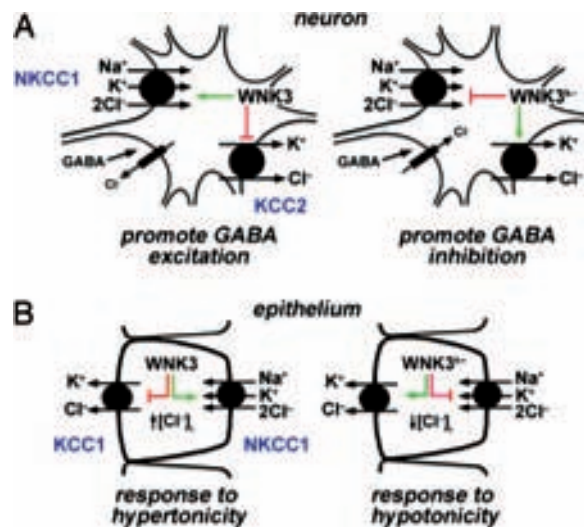


Fig. 5. Proposed physiologic roles of WNK3. (A) WNK3 regulation of the neuronal response to GABA. Kinase-active WNK3 can increase $[\text{Cl}^-]_i$ by increasing activity of NKCC1 and inhibiting KCC2, promoting an excitatory response to GABA. Kinase-dead WNK3 inhibits NKCC1 and activates KCC2, potentially promoting neuronal inhibition. (B) WNK3 regulation of cell volume. WNK3 can increase $[\text{Cl}^-]_i$ by activating NKCC1 and inhibiting KCC1; kinase-inactive WNK3 could decrease $[\text{Cl}^-]_i$ by inhibiting NKCC1 and activating KCC1. These are activities required to maintain cell volume in response to hyper- and hyposmolar stress, respectively.

of wakefulness and sleep in the reticular activating system (13, 15). Consistent with this possibility, WNK kinase gene expression shows circadian variation in *Arabidopsis thaliana* (50, 51). Further work will be required to evaluate a role of WNK3 in this process.

WNK3 also has attributes that suggest its role in the regulation of cell volume (Fig. 5B), suggesting that it is the (or one of the) long-sought Cl^- -responsive kinases that regulate cell volume in response to osmotic stress and/or changes in $[\text{Cl}^-]_i$ (2, 6, 52). Hypertonicity increases the activity of NKCC1 and inhibits KCCs by stimulating the phosphorylation of both proteins, resulting in increased $[\text{Cl}^-]_i$. Conversely, hypotonicity has the opposite effect on phosphorylation and activity of these transporters, resulting in decreased $[\text{Cl}^-]_i$ (9). These responses maintain intracellular volume in response to osmotic stress. The activities of kinase-active and -inactive WNK3 fit the profile expected of the Cl^- /volume-sensitive kinase. Consistent with this notion is the observation that WNK3 eliminates the requirement for hypertonicity to activate NKCC1, and that kinase-dead WNK3 bypasses the requirement for hypotonicity to activate KCCs. These observations suggest that WNK3 is integral to the Cl^- /volume-sensing mechanism and the regulation of cell volume.

Finally, the presence of WNK3 in diverse epithelia involved in Cl^- flux (which also express NKCC1 and KCCs) suggests a broad role for WNK3 in regulating epithelial Cl^- secretion.

Although much remains to be done to define the regulators of WNK3's activities and the details of the downstream pathway to its targets, it is anticipated that elucidation of these processes will have an impact on a broad range of topics in biological regulation.

This work was supported in part by the National Institutes of Health [Specialized Center of Research Grant in Hypertension (to R.P.L.), Grant DK-36803 (to S.C.H. and G.G.), and Grant DK-64635 (to G.G.)] and the Wellcome Trust [Grant GR070159MA (to G.G.)]. K.T.K. is a trainee of the National Institutes of Health Medical Scientist Training Program. I.G. is a Ramón y Cajal Investigator of the Spanish Ministry of Education and Science. R.P.L. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

1. Boron, W. F. & Boulpaep, E. L. (2005) *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach* (Elsevier Saunders, Philadelphia).
2. Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. & Haussinger, D. (1998) *Physiol. Rev.* **78**, 247–306.
3. Parker, J. (1994) in *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, ed. Strange, K. (CRC, Boca Raton, FL), pp. 311–321.
4. Lytle, C. (1998) *Am. J. Physiol.* **274**, 1002–1010.
5. Adragna, N. C., Fulvio, M. D. & Lauf, P. K. (2004) *J. Membr. Biol.* **201**, 109–137.
6. Lytle, C. & McManus, T. (2002) *Am. J. Physiol.* **283**, C1422–C1431.
7. Haas, M. & Forbush, B., III (2000) *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 515–534.
8. Hebert, S. C., Mount, D. B. & Gamba, G. (2004) *Pflügers Arch.* **447**, 580–593.
9. Gamba, G. (2005) *Physiol. Rev.* **85**, 423–493.
10. Jentsch, T. J., Hubner, C. A. & Fuhrmann, J. C. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 1039–1047.
11. Delpire, E. (2000) *News Physiol. Sci.* **15**, 309–312.
12. Rivera, C., Voipio, J. & Kaila, K. (2005) *J. Physiol.* **562**, 27–36.
13. Wagner, S., Castel, M., Gainer, H. & Yarom, Y. (1997) *Nature* **387**, 598–603.
14. Lundkvist, G. B., Kristensson, K. & Hill, R. H. (2002) *J. Biol. Rhythms* **17**, 40–51.
15. Shimura, M., Akaike, N. & Harata, N. (2002) *Am. J. Physiol.* **282**, C366–C373.
16. Sung, K. W., Kirby, M., McDonald, M. P., Lovinger, D. M. & Delpire, E. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 7531–7538.
17. Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvoori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarna, M. & Kaila, K. (1999) *Nature* **397**, 251–255.
18. Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H. J. & Fukuda, A. (2004) *J. Physiol.* **557**, 829–841.
19. Zhu, L., Lovinger, D. & Delpire, E. (2005) *J. Neurophysiol.* **93**, 1557–1568.
20. Hubner, C. A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K. & Jentsch, T. J. (2001) *Neuron* **30**, 515–524.
21. Woo, N. S., Lu, J., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D. B., Deutch, A. Y., Lovinger, D. M. & Delpire, E. (2002) *Hippocampus* **12**, 258–268.
22. Tornberg, J., Voikar, V., Savilahti, H., Rauvala, H. & Airaksinen, M. S. (2005) *Eur. J. Neurosci.* **21**, 1327–1337.
23. Simon, D. B., Nelson-Williams, C., Bia, M. J., Ellison, D., Karet, F. E., Molina, A. M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H. M., Koolen, M., et al. (1996) *Nat. Genet.* **12**, 24–30.
24. Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A. & Lifton, R. P. (1996) *Nat. Genet.* **13**, 183–188.
25. Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C. & Thorne, T. (1999) *Nat. Genet.* **22**, 192–195.
26. Knepper, M. A. & Brooks, H. L. (2001) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **10**, 655–659.
27. Mount, D. B. & Gamba, G. (2001) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **10**, 685–691.
28. Flemmer, A. W., Gimenez, I., Dowd, B. F., Darman, R. B. & Forbush, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37551–37558.
29. Gimenez, I. & Forbush, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 26946–26951.
30. Rinehart, J., Kahle, K. T., de los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Wilson, F. H., Hebert, S. C., Gimenez, I., Gamba, G. & Lifton, R. P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16777–16782.
31. Kahle, K. T., Gimenez, I., Hassan, H., Wilson, F. H., Wong, R. D., Forbush, B., Aronson, P. S. & Lifton, R. P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2064–2069.
32. Song, L., Mercado, A., Vazquez, N., Xie, Q., Desai, R., George, A. L., Jr., Gamba, G. & Mount, D. B. (2002) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **103**, 91–105.
33. Richards, J. G., Schoch, P., Haring, P. Takacs, B. & Mohler, H. (1987) *J. Neurosci.* **7**, 1866–1886.
34. Louvi, A. & Wassef, M. (2000) *Development (Cambridge, U.K.)* **127**, 4061–4071.
35. Tole, S. & Patterson, P. H. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 970–980.
36. Choate, K. A., Kahle, K. T., Wilson, F. H., Nelson-Williams, C. & Lifton, R. P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 663–668.
37. Kahle, K. T., Wilson, F. H., Leng, Q., Lalioti, M. D., O'Connell, A. D., Dong, K., Rapson, A. K., MacGregor, G. G., Giebisch, G., Hebert, S. C., et al. (2003) *Nat. Genet.* **35**, 372–376.
38. Plata, C., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S. C. & Gamba, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11004–11012.
39. Mercado, A., de los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Mount, D. B. & Gamba, G. (2001) *Am. J. Physiol.* **281**, C670–C680.
40. Lytle, C., Xu, J. C., Biemesderfer, D. & Forbush, B., III (1995) *Am. J. Physiol.* **269**, C1496–C1505.
41. Holden, S., Cox, J. & Raymond, F. L. (2004) *Gene* **335**, 109–119.
42. Verissimo, F. & Jordan, P. (2001) *Oncogene* **20**, 5562–5569.
43. Lu, J., Karadsheh, M. & Delpire, E. (1999) *J. Neurobiol.* **39**, 558–568.
44. Piechotta, K., Garbarini, N., England, R. & Delpire, E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 52848–52856.
45. Dowd, B. F. & Forbush, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27347–27353.
46. Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D. V., Lipkin, G. W., Achard, J. M., et al. (2001) *Science* **293**, 1107–1112.
47. Wilson, F. H., Kahle, K. T., Sabath, E., Lalioti, M. D., Rapson, A. K., Hoover, R. S., Hebert, S. C., Gamba, G. & Lifton, R. P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 680–684.
48. Xu, B., English, J. M., Wilsbacher, J. L., Stippec, S., Goldsmith, E. J. & Cobb, M. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 16795–16801.
49. Lenertz, L. Y., Lee, B. H., Min, X., Xu, B. E., Wedin, K., Earnest, S., Goldsmith, E. J. & Cobb, M. H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 26653–26658.
50. Nakamichi, N., Murakami-Kojima, M., Sato, E., Kishi, Y., Yamashino, T. & Mizuno, T. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **11**, 2429–2436.
51. Murakami-Kojima, M., Nakamichi, N., Yamashino, T. & Mizuno, T. (2002) *Plant Cell Physiol.* **6**, 675–683.
52. Hebert, S. C. (1987) *Semin. Nephrol.* **7**, 48–60.

WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway

Paola de los Heros^{*†}, Kristopher T. Kahle^{†‡§}, Jesse Rinehart^{†‡}, Norma A. Bobadilla^{*}, Norma Vázquez^{*}, Pedro San Cristobal^{*}, David B. Mount[¶], Richard P. Lifton^{¶||}, Steven C. Hebert^{§||}, and Gerardo Gamba^{*||}

^{*}Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalpan, Mexico City, 14000, Mexico; [†]Department of Genetics and [§]Molecular and Cellular Physiology, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510; and [¶]Renal Division, Brigham and Women's Hospital and Division of General Internal Medicine, Veterans Affairs Boston Healthcare System, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

Contributed by Steven C. Hebert, December 19, 2005

***SLC12A* cation/Cl⁻ cotransporters are mutated in human disease, are targets of diuretics, and are collectively involved in the regulation of cell volume, neuronal excitability, and blood pressure. This gene family has two major branches with different physiological functions and inverse regulation: K-Cl cotransporters (KCC1–KCC4) mediate cellular Cl⁻ efflux, are inhibited by phosphorylation, and are activated by dephosphorylation; Na-(K)-Cl cotransporters (NCC and NKCC1/2) mediate cellular Cl⁻ influx and are activated by phosphorylation. A single kinase/phosphatase pathway is thought to coordinate the activities of these cotransporters in a given cell; however, the mechanisms involved are as yet unknown. We previously demonstrated that WNK3, a paralog of serine-threonine kinases mutated in hereditary hypertension, is coexpressed with several cation/Cl⁻ cotransporters and regulates their activity. Here, we show that WNK3 completely prevents the cell swelling-induced activation of KCC1–KCC4 in *Xenopus* oocytes. In contrast, catalytically inactive WNK3 abolishes the cell shrinkage-induced inhibition of KCC1–KCC4, resulting in a >100-fold stimulation of K-Cl cotransport during conditions in which transport is normally inactive. This activation is completely abolished by calyculin A and cyclosporine A, inhibitors of protein phosphatase 1 and 2B, respectively. Wild-type WNK3 activates Na-(K)-Cl cotransporters by increasing their phosphorylation, and catalytically inactive kinase inhibits Na-(K)-Cl cotransporters by decreasing their phosphorylation, such that our data suggest that WNK3 is a crucial component of the kinase/phosphatase signaling pathway that coordinately regulates the Cl⁻ influx and efflux branches of the *SLC12A* cotransporter family.**

ion transport | protein serine-threonine kinases | hypertension | cell volume regulation

Phylogenetic analysis of the electroneutral cation/Cl⁻ cotransporter family (*SLC12A*) reveals two branches: the K-Cl cotransporter branch, composed of four members (KCC1, KCC2, KCC3, and KCC4) that exhibit ≈70% identity, and the Na-(K)-Cl cotransporter branch, composed of three members (NCC, NKCC1, and NKCC2) that exhibit ≈50% identity. Because of the gradient of the accompanying cation, K-Cl cotransporters mediate Cl⁻ efflux, whereas Na-(K)-Cl cotransporters mediate Cl⁻ influx. These cotransporters are necessary for several fundamental physiological processes, including the regulation of cell volume, neuronal excitability, transepithelial NaCl transport, and arterial blood pressure (1).

The activities of *SLC12A* cotransporters are regulated by phosphorylation/dephosphorylation processes (for review, see refs. 1–5). Dephosphorylation activates K-Cl cotransporters and inhibits Na-(K)-Cl cotransporters, whereas phosphorylation inhibits K-Cl cotransporters and activates Na-(K)-Cl cotransporters. It has been proposed that these cotransporters share a common regulatory pathway, because stimuli that activate the

K-Cl cotransporters inhibit the Na-(K)-Cl cotransporters and vice versa. Thus cell swelling, high intracellular Cl⁻, and protein phosphatases (PPs) stimulate K-Cl cotransporters but inhibit Na-(K)-Cl cotransporters; in contrast, cell shrinkage, low intracellular Cl⁻, and PP inhibitors have the opposite effect on these two transport systems. Although several kinases have been proposed to regulate the phosphorylation of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 (3, 6), a member of the pathway that coordinates the opposing actions of Na-(K)-Cl and K-Cl cotransport has yet to be identified.

The WNK kinases (WNK, with *no* lysine = *K*), a family of four novel serine-threonine kinases, are emerging as key regulatory proteins for the *SLC12A* family (7). Sequence analysis reveals that WNK kinases contain an amino-terminal kinase domain and a carboxyl-terminal regulatory domain. Mutations in WNK1 and WNK4 cause pseudohypoaldosteronism type II, a Mendelian disease that features hypertension and hyperkalemia (8). WNK4 has been shown to be a regulatory kinase for ion channels, transporters, and tight junction proteins, indicating that WNK4 possesses the properties of a multifunctional regulator of diverse ion transport pathways (7). Although the mechanism of WNK4's regulation of these transport pathways is unknown, two recent studies have demonstrated that WNK4 lies upstream of the STE20 kinases, SPAK and OSR1, that are known to regulate cation/Cl⁻ cotransport (9–11). Furthermore, WNK1 modulates the effect of WNK4 on the Na-Cl cotransporter NCC (12, 13) and of SGK1 (serum and glucocorticoid-induced protein kinase) on the epithelial Na⁺ channel ENaC (14).

In recent studies, we observed that coexpression of any of the three Na-(K)-Cl cotransporters (NCC, NKCC1, and NKCC2) with WNK3 resulted in a significant increase in ²²Na⁺ (NCC) or ⁸⁶Rb⁺ (NKCC1/2) uptake in *Xenopus* oocytes (15, 16). WNK3-induced activation of NKCC1 or NKCC2 was associated with increased phosphorylation of two amino-terminal threonine residues necessary for full cotransporter activation; this effect was present under hypotonic conditions, in which NKCC1 is normally dephosphorylated and, therefore, inactivated. In contrast, coexpression of the K-Cl cotransporters KCC1 or KCC2 with WNK3 resulted in a complete inhibition of cotransporter activity, even when oocytes were exposed to hypotonic conditions in which K-Cl cotransporters are otherwise maximally active. Strikingly, coexpression of these cotransporters with the WNK3 catalytically inactive mutant (WNK3-D294A) resulted in

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

Abbreviations: KCC, K-Cl cotransporter; PP, protein phosphatase; PPC, protein phosphatase catalytic domain; WNK, with no lysine = K.

[†]P.d.l.H., K.T.K., and J.R. contributed equally to this work.

[¶]To whom correspondence may be addressed. E-mail: richard.lifton@yale.edu, steven.hebert@yale.edu, or gamba@biomedicas.unam.mx.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

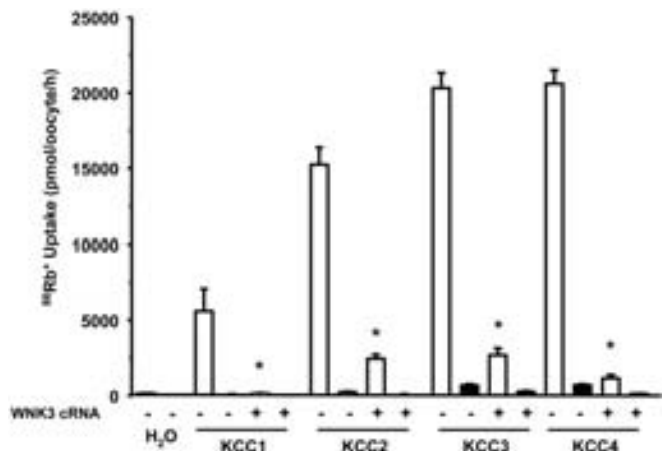


Fig. 1. Effect of wild-type WNK3 on K-Cl cotransport induced by cell swelling under hypotonic conditions. *X. laevis* oocytes were injected with water or 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ each of the KCCs cRNA alone or together with WNK3 cRNA. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was assessed 4 days later in hypotonic conditions (110 mOsm/kg) in the presence (open bars) or absence (filled bars) of Cl^- in the uptake medium. A representative experiment from a single frog, with the mean \pm SEM of 15 oocytes for each group, is shown. Similar results have been observed in at least five experiments, each experiment using oocytes from a different frog. *, significantly different from the uptake observed in the corresponding control (absence of WNK3, $P < 0.01$).

the opposite effects: the Na-(K)-Cl cotransporters were inhibited, whereas KCC1 and KCC2 were activated. Immunolocalization studies with a specific WNK3 antibody demonstrated that WNK3 is coexpressed with KCC2 and NKCC1 in several regions of the central nervous system, and with KCCs, NCC and NKCC2 in the kidney. Thus, WNK3 possesses the expected properties of a regulator that is able to coordinate the function of *SLC12A* family members. Here, we extended our observations to include the effects of WNK3 on all four K-Cl cotransporter isoforms and analyze the mechanism by which WNK3-D294A induces activation of the K-Cl cotransporters in osmolarities that normally inhibit these cotransporters.

Results and Discussion

WNK3 Prevents Hypotonic Activation of KCCs. The K-Cl cotransporter was first described as a swelling-activated K^+ efflux pathway in erythrocytes (17). In the oocyte expression system, all four K-Cl cotransporter isoforms are activated by incubation of oocytes in hypotonic medium (18–21). In isotonic conditions, KCC2 is the only isoform that exhibits significant transport activity in both oocytes and HEK-293 cells (20, 22, 23)

In the present study, we tested the effects of WNK3 on the activity of K-Cl cotransporters in both isotonic and hypotonic conditions. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake observed for KCC1 (163 ± 16 pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), KCC3 (199 ± 26 pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), and KCC4 (229 ± 50 pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) was not significantly different from water-injected oocytes in isotonic medium (91 ± 9 pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), and WNK3 had no effect on the observed $^{86}\text{Rb}^+$ uptakes (data not shown). In these experimental conditions, KCC2 exhibited significant activity (937 ± 223 pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $P > 0.01$) over water-injected control oocytes, and most of this increased $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was prevented by coexpression with WNK3 (206 ± 21 pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $P < 0.01$ vs. KCC2 alone). Fig. 1 shows the results of experiments performed when oocytes were incubated in hypotonic conditions, which resulted in a significant activation of all four K-Cl cotransporters. WNK3 inhibited KCC activity in hypotonic medium because $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in all groups coexpressing WNK3 was 80% to 98% lower compared to oocytes expressing KCCs

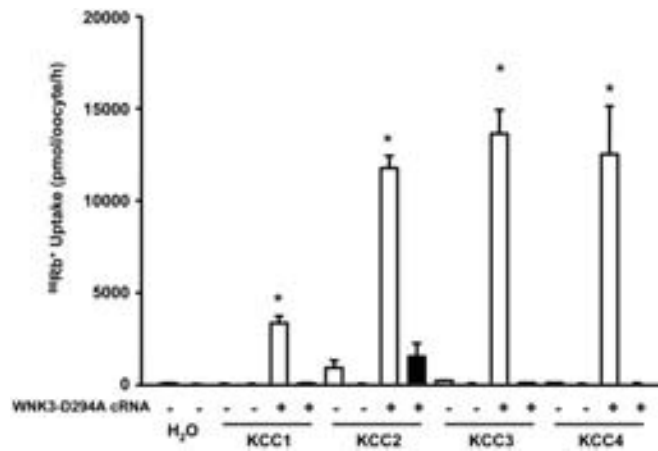


Fig. 2. Effect of catalytically inactive WNK3-D294A on K-Cl cotransport under isotonic conditions. *X. laevis* oocytes were injected with water or 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ each of the KCCs cRNAs alone or together with WNK3-DA cRNA. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was assessed 4 days later in isotonic conditions (220 mOsm/kg) in the presence (open bars) or absence (filled bars) of Cl^- in the uptake medium. A representative experiment from a single frog, with the mean \pm SEM of 15 oocytes for each group, is shown. Similar results have been observed in at least five different experiments, each experiment using oocytes from a different frog. *, significantly different from the uptake observed in the corresponding control (absence of WNK3-DA, $P < 0.01$).

alone. Thus, WNK3 prevents the hypotonic activation of all four KCCs and also inhibits KCC2 activity in isotonic conditions.

Kinase-Dead WNK3 Activates KCCs in Isotonic Conditions. Kinase-dead WNK3-D294A exhibits exactly the opposite effects on KCCs compared to those observed with wild-type WNK3. When exposed to isotonic conditions, each KCC had a several hundred-fold higher activity when coexpressed with WNK3-D294A compared to oocytes not expressing the WNK3 mutant (Fig. 2). The uptakes observed in all KCC/WNK3-D294A coexpressing oocytes were Cl^- -dependent, indicating that $^{86}\text{Rb}^+$ uptake occurred specifically through the K-Cl cotransporters. We recently demonstrated that WNK3-D294A failed to inhibit K-Cl cotransport by KCC1 or KCC2 in hypotonic conditions but instead induced a further increase in $^{86}\text{Rb}^+$ uptake (15). In the present study, we confirmed these observations for KCC1 and KCC2 but did not initially see the effect of WNK3-D294A on swelling-activated KCC3 and KCC4. When uptakes were performed in hypotonic conditions in oocytes injected with cRNA concentration at 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, the values for each KCC in the absence or presence of WNK3-D294A were as follows: KCC1, $4,079 \pm 570$ vs. $6,991 \pm 896$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($P < 0.01$); KCC2, $1,034$ vs. $18,645 \pm 630$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($P > 0.01$); KCC3, $19,214 \pm 2,023$ vs. $18,720 \pm 1,546$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ [$P =$ not significant (NS)]; KCC4, $21,762 \pm 1,476$ vs. $21,541 \pm 2,205$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($P =$ NS). Thus coexpression of KCC1 and KCC2 with WNK3-D294A resulted in a further increase in $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in hypotonic conditions, whereas coinjection with KCC3 and KCC4 had no effect on $^{86}\text{Rb}^+$ uptake. Because we always see higher expression of KCC3 and KCC4 relative to KCC1 and KCC2 when similar amounts of each KCC cRNA are injected (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), an explanation for the differences observed with the effect of WNK3-D294A could be that KCC1/KCC2 may not be fully active, whereas KCC3/4 are functioning at their V_{max} . In support of this hypothesis, Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site, shows the results of an experiment in which oocytes were injected with 50 nl of KCC4 cRNA at 0.05 or 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, alone or together with WNK3-D294A cRNA. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in which oocytes were

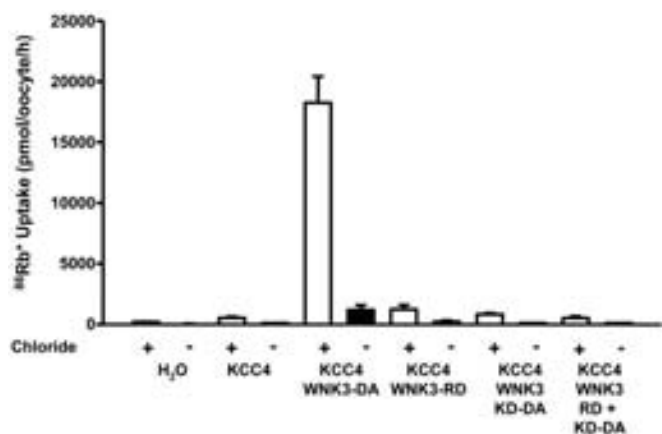


Fig. 3. An intact WNK3-294A molecule is necessary for the regulation of K-Cl cotransport under isotonic conditions. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was measured in *X. laevis* oocytes microinjected with water, KCC4 cRNA alone, or KCC4 cRNA together with cRNA transcribed from each of the following cDNAs: WNK3-D294A (containing kinase-inactive WNK3), WNK3-RD (containing the sequence of the WNK3 regulatory domain only), WNK3-KD-D294A (containing the sequence of the WNK3 kinase domain only, with the D294A mutation), and WNK3-RD + KD-D294A (containing the WNK3 regulatory domain and the kinase domain DA together, but as separate transcripts). Uptakes were performed in isotonic medium (220 mOsm/kg) in the presence (open bars) or absence (filled bars) of extracellular Cl^- in the uptake medium. Each bar represents the mean \pm SEM of 20 oocytes extracted from two different frogs.

injected with KCC4 at $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ was $13,010 \pm 728 \text{ pmol}\cdot\text{oocyte}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, whereas in oocytes injected with the same concentration of KCC4 cRNA plus WNK3-D294A cRNA, $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was $19,931 \pm 1,223 \text{ pmol}\cdot\text{oocyte}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($P < 0.001$). In contrast, in oocytes injected with KCC4 cRNA at $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was similar in the absence or presence of WNK3-D294A ($24,066 \pm 439$ vs. $24,237 \pm 1,170 \text{ pmol}\cdot\text{oocyte}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $P = \text{NS}$). It is evident, therefore, that WNK3-D294A induces the opposite effects to those of wild-type WNK3 on the KCCs. In isotonic conditions, WNK3-D294A activates all four K-Cl cotransporters to levels seen previously only in their usual hypotonic “activating” medium. In addition, in hypotonic conditions, WNK3-D294A further activates swelling-activated K-Cl cotransport.

In recent studies (15, 16), we showed that WNK3 and WNK3-D294A have inverse effects on the activity of Na-(K)-Cl and K-Cl cotransporters. For both NKCC1 and KCCs, WNK3 bypasses the normal requirements of hypertonicity and hypotonicity, respectively, for cotransporter activation. In addition, catalytically inactive WNK3 prevents the activity of the Na-(K)-Cl cotransporters and, in the absence of cell swelling, allows K-Cl cotransporters to be active. If there is an endogenous WNK3 activity in oocytes, then one possible explanation for the WNK3-D294A-induced activation of KCCs would be a dominant negative effect in which the catalytically inactive WNK3-D294A will render the endogenous WNK3 inactive and, thus, prevent the “endogenous” WNK3-induced phosphorylation and inhibition of the cotransporter in isotonic conditions, with the consequent activation of KCCs. To test this possibility, we injected oocytes with KCC4 cRNA alone or together with cRNA *in vitro* transcribed from the full-length WNK3-D294A cDNA or from the regulatory domain or the kinase domain harboring the D294A mutation cDNAs only. A fifth group of oocytes was coinjected with KCC4 together with the regulatory and the kinase-D294A domain cRNAs. As shown in Fig. 3, coinjection of oocytes with KCC4 and WNK3-D294A resulted in several hundred-fold activation of KCC4 in isotonic conditions. In contrast, coinjection of KCC4 with the WNK3 regulatory domain cRNA only, the

WNK3 kinase-D294A domain cRNA only, or both WNK3 domains on separate cRNAs had no effect upon KCC4 activation. Thus, the observation that neither the kinase domain nor the regulatory domain alone were able to activate the KCCs suggests that the effect of the full-length WNK3-D294A upon KCC4 transport activity is unlikely to be due to a dominant negative effect.

WNK3 Regulates KCCs by Modulating Phosphatases. Inhibition of specific PP is associated with activation of NKCC1 and inhibition of KCCs (24–26) due to increased phosphorylation of cotransporters (27, 28). We observed effects of WNK3-D294A on electroneutral cotransporters that would be expected with activation of PPs, suggesting that WNK3-D294A is functionally interacting with both the cotransporter proteins and the PPs. To test this possibility, we assessed the effects of three different PP inhibitors on the WNK3-D294A-induced activation of K-Cl cotransporters in oocytes exposed to isotonic conditions (Fig. 4). Parallel experiments were performed in which uptakes were assessed in oocytes expressing the corresponding KCC cotransporter alone in hypotonic conditions (Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). Calyculin A at 100 nM inhibits the function of PP1 > PP2A, okadaic acid at 1 nM inhibits only PP2A, and cyclosporine A at $25 \mu\text{M}$ inhibits the function of the PP2B.

As shown in Fig. 4A, isotonic incubation of oocytes injected with KCC1+WNK3-D294A resulted in a significant increase in KCC1 activity (uptake in KCC1 cRNA alone injected oocytes in similar conditions was $394 \pm 30 \text{ pmol}\cdot\text{oocyte}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was significantly reduced by calyculin A but not by okadaic acid. Cyclosporine induced a small, but nonsignificant, reduction in $^{86}\text{Rb}^+$ uptake. However, when two or three PP inhibitors were used together, KCC1 activity in the presence of WNK3-D294A was completely prevented. These observations suggest that WNK3-D294A-induced activation of KCC1 in isotonic conditions depends on the activity of the protein phosphatases, particularly PP1 and the PP2B, because inhibition of these two proteins by the combination of calyculin A and cyclosporine A completely prevented the KCC1 activation by WNK3-D294A. Fig. 7 shows that in the parallel experiment, oocytes injected with KCC1 cRNA alone exhibited increased $^{86}\text{Rb}^+$ uptake when incubated in hypotonic conditions, and the effect of phosphatases inhibitors was similar to that observed in KCC1+WNK3-D294A-injected oocytes.

Fig. 4 B–D show results obtained with KCC2, KCC3, and KCC4, respectively, when coinjected with WNK3-D294A. Increased $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in isotonic conditions was observed in all three groups. In these K-Cl cotransporters, addition of either calyculin A or cyclosporine A alone partially prevented the WNK3-D294A-induced activation, and in all cases, full inhibition was observed when combinations of phosphatase inhibitors were used. Similar observations were obtained in oocytes injected with each of the KCCs cRNA alone and incubated in hypotonic conditions (Fig. 7).

Our observations are consistent with the hypothesis that K-Cl cotransporters need to be dephosphorylated to be activated and suggest that during cell swelling, PP1 is the major protein phosphatase involved. However, the fact that combinations of PP inhibitors further decrease the activity of KCCs indicates that at least two PPs are required for full activation. Because the most consistent observation in this study was that a combination of calyculin A and cyclosporine A completely prevented the cell swelling-induced activation of all four KCCs, it is possible that PP1 and PP2B are the major protein phosphatases responsible. Thus, our observations strongly suggest that WNK3-D294A induces dephosphorylation of the KCCs by activating protein phosphatases.

WNK kinases regulate ion transport proteins through catalytic

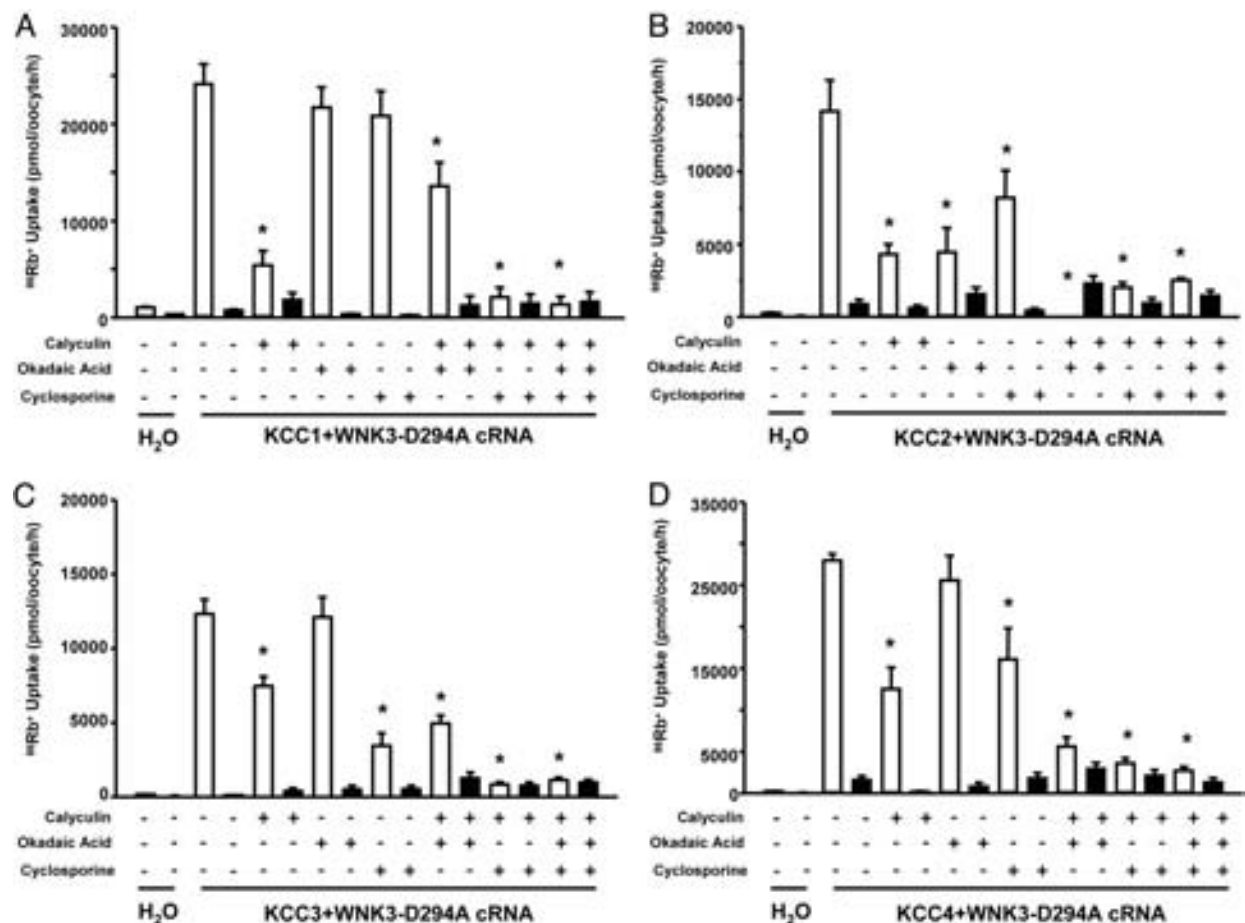


Fig. 4. WNK3-D294A activates KCC1, KCC2, KCC3, and KCC4 via a phosphatase-dependent mechanism. Effect of protein phosphatase inhibitors upon $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in oocytes injected with KCC1 (A), KCC2 (B), KCC3 (C), and KCC4 (D). All groups were injected with cRNA concentration at $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, except for KCC1 ($0.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). All groups were coinjected with WNK3-D294A cRNA at $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Uptakes were performed in isotonic conditions in oocytes that were exposed to Cl^- -containing medium (open bars) or Cl^- -depleted medium (filled bars). Each bar represents the mean \pm SEM of 20 oocytes from two different frogs. Protein phosphatase inhibitors used were as follows: calyculin A (at 100 nM), okadaic acid (at 1 nM), and cyclosporine A (at $25 \mu\text{M}$). *, significantly different from the uptake observed in the corresponding control (absence of protein phosphatase inhibitors, $P < 0.01$).

and/or physical interaction with their targets. For example, the effects of WNK4 on NCC and claudins, but not the K^+ channel ROMK, requires its kinase activity (29–31). In addition, the effect of WNK1 on ENaC does not require WNK catalytic activity (32). It is believed that actions not requiring phosphorylation reside in the WNK carboxyl-terminal domain of WNKs. The observation in this study that WNK3 and WNK3-D294A bypass the normal regulation of the K-Cl cotransporters by extracellular osmolarity has parallelism with the loss of volume sensitivity that was recently reported for NKCC1 with catalytically active and inactive SPAK/OSR1 kinases in conjunction with WNK4 (10, 11). However, unlike SPAK/OSR1/WNK4, WNK3 and WNK3-D294A are able to accomplish their dramatic effects on the cotransporters without requiring coinjection with other kinases (SPAK/OSR1), suggesting that WNK3 may be downstream of SPAK/OSR1 or represents an alternative pathway. Thus, we propose that the effects of both wild-type WNK3 and WNK3-D294A are normal biochemical actions of WNK3 *in vivo*. In this regard, WNK3-D294A mimics the kinase inactive form of wild-type WNK3, which could occur via auto inhibition (33) or by interacting with an accessory protein. In our previous studies (15, 16), we observed that increased activity of NKCC1 or NKCC2 induced by wild-type WNK3 is associated with increased immunodetection of NKCC1 or NKCC2 by the R5 phosphoantibody that recognizes phosphorylated amino-

terminal threonine residues T184 and T189 of NKCC1 or T96 and T101 of NKCC2; these phosphorylation events have previously been demonstrated to play an important role in activation of both isoforms of the Na-K-2Cl cotransporters, NKCC1 and NKCC2 (34, 35). In addition, we observed that decreased activity of NKCC1 or NKCC2 induced by WNK3-D294A, even in hypertonic conditions, was associated with dephosphorylation of these same threonines. In this study, we show that the activation of KCC1–KCC4 by WNK3-D294A is executed via a mechanism that requires activation of protein phosphatases, because inhibition of PP1 and PP2B prevents the effect of WNK3-D294A on all KCCs. These observations suggest that WNK3 could be acting as, or interacting with, a regulatory subunit of the protein phosphatases.

Specificity of a protein phosphatase catalytic domain (PPc)1 for a target protein is thought to be determined by its association with one or two regulatory subunits that modulates PP1 activity and/or brings the phosphatase in close proximity to its substrate. More than 45 proteins that act as regulatory subunits of PP1c have been identified and classified in two groups based on their mechanism of action (36, 37). One group is composed of proteins that regulate the activity of PP1c; that is, the interaction between PP1c and the regulatory protein results in activation or inhibition of the dephosphorylating activity of PP1c toward all substrates (38). The second group of regulatory proteins binds both the

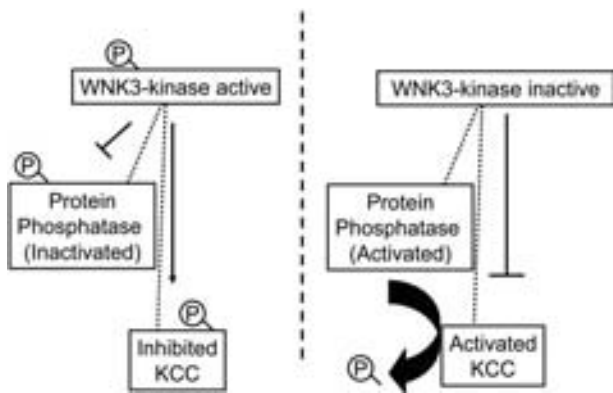


Fig. 5. Model of KCC regulation by active and inactive WNK3. See text for details.

PP1c and one or two substrates or subcellular structures. These regulatory proteins work as scaffolding proteins by forming complexes between the PP1c and specific substrates and, at the same time, can regulate the activity of the PP1c. Our observations suggest a model shown in Fig. 5 in which WNK3 is itself a PP regulatory protein, or through interaction with a regulatory protein, bring together the cation/Cl⁻ cotransporters with PP1c and/or PP2Bc. In its active form, WNK3 induces phosphorylation of the cotransporter and probably also of PP1c, which inhibits PP1 phosphatase activity. These combined effects would increase phosphorylation of the K-Cl cotransporters and, thus, inhibition. In contrast, WNK3-D294A may also bind to the cotransporter and PP1c, but the lack of catalytic activity precludes their phosphorylation, thus increasing the dephosphorylating activity of PP1c on the K-Cl cotransporters and, thus, activation. The fact that PP inhibitors prevent KCCs activation by WNK3-D294A suggest that in isotonic conditions, KCCs are still phosphorylated by other pathways different from WNK3. It is known that WNKs possess autophosphorylation activity that is required for their catalytic activity; this autophosphorylation is under negative control by a WNK kinase autoinhibitory domain. Xu *et al.* (33) demonstrated that two phenylalanine residues in this domain are critical for its inhibitory activity. If these residues are eliminated, the autoinhibitory properties of WNK1 are decreased, with the consequent increase in autophosphorylation and ability to phosphorylate the substrate myelin basic protein (33). Thus, it is possible that under certain circumstances (e.g., cell shrinkage and/or decreased intracellular chloride), the autoinhibitory activity is prevented, activating WNK3 autophosphorylation with the resulting effect of increased phosphorylation of the cotransporters. As a consequence, NCC and NKCCs are activated, whereas KCCs are inhibited. In contrast, during cell swelling and/or increased intracellular chloride concentration, the autoinhibitory domain might prevent the autophosphorylation of WNK3, therefore producing catalytically inactive WNK3. Because scaffolding activity is probably not required for kinase activity, the lack of inhibition of PP1c would allow this protein to dephosphorylate the cotransporters, resulting in inhibition of NCC/NKCCs and activation of KCCs.

In summary, WNK3 and WNK3-D294A have the ability to bypass the normal regulation of the electroneutral cotransporters by extracellular osmolarity. In the presence of active or inactive WNK3 kinase, the changes in cell volume that are required to activate or inhibit the cotransporters of the SLC12 family are no longer necessary. The active WNK3 seems to induce phosphorylation (15, 16), whereas the inactive WNK3 seems to induce dephosphorylation of the cotransporters. Therefore, WNK3 possesses properties of the proposed NKCC1/KCC

regulatory kinase that is responsive to intracellular Cl⁻ concentrations and/or changes in cell volume (28, 39).

Materials and Methods

Xenopus laevis Oocyte Preparation. Adult female *X. laevis* frogs were purchased from Nasco (Fort Atkinson, MI) and maintained at the animal facility under control of room temperature and humidity at 16°C and 65%, respectively. Oocytes were surgically collected from anesthetized animals under 0.17% tricaine and incubated for 1 h with vigorous shaking in frog Ringer ND96 solution (96 mM NaCl/2 mM KCl/1.8 mM CaCl₂/1 mM MgCl₂/5 mM Hepes/Tris, pH 7.4) in the presence of 2 mg/ml collagenase B. Oocytes were then washed four times in ND96, manually defolliculated, and incubated overnight in ND96 at 18°C. The next day, stage V-VI oocytes (40) were injected with 50 nl of water alone or containing 0.2–0.4 μg/μl cRNA *in vitro* transcribed by using the T7 RNA polymerase mMESSAGE kit (Ambion, Austin, TX) from rabbit KCC1 (19), human KCC2 (20), human KCC3 (21), or mouse KCC4 (19) cDNA. Transcription product integrity was confirmed on agarose gels, and concentration was determined by absorbance reading at 260 nm (DU 640; Beckman). For coinjection experiments, the same amount of KCC cRNA was maintained, and 0.1 μg/μl cRNA transcribed from WNK3 or WNK3-D294A was added. Oocytes were incubated at 18°C for 4 days in ND96 supplemented with 2.5 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin. Oocytes were switched to Cl⁻-free ND96 (96 mM Na⁺ isethionate/2 mM K⁺-gluconate/6.0 mM Ca²⁺ gluconate/1.0 mM Mg²⁺ gluconate/5 mM Hepes/2.5 mM sodium pyruvate./5 mg/100 ml gentamicin, pH 7.4) 2 h before the uptake assay.

Assessment of the K-Cl Cotransporter Function. K-Cl cotransport was assessed by measuring tracer ⁸⁶Rb⁺ uptake (New England Nuclear) in experimental groups of at least 15 oocytes. ⁸⁶Rb⁺ uptake was assessed in oocytes exposed to two different osmolar conditions. For uptake in hypotonic conditions, oocytes were incubated for a 30-min period in a hypotonic K⁺- and Cl⁻-free medium [50 mM *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) gluconate/4.6 mM Ca²⁺ gluconate/1.0 mM Mg²⁺ gluconate/5 mM Hepes/Tris, pH 7.4/110 mOsm/kg H₂O] with 1 mM ouabain, followed by a 60-min uptake period in a hypotonic Na⁺-free medium containing 10 mM KCl and 40 mM NMDG-Cl. The uptake solution also contained 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 5 mM Hepes (pH 7.4) and was supplemented with 1 mM ouabain/2.0 μCi of ⁸⁶Rb⁺ (1 Ci = 37 GBq). Parallel groups of oocytes were exposed to Cl⁻-free uptake solution in which Cl⁻ was substituted with gluconate. For uptake in isotonic conditions, we used the same solutions but supplemented with 3.5 g/100 ml sucrose to reach isosmolar conditions for oocytes (≈210 mOsm/kg). Ouabain was added to prevent ⁸⁶Rb⁺ uptake via the Na-K-ATPase. The absence of extracellular Na⁺ and the hypotonicity of the uptake medium prevented ⁸⁶Rb⁺ uptake via the oocyte's endogenous Na-K-2Cl cotransporter (19).

All uptakes were performed at 32°C. At the end of the uptake period, oocytes were washed five times in ice-cold uptake solution and dissolved in 10% SDS, and tracer activity was determined for each oocyte by β-scintillation counting.

cDNA Constructs. Wild-type *pGH19-WNK3*, or *pGH19-WNK3* harboring the kinase-inactivating *D294A*, were described in ref. 16. Wild-type WNK3 was subdivided into the kinase domain (KD, bases 1 to 1,252) and the regulatory domain (RD, bases 1,253 to 5,229). Each domain was subcloned into pGH19 with 5' EcoRI and 3' Xho restriction sites.

Statistical Analysis. Statistical significance is defined as two-tailed, with *P* < 0.05, and the results are presented as mean ± SEM. The significance of the differences between groups was tested by

one-way ANOVA with multiple comparisons by using Bonferroni correction.

This work was supported, in part, by National Institutes of Health (NIH) Specialized Center of Research Grant in Hypertension (to R.P.L.); NIH

Grants DK-36803 (to S.C.H. and G.G.), DK-64635 (to G.G.), and DK-57708 (to D.B.M.); and Wellcome Trust Grant GR070159MA (to G.G.). K.T.K. is a trainee of the NIH Medical Scientist Training Program. P.d.l.H. is supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant. R.P.L. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

1. Gamba, G. (2005) *Physiol. Rev.* **85**, 423–493.
2. Hebert, S. C., Mount, D. B. & Gamba, G. (2004) *Pflugers Arch.* **447**, 580–593.
3. Flatman, P. W. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1566**, 140–151.
4. Adragna, N. C., Fulvio, M. D. & Lauf, P. K. (2004) *J. Membr. Biol.* **201**, 109–137.
5. Lauf, P. K. & Adragna, N. C. (2000) *Cell Physiol. Biochem.* **10**, 341–354.
6. Haas, M. & Forbush, B., III (2000) *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 515–534.
7. Gamba, G. (2005) *Am. J. Physiol.* **288**, F245–F252.
8. Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D. V., Lipkin, G. W., Achard, J. M., et al. (2001) *Science* **293**, 1107–1112.
9. Gamba, G. (2005) *Biochem. J.* **391**, e1–e3.
10. Gagnon, K. B., England, R. & Delpire, E. (2005) *Am. J. Physiol.* **290**, C134–C142.
11. Vitari, A. C., Deak, M., Morriss, N. A. & Alessi, D. R. (2005) *Biochem. J.* **391**, 17–24.
12. Yang, C. L., Angell, J., Mitchell, R. & Ellison, D. H. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 1039–1045.
13. Yang, C. L., Zhu, X., Wang, Z., Subramanya, A. R. & Ellison, D. H. (2005) *J. Clin. Invest.* **115**, 1379–1387.
14. Xu, B.-e., Stippec, S., Chu, P.-Y., Lazrak, A., Li, X.-J., Lee, B.-H., English, J. M., Ortega, B., Huang, C.-L. & Cobb, M. H. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 10315–10320.
15. Kahle, K. T., Rinehart, J., De Los, H. P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S. C., Gamba, G., Gimenez, I. & Lifton, R. P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16783–16788.
16. Rinehart, J., Kahle, K. T., de los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Wilson, F. H., Hebert, S. C., Gimenez, I., Gamba, G. & Lifton, R. P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16777–16782.
17. Lauf, P. K., Bauer, J., Adragna, N. C., Fujise, H., Zade-Oppen, A. M. M., Ryu, K. H. & Delpire, E. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, C917–C932.
18. Mount, D. B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A. L., Jr., Delpire, E. & Gamba, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16355–16362.
19. Mercado, A., Song, L., Vazquez, N., Mount, D. B. & Gamba, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30326–30334.
20. Song, L., Mercado, A., Vazquez, N., Xie, Q., Desai, R., George, A. L., Gamba, G. & Mount, D. B. (2002) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **103**, 91–105.
21. Mercado, A., Vazquez, N., Song, L., Cortes, R., Enck, A. H., Welch, R., Delpire, E., Gamba, G. & Mount, D. B. (2005) *Am. J. Physiol.* **289**, F1246–F1261.
22. Strange, K., Singer, T. D., Morrison, R. & Delpire, E. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, C860–C867.
23. Payne, J. A. (1997) *Am. J. Physiol.* **273**, C1516–C1525.
24. Jennings, M. L. & Schulz, R. K. (1991) *J. Gen. Physiol.* **97**, 799–817.
25. Starke, L. C. & Jennings, M. L. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, C118–C124.
26. Darman, R. B., Flemmer, A. & Forbush, B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34359–34362.
27. Lytle, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15069–15077.
28. Lytle, C. & McManus, T. (2002) *Am. J. Physiol.* **283**, C1422–C1431.
29. Wilson, F. H., Kahle, K. T., Sabath, E., Lalioti, M. D., Rapson, A. K., Hoover, R. S., Hebert, S. C., Gamba, G. & Lifton, R. P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 680–684.
30. Kahle, K. T., MacGregor, G. G., Wilson, F. H., Van Hoek, A. N., Brown, D., Ardito, T., Kashgarian, M., Giebisch, G., Hebert, S. C., Boulpaep, E. L. & Lifton, R. P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14877–14882.
31. Kahle, K. T., Wilson, F. H., Leng, Q., Lalioti, M. D., O’Connell, A. D., Dong, K., Rapson, A. K., MacGregor, G. G., Giebisch, G., Hebert, S. C., et al. (2003) *Nat. Genet.* **35**, 372–376.
32. Xu, B. E., Stippec, S., Lazrak, A., Huang, C. L. & Cobb, M. H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 34218–34223.
33. Xu, B. E., Min, X., Stippec, S., Lee, B. H., Goldsmith, E. J. & Cobb, M. H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 48456–48462.
34. Darman, R. B. & Forbush, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37542–37550.
35. Gimenez, I. & Forbush, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 26946–26951.
36. Bollen, M. (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, 426–431.
37. Cohen, P. T. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 241–256.
38. Connor, J. H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R. E. & Shenolikar, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22366–22372.
39. Lytle, C. (1998) *Am. J. Physiol.* **274**, C1002–C1010.
40. Dumont, J. N. (1970) *J. Morphol.* **136**, 153–180.

Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases

José Ponce-Coria*, Pedro San-Cristobal*, Kristopher T. Kahle[†], Norma Vazquez*, Diana Pacheco-Alvarez*[‡], Paola de los Heros*, Patricia Juárez*, Eva Muñoz[§], Gabriela Michel*, Norma A. Bobadilla*, Ignacio Gimenez[§], Richard P. Lifton[¶], Steven C. Hebert^{||**}, and Gerardo Gamba*^{††}

*Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalpan, 14000 Mexico City, Mexico; [†]Department of Neurosurgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02114; [‡]Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, 03920 Mexico City, Mexico; [§]Department of Pharmacology and Physiology, School of Medicine, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; and Departments of [¶]Genetics and ^{||}Molecular and Cellular Physiology, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510

Contributed by Steven C. Hebert, April 2, 2008 (sent for review December 7, 2007)

The Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is the target of loop diuretics and is mutated in Bartter's syndrome, a heterogeneous autosomal recessive disease that impairs salt reabsorption in the kidney's thick ascending limb (TAL). Despite the importance of this cation/chloride cotransporter (CCC), the mechanisms that underlie its regulation are largely unknown. Here, we show that intracellular chloride depletion in *Xenopus laevis* oocytes, achieved by either coexpression of the K-Cl cotransporter KCC2 or low-chloride hypotonic stress, activates NKCC2 by promoting the phosphorylation of three highly conserved threonines (96, 101, and 111) in the amino terminus. Elimination of these residues renders NKCC2 unresponsive to reductions of [Cl⁻]_i. The chloride-sensitive activation of NKCC2 requires the interaction of two serine-threonine kinases, WNK3 (related to WNK1 and WNK4, genes mutated in a Mendelian form of hypertension) and SPAK (a Ste20-type kinase known to interact with and phosphorylate other CCCs). WNK3 is positioned upstream of SPAK and appears to be the chloride-sensitive kinase. Elimination of WNK3's unique SPAK-binding motif prevents its activation of NKCC2, as does the mutation of threonines 96, 101, and 111. A catalytically inactive WNK3 mutant also completely prevents NKCC2 activation by intracellular chloride depletion. Together these data reveal a chloride-sensing mechanism that regulates NKCC2 and provide insight into how increases in the level of intracellular chloride in TAL cells, as seen in certain pathological states, could drastically impair renal salt reabsorption.

ion transport | loop of Henle | protein serine-threonine kinases | hypertension | diuretics

The renal-specific Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is the major salt transport pathway of the apical membrane of the mammalian thick ascending limb (TAL) of Henle's loop. The activity of NKCC2 is critical for salt reabsorption, countercurrent multiplication, acid-base regulation, and divalent mineral cation metabolism (1). NKCC2 is the main pharmacological target of loop diuretic drugs used worldwide for the treatment of edematous states. The fundamental role of NKCC2 in human physiology and blood pressure regulation has been established by the finding that inactivating mutations in *SLC12A1*, the gene encoding NKCC2, causes Bartter syndrome type I (2), an autosomal recessive syndrome featuring severe volume depletion, hypokalemia, metabolic alkalosis, and hypercalciuria.

NKCC2 is an electroneutral cation-coupled chloride cotransporter (CCC) in the *SLC12* gene family that contains seven members encompassing two different branches. The sodium-driven branch (Na-[K]-Cl) comprises the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter NCC and two different isoforms of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter—the ubiquitous NKCC1 and the kidney-specific NKCC2. The potassium-driven branch (KCCs) comprises four different K⁺-Cl⁻ cotransporters, KCC1–KCC4. Studies have shown that CCCs are regulated by intracellular chloride concentration [Cl⁻]_i by means of phosphorylation and

dephosphorylation events. Phosphorylation activates Na-[K]-CCs and inhibits KCCs, whereas dephosphorylation has the opposite effect (3–5). Extensive work performed with NKCC1 (6–11) has established that cotransporter activation by low intracellular chloride is associated with phosphorylation of specific threonines in its amino terminus. This phosphorylation appears to be due to the activation of a kinase, rather than the inhibition of a protein phosphatase; the existence of a kinase whose activity is modulated by [Cl⁻]_i has been proposed to account for these phenomena (12).

In recent years, serine/threonine kinases from two different gene families have been shown to fit the profile of “Cl⁻-sensing kinases.” One is the WNK family, from which two members (WNK1 and WNK4) are mutated in pseudohypoaldosteronism type II, a Mendelian form of human hypertension. WNK3 increases the activity of the sodium-driven cotransporters Na-[K]-CCs, promoting Cl⁻ influx, but decreases the activity of the potassium-driven cotransporters KCC1–KCC4 to prevent Cl⁻ efflux. Through these reciprocal actions on cellular Cl⁻ influx and efflux pathways, WNK3 regulates the level of [Cl⁻]_i (13–15). The Ste20-type kinases SPAK/OSR1 become phosphorylated in response to decreases in [Cl⁻]_i and also regulate the activity of NKCC1 (12, 16–19). A link between these two different kinase families has been established by the finding that WNK1 and WNK4 interact with and phosphorylate SPAK/OSR1, which enables SPAK/OSR1 to physically associate with, phosphorylate, and activate NKCC1 (20–22).

Here, we show NKCC2 is regulated by [Cl⁻]_i and that phosphorylation of two conserved threonines in its amino terminal domain is involved. Activation of NKCC2 by intracellular chloride depletion requires an interaction between WNK3 and SPAK; WNK3 is positioned upstream of SPAK and appears to be the chloride-sensitive kinase. These observations define a regulatory pathway for NKCC2 and provide insight into how increases in [Cl⁻]_i in Bartter syndrome type III, which results from inactivating mutations in the TAL's basolateral Cl⁻ efflux channel CLC-KB, could lead to the inhibition of NKCC2 activity.

Results

NKCC2 Activity and Phosphorylation Are Increased by Intracellular Chloride-Depletion Maneuvers. We evaluated whether NKCC2 is regulated by [Cl⁻]_i by employing two experimental approaches

Author contributions: J.P.-C., P.S.-C., K.T.K., D.P.-A., N.A.B., I.G., R.P.L., S.C.H., and G.G. designed research; J.P.-C., P.S.-C., N.V., D.P.-A., P.d.I.H., P.J., E.M., G.M., I.G., and G.G. performed research; J.P.-C., P.S.-C., N.A.B., I.G., S.C.H., and G.G. analyzed data; and J.P.-C., P.S.-C., K.T.K., N.A.B., I.G., R.P.L., S.C.H., and G.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

**Deceased April 15, 2008.

††To whom correspondence should be addressed. E-mail: gamba@biomedicas.unam.mx.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0802966105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

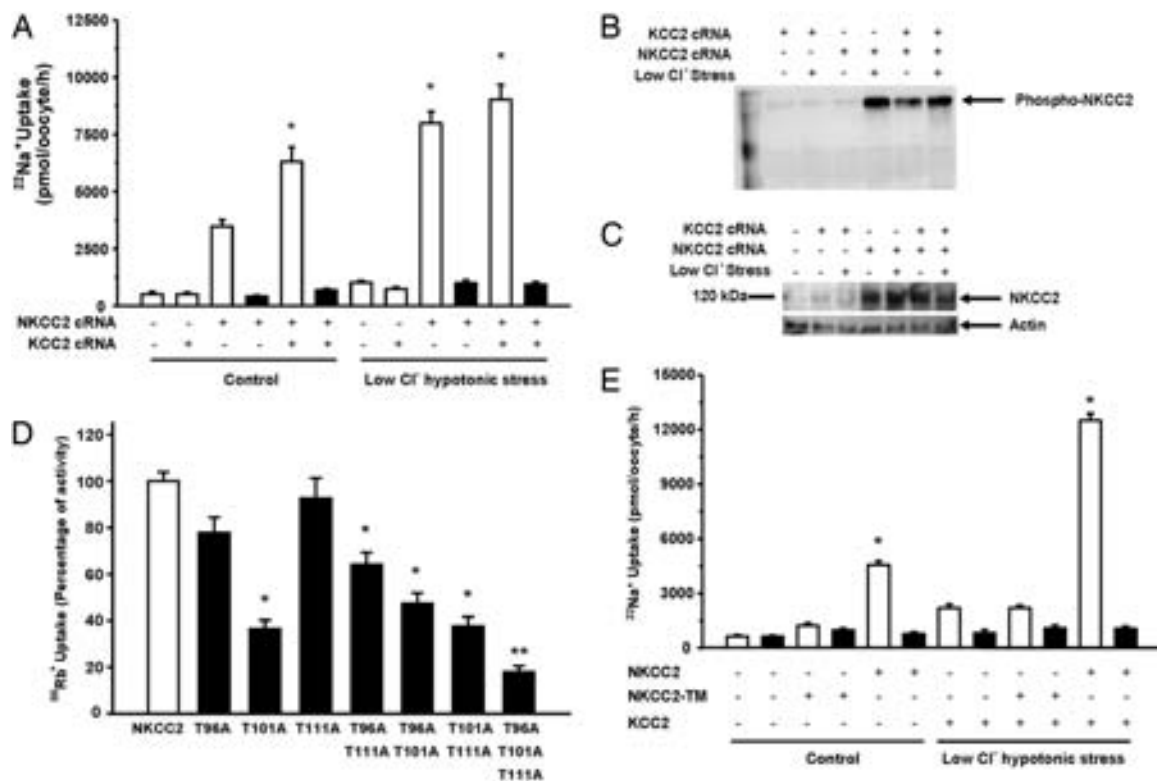


Fig. 1. Regulation of NKCC2 by intracellular chloride-depletion maneuvers. *Xenopus* oocytes were injected with water or 10 ng per oocyte of wild-type or mutant NKCC2 cRNA alone or together with 10 ng per oocyte of KCC2 cRNA, as stated. Four days later, influx experiments or Western blot analyses were performed in control conditions or under low-chloride stress. (A) $^{22}\text{Na}^+$ uptake was assessed in absence (open bars) or presence (filled bars) of 100 μM bumetanide. (B) A representative Western blot analysis performed by using the R5 phosphoantibody (26). (C) A representative Western blot analysis performed with polyclonal anti-NKCC2 and anti-actin antibody (41). (D) Uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ was assessed in oocytes injected with water, wild-type, or mutant NKCC2. Mean value of wild-type NKCC2-injected oocytes was taken as 100%, and the value observed in mutants was normalized. *, significantly different from the uptake observed in wild-type NKCC2; **, significantly different to uptake observed in T101A. (E) Uptake of $^{22}\text{Na}^+$ in oocytes injected with water, wild-type NKCC2 cRNA, or triple-mutant NKCC2 exposed to control conditions and both chloride-depletion maneuvers as stated. Uptake of $^{22}\text{Na}^+$ was performed in the absence (open bars) or presence (filled bars) of 100 μM bumetanide. This is a representative experiment, and each bar represents the mean \pm SEM of 10 oocytes. *, significantly different from the uptake observed in the corresponding control.

that have been used successfully to induce a sustained depletion of $[\text{Cl}^-]_i$ (7, 8, 21, 23, 24). The first strategy used coexpressing KCC2, a transporter that promotes chloride efflux in isotonic conditions (3). The second strategy used exposing oocytes to “low- Cl^- hypotonic stress,” which induces the opening of Cl^- channels promoting Cl^- efflux (25). Oocytes expressing NKCC2 alone exhibited an increase in bumetanide-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake versus water-injected oocytes (Fig. 1A). Coexpression with KCC2 or incubation of oocytes in low-chloride hypotonic stress augmented bumetanide-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake (Fig. 1A). Exposing oocytes to both intracellular chloride-depletion maneuvers did not result in further activation of NKCC2.

Intracellular chloride depletion could augment NKCC2 function by increasing the phosphorylation of residues necessary for its activation, as has been shown previously to occur with shark NKCC1 (7) and NCC (24). In this regard, the amino terminal domain threonines that become phosphorylated in NKCC1 (T184 and T189) and NCC (T53 and T58) in response to chloride depletion are conserved in NKCC2 (T96 and T101); a third phospho-acceptor residue implicated in regulation of NKCC1 (T202) and NCC (S71) also is conserved in NKCC2 (T111) (24). R5 antibody, which recognizes phospho-threonines 184 and 189 in NKCC1, also is able to recognize phospho-threonines 96 and 101 in NKCC2 (26), and the phosphorylation of these threonines in NKCC2 has been shown to have a regulatory role *in vivo* (27). By using R5 antibody, phospho-NKCC2 was detected in homogenates extracted from oocytes expressing NKCC2 and exposed

to low chloride stress and in homogenates from oocytes expressing both NKCC2 and KCC2, but not in those injected with water or expressing KCC2 and exposed to low chloride stress or oocytes expressing NKCC2 alone and exposed to control conditions during uptake (Fig. 1B). The amount of NKCC2 in oocytes was not affected by the intracellular chloride-depletion strategies (Fig. 1C). Densitometric analysis revealed that the ratio between phospho-NKCC2 (Fig. 1B) over total NKCC2 signals (Fig. 1C) of 0.14 in control condition increased to 1.06 after low- Cl^- stress, 1.03 after coinjection of KCC2, and 1.41 when both maneuvers were applied together. Thus, intracellular chloride depletion is associated with increased activity and phosphorylation of NKCC2 at the amino terminal threonines T96 and T101.

Elimination of the Amino Terminal Threonines T96, 101, and 111 Prevents NKCC2 Activation by Intracellular Chloride Depletion. Site-directed mutagenesis was used to substitute threonines 96, 101, and/or 111 of NKCC2 with alanine to produce single, double, or triple NKCC2 mutants. As shown in Fig. 1D, no significant effect was observed by the elimination of T96 or T111 on NKCC2 activity. However, NKCC2 activity was reduced 60% by mutation of T101. NKCC2 activity in the double mutant T96,111A was reduced by 40%, and double mutants in which T101 was involved had activity similar to the single mutant T101A. A triple mutant NKCC2 exhibited a further reduction of activity to nearly 85%. Thus, activity in the triple mutant was significantly lower

than in T101A. Thus, the behavior of the NKCC2 mutants differs from that of NKCC1 (7) or NCC (24), in which basal transporter activity depends on the presence of the second threonine. We exposed oocytes expressing wild-type NKCC2 or triple-mutant NKCC2 to both chloride-depletion maneuvers together (coexpression of KCC2 plus low-chloride hypotonic stress). As shown in Fig. 1E, a significant increase in NKCC2 activity was observed when both maneuvers were applied to oocytes expressing wild-type NKCC2. In contrast, the activity of triple mutant NKCC2 was not increased by chloride-depletion maneuvers. Thus, threonines 96, 101, and 111 not only become phosphorylated when NKCC2 is activated by intracellular chloride depletion, but also are required for its activation.

Regulation of NKCC2 Activity by WNK3 and SPAK Kinases. We next investigated whether the proposed “Cl⁻-sensing kinases” WNK3 and/or SPAK were involved in the mechanism by which intracellular chloride depletion increases NKCC2 activity because these kinases have been shown to regulate other CCCs. Similar to our previous findings (15), the coexpression of NKCC2 with WNK3 resulted in a significant increase in NKCC2 activity by >2-fold [supporting information (SI) Fig. S1]. No effect was observed when SPAK was coexpressed with NKCC2, but the coexpression of SPAK with WNK3 and NKCC2 resulted in a greater increase in bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake than was seen in oocytes expressing WNK3 and NKCC2 (Fig. S1). Because oocytes express WNK and SPAK orthologs that might be important for the functional regulation of heterologously-expressed NKCC2, we analyzed the effect of reducing the endogenous activity of these kinases by coexpressing NKCC2 together with catalytically inactive forms of WNK3 (D294A, termed WNK3-DA) (15) or SPAK (K104R, termed SPAK-KR) that serve as dominant-negative-type mutants or as inhibitors (16). Basal activity of NKCC2 was reduced 65 ± 6.5% (*P* < 0.05) by coinjecting WNK3-DA cRNA and 47 ± 2.6% (*P* < 0.05) with SPAK-KR coexpression. A similar type of inhibition has been observed for NKCC1 when coexpressed with inactive SPAK-KR (12, 19). Thus, although wild-type SPAK had no effect on NKCC2 (Fig. S1), inactive SPAK-KR significantly reduces basal NKCC2 activity. These data show that NKCC2 is inhibited by the catalytically inactive forms of WNK3 and SPAK and suggest that both kinases are required to maintain NKCC2 basal activity.

WNK3 Lies Upstream of SPAK for NKCC2 Activation. WNK1 and WNK4 lie upstream of SPAK in the regulation of NKCC1 (20, 21). Because both WNK3-DA and SPAK-KR inhibit NKCC2, we tested whether WNK3 and SPAK function in the same pathway in the regulation of NKCC2 by injecting WNK3-DA cRNA or SPAK-KR cRNA alone or both inactive kinases together. To increase our ability for detecting additive effects, lesser amounts of each kinase cRNA were injected. Data were normalized to the ⁸⁶Rb⁺ uptakes in oocytes injected with only NKCC2 (Fig. 2, filled bars). As shown in Fig. 2A, coexpression of WNK3-DA or SPAK-KR resulted in a significant 25% inhibition of NKCC2. When both inactive kinases were coexpressed, no further inhibition was observed. These data suggest that WNK3 and SPAK operate in series, and not parallel pathways, to regulate NKCC2.

We next coexpressed inactive WNK3-DA or SPAK-KR in combination with the wild-type SPAK or WNK3, respectively, to determine which kinase is able to rescue NKCC2 from the inhibitory effect of the other's inactive form. Wild-type WNK3 activated NKCC2 in the presence of SPAK-KR (Fig. 2B). In contrast, in the presence of WNK3-DA, the coexpression of wild-type SPAK did not activate NKCC2 (Fig. 2C). These observations suggest that WNK3 is positioned upstream of SPAK.

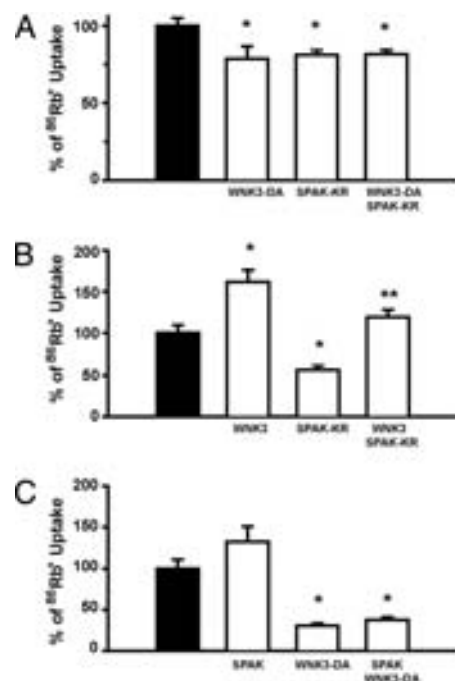


Fig. 2. Effect of the catalytically inactive kinases WNK3-DA and SPAK-KR on the functional expression of NKCC2. For all figures, oocytes were injected with water or 10 ng per oocyte of NKCC2 cRNA alone or together with the active or inactive kinases as stated. Three days later, ⁸⁶Rb⁺ uptake was assessed. Values observed in oocytes injected with NKCC2 alone were taken as 100% for normalization purpose. (A) Oocytes were injected with NKCC2 cRNA alone (filled bar) or together with 2.5 ng per oocyte of WNK3-DA cRNA or SPAK-KR cRNA alone or both inactive kinases together (open bars) as stated. (B) Oocytes were injected with NKCC2 cRNA alone (filled bar) or together with 5 ng/oocyte of wild-type WNK3 cRNA with or without 5 ng/oocyte of SPAK-KR cRNA (open bars). (C) Oocytes were injected with NKCC2 cRNA alone (filled bar) or together with 5 ng per oocyte of WNK3-DA cRNA with or without 5 ng per oocyte of wild-type SPAK cRNA (open bars). *, significantly different from the uptake observed in the NKCC2 cRNA group; **, significantly different from the uptake observed in the NKCC2 cRNA plus SPAK-KR cRNA group.

A SPAK-Binding Motif in WNK3 Is Necessary for WNK3's Activation of NKCC2. According to a recent genome-wide analysis (28), the sequence GRFQVITI in the carboxyl-terminal regulatory domain of WNK3 represents a unique SPAK-binding site that is conserved in mouse, rat, and human WNK3. Thus, the effect of wild-type or WNK3-F1337A on NKCC2 activity and WNK3-SPAK interaction was analyzed. Wild-type WNK3 was able to increase activity, but this effect was completely absent with WNK3-F1337A (Fig. 3A). Consistent with this observation, HA-SPAK was coprecipitated with wild-type c-Myc-WNK3, but not with c-Myc-WNK3-F1337A (Fig. 3B), suggesting that to activate NKCC2, WNK3 and SPAK form a protein complex. The lack of WNK3-F1337A effect on NKCC2 could be alternatively explained if the mutation F1337A reduces WNK3 kinase expression and/or activity, but this scenario is unlikely for three reasons. First, expression of c-Myc-WNK3 or c-Myc-WNK3-F1337A was similar (Fig. 3C). Second, WNK3 without catalytic activity (Fig. 2A) inhibits NKCC2, whereas WNK3-F1337A mutant does not (Fig. 3A). Third, the effect of WNK3-F1337A on KCC4 demonstrates that this construct contains catalytic activity. Both wild-type WNK3 and WNK3-F1337A reduced the activity of KCC4 when oocytes were incubated in hypotonic conditions. Because catalytic activity of WNK3 is required for KCC4 inhibition (13), this observation demonstrates that WNK3-F1337A is an active kinase. Interestingly, this observation also shows that the mechanisms by which WNK3 activates

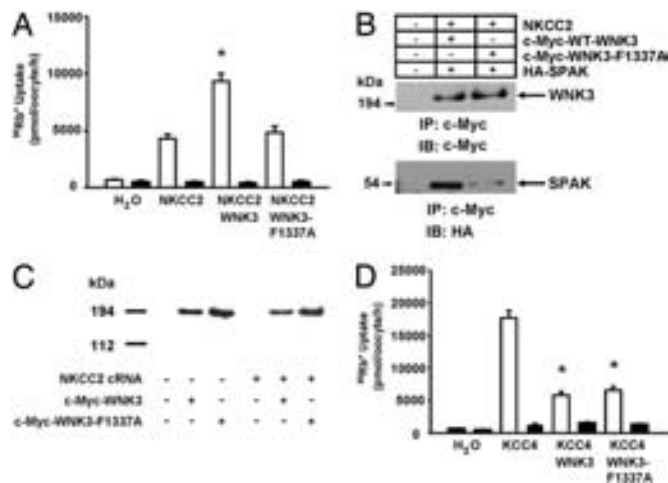


Fig. 3. Effect of elimination of the unique SPAK binding site of WNK3 on the kinase expression and its effects on NKCC2 and KCC4. (A) Uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ in oocytes injected with water, NKCC2 cRNA alone or together with wild-type c-Myc-WNK3 cRNA, or c-Myc-WNK3-F1337A cRNA. Uptake was performed in isotonic conditions in the absence (open bars) or presence (filled bars) of 100 μM bumetanide. *, significantly different from the uptake observed in NKCC2 cRNA group. (B) Oocytes were injected with water, NKCC2 cRNA, c-Myc-WNK3 cRNA, c-Myc-WNK3-F1337A cRNA, and/or HA-SPAK cRNA as stated. Three days later, c-Myc-WNK3 or c-Myc-WNK3-F1337A were immunoprecipitated from corresponding protein homogenates, resolved in SDS/PAGE, and transferred to PDFV membranes. Western blot analyses were performed by using anti-c-Myc or anti-HA monoclonal antibodies as stated. (C) Representative Western blot analysis of proteins extracted from oocytes 3 days after injection with water or NKCC2 cRNA alone or together with wild-type c-Myc-WNK3 cRNA or c-Myc-WNK3-F1337A cRNA as stated. Similar results were observed in the absence of NKCC2 cRNA injections. (D) Uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ in oocytes injected with water, KCC4 cRNA alone or together with wild-type c-Myc-WNK3 cRNA, or c-Myc-WNK3-F1337A cRNA in hypotonic conditions in the presence (open bars) or absence (filled bars) of extracellular chloride. *, significantly different from the uptake observed in the KCC4 cRNA group.

NKCC2 or inhibits KCCs activity are different: Interaction between WNK3 and SPAK is required for NKCC2 activation, but is not necessary for KCC4 inhibition. In this regard, another difference is that WNK3-DA inhibitory effect on NKCC2 is a dominant-negative type of effect, whereas activation of KCCs is not (Fig. S2). Moreover, we have previously shown that activation of KCCs by WNK3-DA is prevented by protein phosphatase inhibitors (13), although this is not the case for NKCC2 inhibitory effect on WNK3-DA or SPAK-KR (Fig. S3).

Amino Terminal Threonines 96, 101, and 111 Are Required for WNK3-Induced Activation of NKCC2. We have previously shown that increased activity of NKCC2 by WNK3 is associated with phosphorylation of threonines 96 and 101, as detected by the R5 phosphoantibody (15). Thus, we analyzed the effect of WNK3 on NKCC2 harboring the triple mutation (T96,101,111A) that eliminates the response to intracellular chloride depletion (Fig. 1D). As shown in Fig. 4A, WNK3 increased the activity of wild-type NKCC2, but had no effect on the NKCC2 triple mutant in which all three threonines were eliminated. These data suggest that the activation of NKCC2 by WNK3 is due to phosphorylation and requires the presence of threonines 96, 101, and 111. Because intracellular chloride depletion also activates NKCC2 by phosphorylating these residues, we reasoned that WNK3 could be the kinase translating the decrease of $[\text{Cl}^-]_i$ into NKCC2 activation, and, in this case, catalytically inactive WNK3-DA should prevent the activation of NKCC2 by intracellular chloride-depletion maneuvers. We therefore tested the effect of both chloride-depletion maneuvers together (coex-

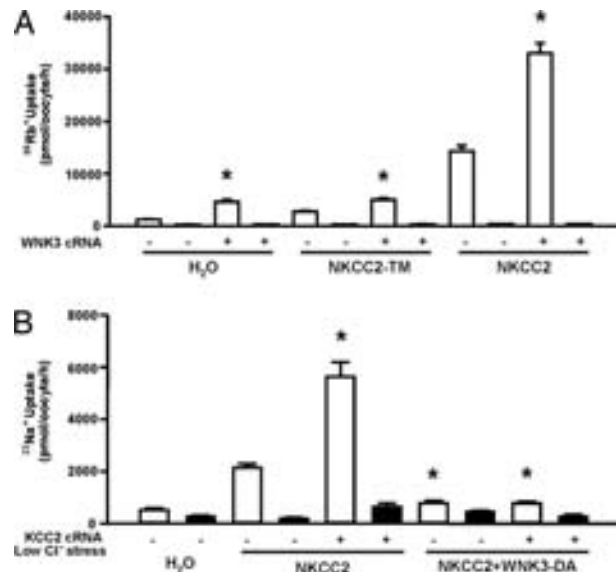


Fig. 4. Effect of elimination of the threonines 96, 101, and 111 in NKCC2 (NKCC2-TM) or coexpression of wild-type WNK3 or chloride depletion maneuvers. (A) Oocytes injected with water, wild-type NKCC2, and triple-mutant NKCC2 were coinjected with WNK3 cRNA as stated. Four days later, $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was assessed in control isotonic conditions. Values observed in water-injected oocytes were subtracted to all groups. *, significantly different from the uptake observed in the corresponding group in the absence of WNK3. (B) *Xenopus laevis* oocytes were injected with water, with NKCC2 cRNA alone, or together with KCC2 cRNA and/or WNK3-DA as stated. Uptakes of $^{22}\text{Na}^+$ were performed in control isotonic conditions or under low-chloride hypotonic stress in the absence (open bars) or presence (filled bars) of 100 μM bumetanide. *, significantly different from the uptake observed in the NKCC2 control group.

pression of KCC2 plus low-chloride stress) on NKCC2 activity coexpressed with WNK3-DA. In the presence of WNK3-DA, the activity of NKCC2 was significantly reduced, as shown previously. Intracellular chloride depletion, however, failed to increase the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake mediated by NKCC2 under these conditions (Fig. 4B). These data show that NKCC2's activation by intracellular chloride depletion is prevented by WNK3-DA.

Discussion

In the present study, we demonstrate that rat NKCC2 expressed in oocytes is activated by intracellular chloride depletion and is associated with phosphorylation of the cotransporter at threonines 96 and 101. Elimination of these two residues, together with T111, renders NKCC2 less active and unresponsive to reduction of $[\text{Cl}^-]_i$. The regulation of NKCC2 by intracellular chloride depletion requires interaction between WNK3 and SPAK, in a pathway in which WNK3 lies upstream of SPAK. This is demonstrated by the fact that eliminating the unique SPAK-binding site in WNK3 (F1337A) prevents the activation of NKCC2 by this kinase. Mutation of threonines 96, 101, and 111 also prevented the response of NKCC2 to WNK3, and overexpression of the catalytically inactive WNK3-DA completely prevented the activation of NKCC2 by intracellular chloride depletion. These data together suggest that changes in $[\text{Cl}^-]_i$ are sensed by WNK3, which in turn interacts with and activates SPAK, promoting the phosphorylation of NKCC2 at threonines 96, 101, and 111, which results in increased activity of the cotransporter.

The regulation of WNK kinases by $[\text{Cl}^-]_i$ has been previously demonstrated. When Xu *et al.* (29) first cloned the cDNA encoding WNK1, they observed that, from a variety of potential stimuli to regulate WNK1, the only positive one was NaCl

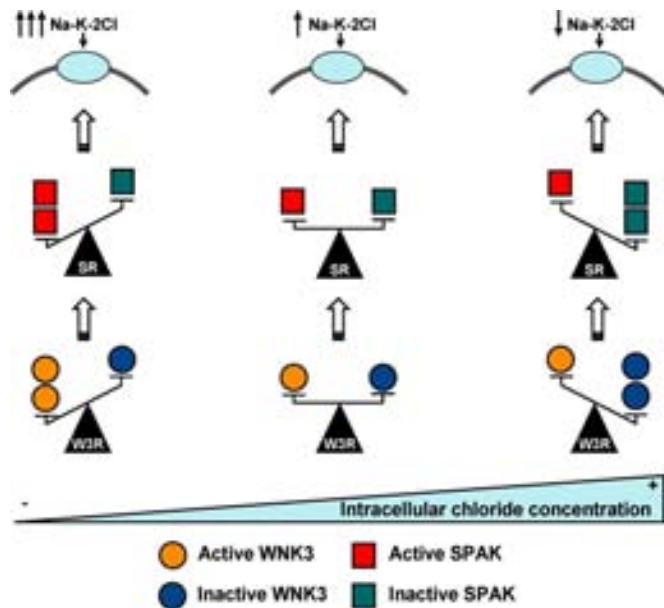


Fig. 5. Proposed model for intracellular chloride, WNK3, and SPAK interaction in the control of NKCC2 activity.

concentration. Later, Lenertz *et al.* (30) showed that WNK1 is activated by osmotic challenges in a variety of cell lines. Moriguchi *et al.* (21) observed in HEK293 cells that the activity of WNK1 and of SPAK/OSR1 kinases is increased by lowering $[Cl^-]_i$ and proposed that WNK1 behaves as an activator of SPAK/OSR1 in response to a decrease in the $[Cl^-]_i$. It remains to be determined how changes in $[Cl^-]_i$ affect the kinase activity of WNK3, if WNK3 directly phosphorylates SPAK, and how a WNK3–SPAK interaction phosphorylates NKCC2.

Fig. 5 depicts our proposed model for the WNK3–SPAK pathway in the regulation of NKCC2. We propose that variations in $[Cl^-]_i$ are associated with changes in the ratio of active versus inactive WNK3 kinase (W3R). Injecting oocytes with wild-type WNK3 cRNA, by increasing W3R, mimics a situation in which $[Cl^-]_i$ is reduced. Increased W3R in turn increases the active versus inactive SPAK kinase ratio (SR) that promotes NKCC2 phosphorylation, thereby increasing the activity of the cotransporter. In contrast, injecting oocytes with WNK3-DA cRNA, by decreasing the W3R, mimics increases in $[Cl^-]_i$, which in turn decreases SR and thus prevents phosphorylation and activation of NKCC2. Injecting oocytes with wild-type SPAK cRNA alone cannot mimic the activation of NKCC2 seen with the reduction of $[Cl^-]_i$ because, although the number of SPAK copies increases, they are not activated by the low amount of WNK3. In contrast, injecting oocytes with inactive SPAK-KR cRNA simulates an increase in $[Cl^-]_i$ because the overexpression of this inactive kinase reduces SR. This model also helps to explain why wild-type SPAK is unable to reverse NKCC2 inhibition by WNK3-DA, but wild-type WNK3 can overcome the inhibition of NKCC2 by SPAK-KR. The latter occurs because, even in the presence of SPAK-KR, overexpression of wild-type WNK3 will increase the SR via activation of endogenous SPAK. By disrupting the SPAK-binding motif of WNK3 (WNK3–F1337A), WNK3 is no longer able to interact with SPAK and thus cannot increase the SR. Thus, NKCC2 activation does not occur. Finally, because the catalytically inactive WNK3-DA exerts a dominant negative-type effect on endogenous WNK3, intracellular chloride depletion no longer activates NKCC2 in the presence of WNK3-DA.

Bartter's syndrome is a heterogeneous disease in which inactivating mutations in NKCC2, the potassium channel ROMK,

and the basolateral chloride channel CIC-KB have been shown to cause Bartter's syndrome type I, II, and III, respectively (31). The mechanisms of disease in Bartter's syndrome type I and II are easily understood; inactivation of NKCC2 directly impairs salt flux through transporter, whereas mutations in ROMK disrupt the potassium-recycling mechanism necessary for continued NKCC2 function. Both types are clinically evident since birth or even before as polyhydramnios. In contrast, the mechanisms by which mutations in CIC-KB cause disease are unclear. Patients with the type III variant show a less severe phenotype that is not clinically evident until late in the first year of life, often exhibiting combined features of Bartter's and Gitelman's syndrome (another form of Mendelian hypotension due to mutations in NCC). In the case of Bartter's type III, CLC-KB-inactivating mutations, by preventing chloride efflux from cells, might indirectly impair the activity of NKCC2 in the TAL and in some cases also of NCC in the DCT, but the clinical consequences takes time to develop until the nephron reaches its maximum development in the early postnatal life (32). Consistent with this hypothesis are the data from this and a previous study (24) that NKCC2 and NCC are regulated by intracellular chloride. Thus, we believe that our observations help to define a regulatory pathway of NKCC2 that provides insight into how increases in $[Cl^-]_i$ in Bartter's syndrome type III could lead to the inhibition of NKCC2 (and NCC) activity.

In conclusion, our data demonstrate that NKCC2 is activated by intracellular chloride depletion by a mechanism that involves WNK3 and SPAK kinases. WNK3 appears to be the Cl^- -sensing kinase that in turn physically interacts with SPAK by means of a unique SPAK-binding site. The interaction results in the activation of SPAK and then in the phosphorylation of NKCC2 at the amino terminal domain threonines 96, 101, and probably 111, which, in turn, results in an increase in NKCC2 activity.

Methods

Clones and Mutagenesis. The cDNAs used in this study were previously described (15, 33–38). Site-directed mutations (QuikChange; Stratagene) were performed to substitute threonines 96, 101, and/or 111 of NKCC2 and WNK3 phenylalanine 1337 for alanine. c-Myc-epitope-tag was introduced into WNK3 after the ATG starting codon by using double-step PCR. A construct containing a fragment of WNK3 from residues 410–482 was done by PCR, and a flag epitope tag was engineered in frame with the rest of coding region. DNA sequencing was used to confirm all mutations. All primers were custom made (Sigma).

Assessment of the $Na^+K^+2Cl^-$ and K^+Cl^- Cotransporters' Function. rNKCC2 activity was assessed by functional expression in *Xenopus laevis* oocytes as described (15, 33, 39). Oocytes were injected with water or rNKCC2 cRNA (10 ng/oocyte) and exposed to two different conditions that promote a decrease in the $[Cl^-]_i$: coinjection with the K^+Cl^- cotransporter KCC2 cRNA (10 ng/oocyte), and low- Cl^- hypotonic stress (24). For influx details and all solutions contents, see *SI Methods*.

Western Blot Analysis and NKCC2 Phosphoantibody Studies. Immunoblots were performed by using a rabbit polyclonal anti-NKCC2 antibody following our previously published protocol (41). Expression of proteins harboring the FLAG (for WNK3–410–482 fragment), HA (for SPAK or SPAK-KR), and c-Myc epitopes (for WNK3, WNK3-DA or WNK3-F1337A) were detected by using the appropriate peroxidase-conjugated monoclonal antibodies (Sigma). R5 antibody was used to detect the phosphorylation status of T96 and T101 in NKCC2 as described previously (26).

Data Analysis. All results presented are based on a minimum of three different experiments with at least 10 oocytes per group in each experiment. Statistical significance is defined as two-tailed, with $P < 0.05$, and the results are presented as mean \pm SEM. The significance of the differences between groups was tested by one-way ANOVA with multiple comparisons using Bonferroni's correction.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported, in part, by National Institutes of Health Grant DK-64635 (to G.G.), El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) Grant 59992 (to G.G.), and a Foundation Leducq for the Transatlantic Network on Hypertension-Renal Salt Handling in the Control of Blood Pressure grant (to G.G., S.C.H., and R.P.L.).

1. Gamba G (1999) Molecular biology of distal nephron sodium transport mechanisms. *Kidney Int* 56:1606–1622.
2. Simon DB, et al. (1996) Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 13:183–188.
3. Gamba G (2005) Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85:423–493.
4. Adragna NC, Fulvio MD, Lauf PK (2004) Regulation of K-Cl cotransport: From function to genes. *J Membr Biol* 201:109–137.
5. Flatman PW (2007) Cotransporters, WNKs and hypertension: Important leads from the study of monogenetic disorders of blood pressure regulation. *Clin Sci (London)* 112:203–216.
6. Darman RB, Flemmer A, Forbush B (2001) Modulation of ion transport by direct targeting of protein phosphatase type 1 to the Na-K-Cl cotransporter. *J Biol Chem* 276:34359–34362.
7. Darman RB, Forbush B (2002) A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem* 277:37542–37550.
8. Flemmer AW, Gimenez I, Dowd BF, Darman RB, Forbush B (2002) Activation of the Na-K-Cl transporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J Biol Chem* 277:37551–37558.
9. Lytle C, Forbush B, III (1992) The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II Regulation by direct phosphorylation. *J Biol Chem* 267:25438–25443.
10. Lytle C, McManus T (2002) Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride. *Am J Physiol* 283:C1422–C1431.
11. Lytle C, Forbush B, III (1996) Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: Modulation by cytoplasmic Cl. *Am J Physiol* 270:C437–C448.
12. Dowd BF, Forbush B (2003) PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem* 278:27347–27353.
13. De Los Heros P, et al. (2006) WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1976–1981.
14. Kahle, et al. (2005) WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16783–16788.
15. Rinehart, et al. (2005) WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16777–16782.
16. Gagnon KB, England R, Delpire E (2006) Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl Cotransporter. *Mol Cell Biol* 26:689–698.
17. Piechotta K, Lu J, Delpire E (2002) Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 277:50812–50819.
18. Piechotta K, Garbarini N, England R, Delpire E (2003) Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: Evidence for a scaffolding role of the kinase. *J Biol Chem* 278:52848–52856.
19. Delpire E, Gagnon KB (2006) SPAK and OSR1, key kinases involved in the regulation of chloride transport. *Acta Physiol (Oxford)* 187:103–113.
20. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR (2005) The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391:17–24.
21. Moriguchi, et al. (2005) WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 280:42685–42693.
22. Vitari, et al. (2006) Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochemistry* 397:223–231.
23. Keicher E, Meech R (1994) Endogenous Na⁺-K⁺ (or NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransport in *Rana* oocytes; anomalous effect of external NH₄⁺ on PH_i. *J Physiol* 475:45–57.
24. Pacheco-Alvarez D, et al. (2006) The Na-Cl cotransporter is activated and phosphorylated at the amino terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 281:28755–28763.
25. Ackerman MJ, Wickman KD, Clapham DE (1994) Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103:153–179.
26. Gimenez I, Forbush B (2005) Regulatory phosphorylation sites in the N-terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol* 289:F1341–F1345.
27. Gimenez I, Forbush B, (2003) Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein. *J Biol Chem* 278:26946–26951.
28. Delpire E, Gagnon KB (2007) Genome-wide analysis of SPAK/OSR1 binding motifs. *Physiol Genomics* 28:223–231.
29. Xu B, et al. (2000) WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275:16795–16801.
30. Lenertz LY, et al. (2005) Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem* 280:26653–26658.
31. Hebert SC (2003) Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:527–532.
32. Horster M (2000) Embryonic epithelial membrane transporters. *Am J Physiol* 279:F982–F996.
33. Gamba G, et al. (1994) Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269:17713–17722.
34. Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G (2002) Functional properties of the apical Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter isoforms. *J Biol Chem* 277:11004–11012.
35. Song L, et al. (2002) Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res* 103:91–105.
36. Mount DB, et al. (1999) Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274:16355–16362.
37. Gagnon KB, England R, Delpire E (2006) Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol* 290:C134–C142.
38. Garzon-Muvdi T, et al. (2007) WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Am J Physiol* 292:F1197–F1207.
39. Meade P, et al. (2003) cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking. *Am J Physiol* 284:F1145–F1154.
40. Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB, Gamba G (2000) Functional comparison of the K⁺-Cl⁻ cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem* 275:30326–30334.
41. Paredes A, et al. (2006) Activity of the renal Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter is reduced by mutagenesis of N-glycosylation sites: Role for protein surface charge in Cl⁻ transport. *Am J Physiol* 290:F1094–F1102.

Papel de la interacción de la cinasa SPAK con WNK3, sobre la actividad de los KCCs.

A partir del análisis de la secuencia de aminoácidos de WNK3, en busca de motivos de unión a SPAK con la secuencia RFXV/I, se identificaron 3 sitios de unión a esta cinasa. El primero con la secuencia **RFKV**, que abarca desde el amino ácido 241, hasta el amino ácido 244 de la secuencia codificante de la WNK3 de humano. El segundo motivo se localiza en los aminoácidos 744-747 y su secuencia es: **RFCI**. Por último, el tercer sitio se ubica a partir del aminoácido 1336 y hasta el 1339, con la secuencia de aminoácidos **RFQV**. Los 3 motivos de unión identificados, cumplen con las características descritas por Delpire y col. {Piechotta, K. Journ Biol Chem} de un motivo de unión a SPAK. Es decir la presencia de residuos de fenilalanina y valina o leucina conservados en las posiciones 2 y 4, respectivamente.

Con el fin de analizar el papel de la interacción entre WNK3 y SPAK sobre la actividad de los KCCs, mediante mutagénesis dirigida, se generaron clones mutantes de cada sitio de unión a SPAK, así como mutantes dobles. A partir del cDNA de cada clona, se llevo a cabo la síntesis de cRNA el cual fue microinyectado en ovocitos de *Xenopus laevis*, junto con el cRNA de los KCCs para realizar ensayos de expresión funcional en condiciones isotónicas e hipotónicas. Cabe mencionar, que en un estudio previo de nuestro laboratorio, se demostró mediante un análisis de RT-PCR anidada, la presencia de la cinasa SPAK endógena del ovocito {Garzón-Muvdi, T Am J Physiol Renal Physiol. 2007} por lo que para esta serie de experimentos, consideramos no necesario inyectar también el cRNA de esta cinasa.

En la figura 8 se muestra el resultado de tres experimentos en los cuales se microinyectó el cRNA de KCC4 solo o en presencia de WNK3 silvestre o las mutantes WNK3 F242A, WNK3 F745A ó WNK3 F1337A en condiciones de hipotonicidad. Como puede observarse, de acuerdo a lo reportado {Mercado, A. J Biol Chem, 2000} {Mount, DB. J Biol Chem 1999} KCC4 en condiciones hipotónicas se activa en forma significativa, siendo esta actividad dependiente de cloro. Cuando se co-exprea con WNK3 silvestre, su función se inhibe significativamente de acuerdo con lo demostrado anteriormente {de los Heros, P, PNAS, 2006}. Este mismo efecto inhibitorio lo podemos observar en presencia de las mutantes WNK3 F745A y WNK3 F1337A. Las cuales previenen la activación del cotransportador en condiciones hipotónicas, en la misma proporción en que lo hace WNK3 silvestre. Lo anterior parece indicar que la capacidad de WNK3 silvestre de

inhibir la función del KCC4 en condiciones en las que normalmente se activa, no depende de la interacción con SPAK en alguno de estos motivos de unión. Sin embargo, el efecto inhibitorio de WNK3 silvestre sobre el KCC4, si parece estar regulado por el sitio de unión a SPAK F242, ya que cuando esta mutante es co-inyectada con el transportador como se muestra en la figura, la cinasa no inhibe la función del KCC4. Esto sugiere, que la interacción de WNK3 con SPAK a través de este sitio de unión, podría jugar un papel importante en la inhibición de de KCC4 por WNK3 en condiciones hipotónicas.

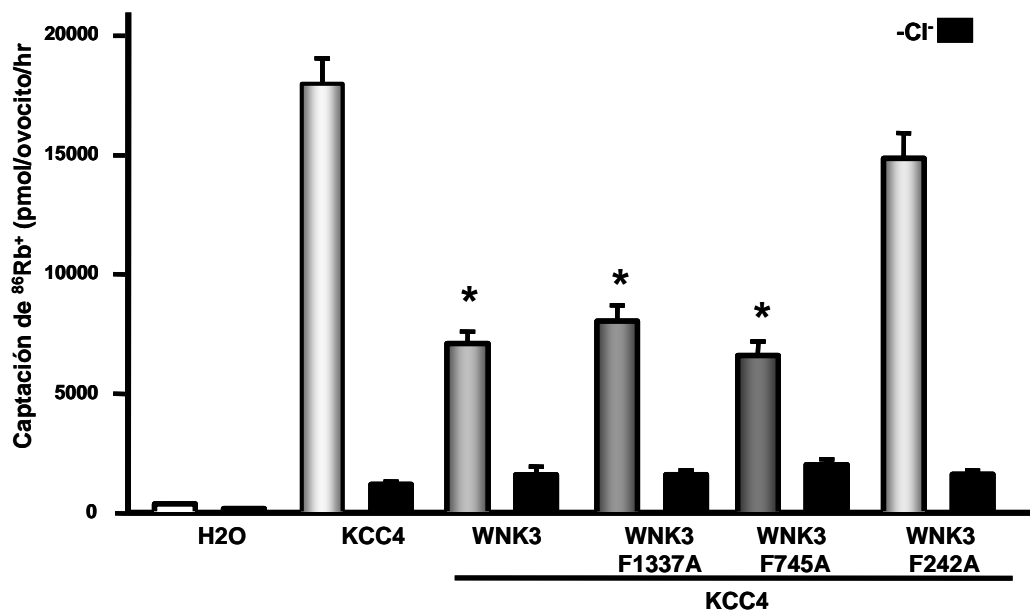


Figura 8. Efecto de la mutación de los sitios de unión a SPAK en WNK3 sobre la función de KCC4. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ se llevo a cabo en condiciones hipotónicas. Cada barra representa la media de 10 ovocitos. La activación de KCC4 es inhibida por WNK3 WT, F1337A y F745A. Sin embargo la mutación F242A, no inhibe la función del transportador en hipotonicidad. * $P < 0.05$ vs. la captación de KCC4.

Con el fin de comprobar que la mutación del sitio F242 de WNK3 es suficiente para impedir la inhibición sobre KCC4, decidimos estudiar el efecto de las mutantes dobles de los sitios de unión a SPAK. Las mutantes dobles evaluadas fueron: WNK3 F242A-F1337A y WNK3 F745A-F1337A. Estas clonas fueron co-inyectadas en ovocitos junto con el cRNA de KCC4 y la función se evaluó en condiciones hipotónicas. Como se muestra en la figura 9, únicamente en presencia de la doble mutante que contiene la mutación F242, la cinasa pierde la capacidad de inhibir al cotransportador y no así cuando se co-expresa con la mutante WNK3 F745A-F1337A que continúa inhibiendo su actividad bajo condiciones en las que normalmente se encuentra activo, tal como lo hace WNK3 silvestre.

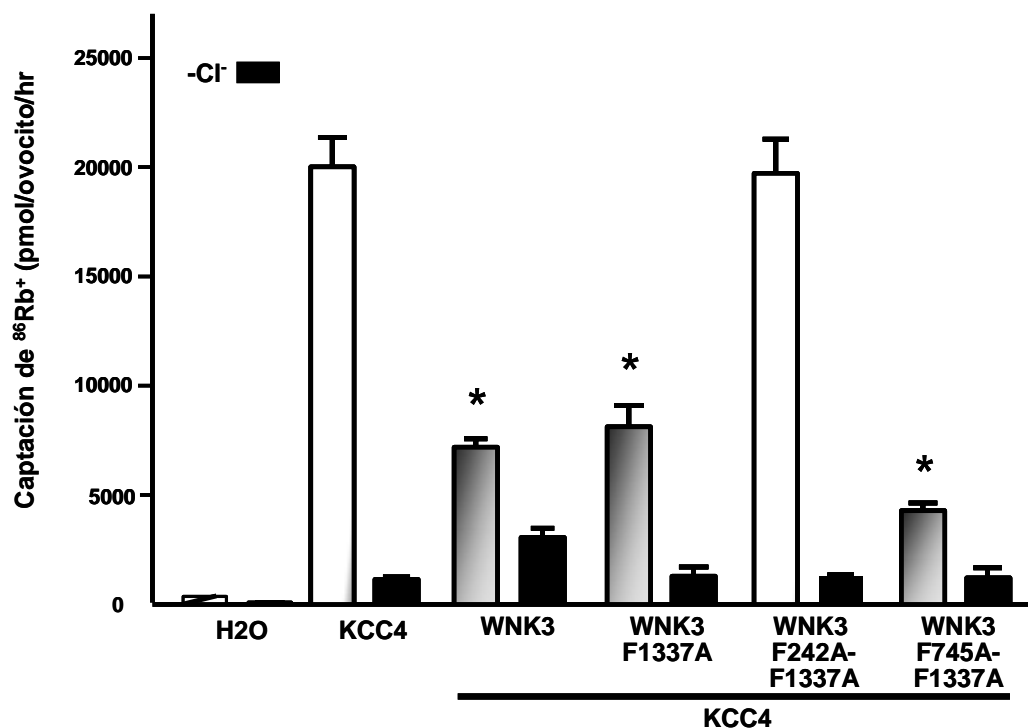


Figura 9. Efecto de las dobles mutantes de WNK3 en la actividad de KCC4. Los ovocitos de *X. laevis* fueron micro-inyectados con 15ng de cRNA de KCC4 solo o presencia del cRNA de cada una de las dobles mutantes. El ensayo se llevo a cabo en condiciones hipotónicas (110 mOsm/kg) * $P < 0.05$ vs. la captación de KCC4

El efecto de las mutantes sencillas, se evaluó también en presencia del cRNA de la isoforma KCC3, con el fin de identificar alguna regulación diferencial de los KCCs por WNK3 y SPAK. Nuevamente, los ovocitos de *X. laevis* fueron micro-inyectados con el cRNA del transportador solo o en presencia de las mutantes de WNK3 y el ensayo de captación se realizó en condiciones hipotónicas. El resultado se muestra en la figura 10, en donde podemos ver que la actividad de KCC3 inducida por aumento del volumen celular es inhibida en presencia de WNK3 silvestre y la mutante F1337A. El resultado sobre la actividad del KCC3 de estas clonas, es el mismo que se observó para KCC4. Así mismo, cuando el transportador se co-expresa con la mutante F242A observamos que esta clona, deja de inhibirlo. Esta serie de resultados demuestran que el sitio de unión a SPAK F242 es necesario para la inhibición de los KCCs en condiciones hipotónicas por WNK3.

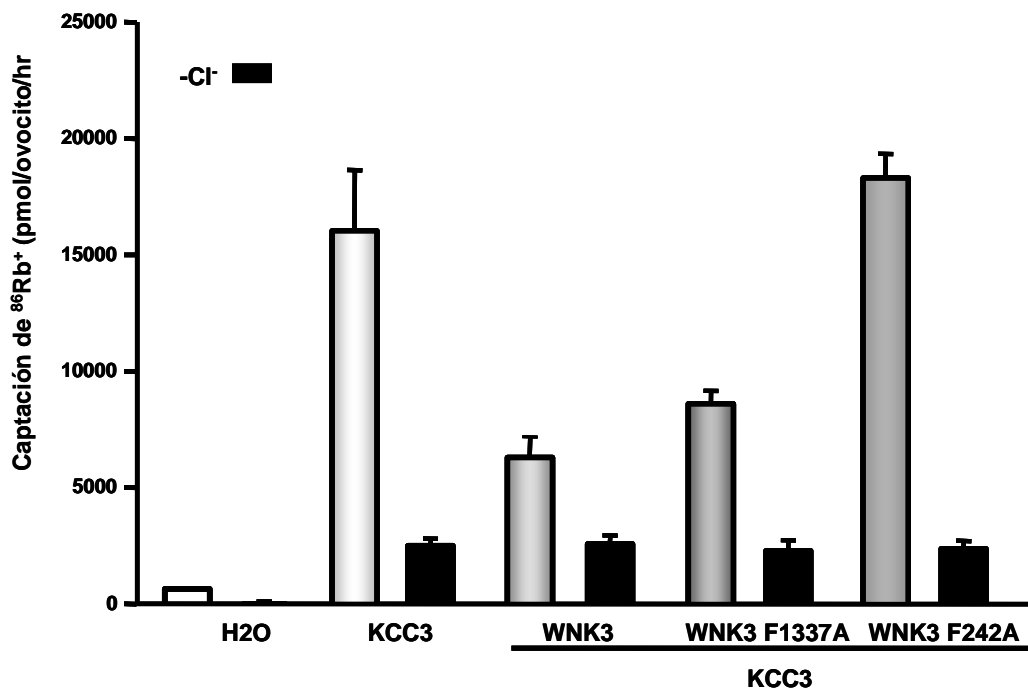


Figura 10. Expresión funcional de la isoforma KCC3 en presencia de WNK3 y dos mutantes de sitios de unión a SPAK (WNK3 F1337A y WNK3 F242A) en condiciones hipotónicas. Las captaciones se llevaron a cabo en presencia (barras grises) o ausencia (barras negras) de Cl⁻ externo. **P* < 0.05 vs. la captación de KCC3

A continuación decimos analizar el efecto de mutar los sitios de unión a SPAK en la clona WNK3 D294A, que como se describe en los artículos publicados, carece de actividad cinasa {Rinehart, J. PNAS. 2005} {Kahle, KT. PNAS 2005} y tiene la capacidad de activar a los KCCs en condiciones isotónicas, bajo las cuales son inactivos. De esta manera, las clonas generadas se nombraron igual, únicamente con el prefijo DA antes de la mutación; *i.e.* WNK3 DA F242A, WNK3 DA F745A y WNK3 DA F1337A.

El efecto de estas mutantes, se evaluó en ovocitos de *X laevis*, co-inyectados con KCC4 en un ensayo de captación de ⁸⁶Rb⁺, llevado a cabo en condiciones isotónicas. En la figura 11 se muestra el efecto de la clona WNK3 DA y WNK3 F1337A sobre la actividad de KCC1 y KCC4. Sin embargo, cabe mencionar que el efecto de estas clonas, se evaluó sobre la función de los cuatro KCCs. En la figura se observa que los transportadores solos, de acuerdo a lo esperado, son totalmente inactivos en estas condiciones {Mercado, A. J Biol Chem, 2000}, y que en presencia de WNK3 DA, la función del transportador aumenta significativamente, tal como se había demostrado previamente {de los Heros, P, PNAS, 2006}. Sin embargo, en los ovocitos en los que se co-inyectó KCC1 y/o KCC4 con WNK3 F1337A, la cinasa pierde la capacidad de activarlos en condiciones isotónicas. Este resultado fue el mismo para las 4 isoformas del transportador. Lo que sugiere que

para que WNK3 DA induzca un aumento en la función de los KCCs en condiciones isotónicas, es necesaria la interacción de SPAK con WNK3 DA en el sitio F1337.

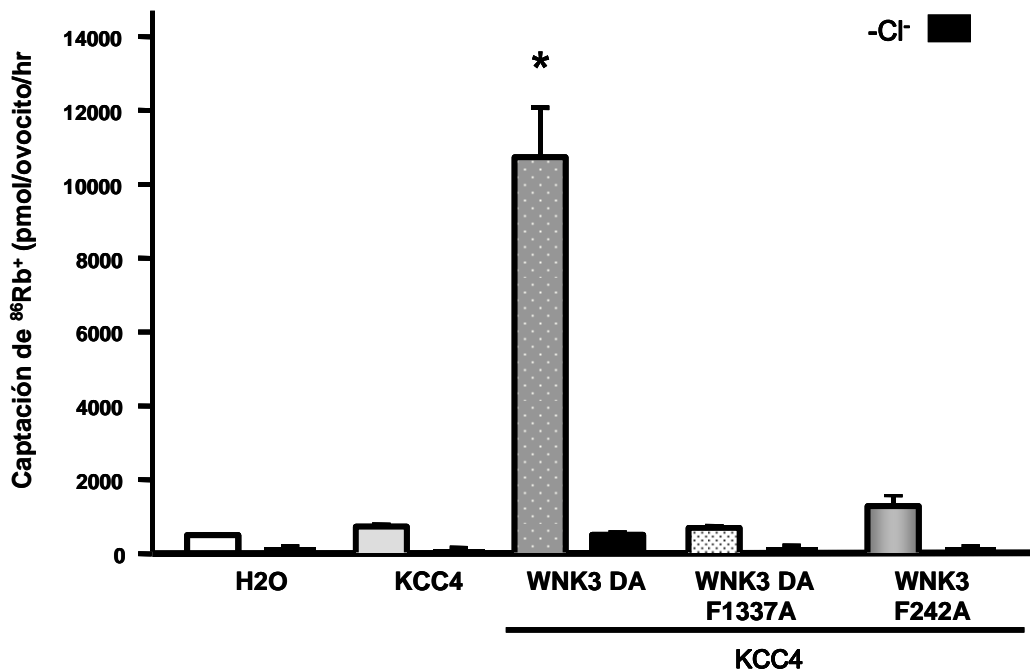


Figura 11. Efecto de la mutación F1337A en WNK3 DA, sobre la función de KCC4. El ensayo de captación se llevó a cabo en condiciones isotónicas (210 mOsm/kg) en ovocitos microinyectados con el cRNA del cotransportador de K-Cl, KCC4 solo, o en presencia de WNK3 catalíticamente inactiva (WNK3 DA), o en presencia de dos mutantes de sitios de unión a SPAK (WNK3 DA F1337A ó WNK3 F242A), con (barras grises) o sin (barras negras) Cl^- extracelular. * $P < 0.05$ vs. la captación de KCC4

Este resultado es interesante cuando se compara con el ensayo en condiciones hipotónicas, en el cual la mutación de este sitio en la WNK3 con actividad catalítica (WNK3 F1337A), no interrumpe la capacidad de inhibir a los KCCs. Al parecer inhibir o activar a los KCCs en condiciones hipotónicas o isotónicas respectivamente por WNK3, está regulado por un sitio de unión a SPAK diferente; F242 para el primer caso y F1337 para el segundo.

En este mismo ensayo, se incluyó un grupo de ovocitos microinyectados con el cRNA de la clona WNK3 F242A. Esto se realizó, debido a que este sitio de unión a SPAK se localiza muy cerca del dominio cinasa de WNK3. Por lo cual al mutarlo, la actividad de la cinasa pudo verse afectada y debido a esto deja de inhibir a los KCCs en condiciones hipotónicas. En este caso, se esperaba que la clona se comportara como una WNK3 DA y que al co-inyectarla con algún KCC en condiciones isotónicas lo activara significativamente. Sin embargo, como se observa en la última barra de la gráfica 11, este

no fue el caso. Ya que WNK3 F242, no activó a KCC4. Es decir, la mutación del sitio de unión a SPAK, no modificó su actividad cinasa. Lo que sugiere, que en efecto la interacción de WNK3 con SPAK en este sitio es fundamental para inhibir a los KCCs en condiciones hipotónicas, bajo las cuales se activan significativamente.

DISCUSIÓN

REGULACIÓN DE LOS COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS POR LA CINASA WNK3

Diversos estudios, han establecido la importancia de las cinasas WNK1 y WNK4 en la regulación del equilibrio del NaCl y el K⁺ en el organismo (71). Debido a lo anterior, en el presente estudio decimos analizar si WNK3; otro miembro de esta familia de cinasas (WNKs), juega un papel similar o relacionado. Para llevarlo a cabo evaluamos el efecto de esta cinasa sobre las propiedades funcionales de los miembros de la familia de cotransportadores electroneutros de cationes-cloro (SLC12A) (42). En el humano, esta familia de cotransportadores regula la entrada y salida de Cl⁻ de las células de todo el cuerpo, a través de los cotransportadores de Na-K-Cl y K-Cl, respectivamente. Sus acciones coordinadas, son necesarias para la regulación de la excitabilidad neuronal, la homeostasis de la presión arterial y el mantenimiento del volumen celular (56).

Inicialmente amplificamos mediante RT-PCR la secuencia completa del cDNA de la WNK3 de humano, previamente reportada (58) y la insertamos en el vector de expresión pGH19, a partir del cual sintetizamos *in vitro* el cRNA para inyectarlo en ovocitos de *X. laevis*, en conjunto con el cRNA de los diferentes cotransportadores de la familia SLC12A. Nuestros resultados muestran que en efecto, WNK3 es un regulador de la función de todos los miembros de esta familia. Esta cinasa, constituye un potente activador de los cotransportadores que utilizan Na⁺ como catión, es decir de los que se encargan de la entrada de Cl⁻ hacia el interior de la célula (NCC, NKCC1 y NKCC2) (71), mientras que es un potente inhibidor de los miembros de la familia que utilizan K⁺ como catión (KCC1-KCC4) (23) y que por lo tanto producen flujo de Cl⁻ hacia fuera de la célula. Un resultado interesante, es que cuando la actividad cinasa de WNK3 se elimina mediante la mutación D294A (159), el efecto se revierte completamente: WNK3 D294A se comporta como un inhibidor de los cotransportadores NCC, NKCC1 y NKCC2 (126) y como un activador de los KCCs.

Los análisis de inmunofluorescencia mostraron que en el riñón, WNK3 se expresa a todo lo largo de la nefrona, incluyendo el túbulo distal, el asa

ascendente de Henle y el túbulo colector, regiones donde se localizan con los cotransportadores NCC, NKCC2, KCC3 y KCC4. En el cerebro de ratón los transcritos de WNK3 fueron muy abundantes y su expresión se encontró estrictamente regulada durante el desarrollo embrionario, en un patrón muy parecido al del KCC2. Los estudios de hibridación *in situ* revelaron gran expresión de la cinasa en el hipotálamo, cerebelo y neuronas GABAérgicas corticales, en donde se propone se co-expresa con el NKCC1 y KCC2 [10]. Mientras que en ciertos epitelios encargados de la secreción de Cl⁻, tales como ductos pancreáticos, conductos biliares, epidídimo, epitelio del intestino delgado y células secretoras de Cl⁻ en el estómago, el análisis de inmunofluorescencia mostró sitios de co-expresión con NKCC1 y KCC1.

La localización de WNK3 en células de tejidos que expresan a los diferentes miembros de la familia SLC12, en donde se sabe que regulan el balance de la entrada y salida de Cl⁻, nos permite hacer conjeturas sobre la importancia *in vivo* de la actividad reguladora de WNK3. Asimismo, dado que en una misma célula se expresan varios cotransportadores sugiere que WNK3 puede ser parte importante del sistema de integración y/o regulación de estos cotransportadores ya sea para determinar la concentración de Cl⁻ intracelular o participar en funciones tisulares complejas.

Como se mencionó anteriormente, los KCCs transportan Cl⁻ fuera de las células, se inhiben por fosforilación y se activan por defosforilación de la proteína, mientras que los NKCCs regulan la entrada de Cl⁻ y muestran la regulación opuesta (55) (85). Debido a esta regulación recíproca ocasionada por el mismo estímulo, se ha postulado, que una "cinasa sensible a Cl⁻ y/o a volumen" regula ambas ramas de la familia (93) (96) (95). Nuestros resultados muestran que el aumento en la actividad de NKCC2 y de NKCC1 cuando se co-inyectaron con la WNK3 silvestre, se asoció con un aumento en la fosforilación de dos residuos de treonina en los extremos amino terminales de los transportadores; estos mismos residuos en diversos estudios se ha demostrado que son necesarios para la activación de los cotransportadores (49) (126). Los efectos de WNK3 se observaron también en condiciones de hipotonicidad, condiciones bajo las cuales NKCC1 y 2 se encuentran normalmente defosforilados y por lo tanto inactivos. Por otra parte, cuando se co-expresaron con la cinasa mutada, la fosforilación de los transportadores se

redujo en forma significativa, lo cual puede correlacionarse con la inhibición de la actividad observada. Lo anterior indica que los efectos de WNK3 sobre NKCC1 y NKCC2 están asociados con la fosforilación de los sitios regulatorios del extremo amino terminal. En contraste la co-expresión de WNK3 con los KCCs produjo la inhibición de estas isoformas, aún en condiciones hipotónicas bajo las cuales los cotransportadores se encuentran defosforilados y activos. En forma interesante cuando los experimentos se llevaron a cabo en presencia de la mutante WNK3-D294A, bajo condiciones isotónicas en las cuales los KCCs son normalmente inactivos, se observó un incremento significativo en su función. El aumento en la activación de los KCCs en condiciones “inhibitorias” (isotónicas) se vio suprimido en presencia de los inhibidores de las proteínas fosfatasas 1 y 2b, caliculina A y ciclosporina A, respectivamente. Lo anterior demuestra, que el efecto de WNK3 es dependiente de su interacción funcional con proteínas fosfatasas específicas; las cuales como se ha demostrado previamente, son necesarias para la activación de los KCCs (102)

Nuestros resultados muestran que WNK3 regula de manera coordinada a los KCCs y a los NKCCs, alterando recíprocamente su fosforilación y defosforilación, lo que sugiere que WNK3 podría ser la cinasa sensible a Cl^- y/o volumen celular que coordina la actividad de los cotransportadores electroneutros. Sin embargo, se requieren aún estudios donde se examine la actividad de WNK3 en respuesta a cambios en el volumen celular y en Cl^- intracelular, para poder atribuirle esta identidad. Estos análisis, sin duda constituirán un tema de gran importancia en las futuras investigaciones de WNK3. Por otra parte, se ha reportado también que tanto la autofosforilación como la actividad de WNK1, se incrementan significativamente bajo concentraciones elevadas de NaCl y cuando es expuesta a diferentes condiciones de estrés, tales como presencia de glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol, KCl y urea. De manera tal que esta vía de regulación podría estar constituida por varios sensores que detectan cambios en la concentración intracelular de Cl^- así como cambios en el volumen celular o la tonicidad extracelular y transductores de estas señales, tales como cinasas y fosfatasas que como respuesta final lleven a cabo la fosforilación o defosforilación de los cotransportadores.

Dado que WNK3, al igual que las otras WNKs, posee en su estructura un dominio autoinhibitorio y requiere de autofosforilarse para activarse (149; 160), creemos que es posible que en condiciones fisiológicas pueda actuar tanto en su forma silvestre como en su forma catalíticamente inactiva. En este modelo su actividad de cinasa estaría bajo la influencia de la concentración de cloro intracelular ($[Cl^-]_i$). De tal manera que cuando la $[Cl^-]_i$ baja, la actividad de su dominio autoinhibidor se bloquea, permitiendo que la cinasa se autofosforile y se active; promoviendo así la fosforilación de los SLC12, con lo que NCC, NKCC1 y NKCC2 se activan y meten cloro a la célula, mientras que los KCCs se inhiben y dejan de sacar Cl^- . En cambio, al aumentar la $[Cl^-]_i$, el dominio autoinhibidor previene la autofosforilación de WNK3 y se comporta como WNK3 D294A, la cual no solo deja de inducir fosforilación de los cotransportadores, sino que promueve la de-fosforilación de estos y la activación de las proteínas fosfatasas PP1 y PP2B. En consecuencia, los cotransportadores se defosforilan y entonces se inhibe la entrada de Cl^- vía NCC, NKCC1 o NKCC2 y se activa la salida de este ión de la célula a través de los KCCs. Además de actuar como cinasa, es probable que WNK3 cumpla también una función como proteína de andamiaje y que su participación sea crítica para que las PPs ejerzan su acción defosforiladora sobre los cotransportadores. En este sentido, las observaciones muestran claramente que el efecto de WNK3 D294A sobre los KCCs depende de la función de la PP1 y de la PP2B. Es decir, cuando WNK3 no está fosforilada y no es activa, probablemente vía andamiaje podría permitir o promover la interacción entre las PPs y los KCCs.

Aún no está claro, si WNK3 silvestre incrementa la fosforilación de los cotransportadores de manera directa, activando otra cinasa corriente abajo o inhibiendo a las proteínas fosfatasas. Tampoco queda resuelto si WNK3 DA reduce la fosforilación de los cotransportadores actuando como un efecto dominante negativo. Lo que si está claro, es que para llevar a cabo su efecto, se requiere la actividad de las PPs, ya que al menos para los KCCs, su efecto estimulador es prevenido en presencia de los inhibidores de fosfatasas.

La co-expresión *in vivo* de WNK3 con sus proteínas blanco; los cotransportadores electroneutros, sugiere que los efectos de WNK3 son fisiológicamente relevantes en procesos celulares que van desde la regulación

del volumen celular, la excitabilidad neuronal hasta la regulación de la presión arterial. A continuación se presenta una discusión sobre estas posibles implicaciones

En la mayoría de las células, el cambio de volumen celular basal, altera una diversidad de funciones. Con el fin de mantener la homeostasis las células están equipadas para responder a estos cambios en volumen celular inducidos por alteraciones en la osmolaridad interna o externa. Los CEN, particularmente NKCC1 y KCC1 juegan un papel fundamental en la regulación del volumen, al regular la concentración intracelular de cloro (42; 81; 130). Cuando las células son expuestas a un medio hipertónico, estas disminuyen su volumen celular por salida de agua, en consecuencia el NKCC1 se activa y el KCC1 se inhibe, con objeto de meter iones a la célula para igualar la osmolaridad intracelular en relación con el exterior y recobrar así el volumen original. En contraste, cuando las células se exponen a hipotonicidad, éstas aumentan su volumen debido a la entrada de agua. En consecuencia el NKCC1 se inhibe y el KCC1 se activa con el objeto de sacar iones de la célula para igualar la osmolaridad con el exterior y así, recobrar el volumen original. En este trabajo observamos que WNK3 se posiciona como el ideal regulador de la respuesta de los cotransportadores a cambios en el volumen celular. WNK3 activa a NKCC1 aún en hipotonicidad, e inhibe la activación de KCC1 inducida por aumento del volumen celular (71). Por el contrario, WNK3 DA hace lo contrario: bloquea la función de NKCC1, inclusive en hipertonicidad y activa a los KCCs en ausencia de hipotonicidad. Es decir, que de acuerdo a nuestros experimentos la presencia de WNK3 o WNK3 D294A hace a los cambios de volumen celular innecesarios para activar o inhibir a los cotransportadores. Por lo que proponemos que WNK3 puede ser la cinasa que se activa o desactiva ante cambios en el volumen celular. Por ejemplo, si durante el encogimiento celular WNK3 se autofosforila, esto tendría como consecuencia la activación del NKCC1 e inhibición de KCC1. En cambio, si durante el hinchamiento celular WNK3 se defosforila (similar a WNK3 DA), esto tendría como consecuencia la inhibición del NKCC1 y la activación del KCC1.

La WNK3 se expresa en el sistema nervioso y particularmente en las neuronas con poseen en su membrana receptores ionotrópicos para GABA. La

presencia de WNK3 en estas neuronas podría cumplir la función de controlar la concentración intraneuronal de cloro al regular simultáneamente la función del NKCC1 y el KCC2. Como se mencionó en la introducción, la actividad del NKCC1 como vía de entrada de Cl^- y de KCC2 como vía de salida, determinan la concentración de este ión en el interior de las neuronas y esto a su vez determina el tipo de respuesta a neurotransmisores como el GABA, que al funcionar a través de un receptor acoplado a canales de cloro, es excitador cuando la concentración intracelular de cloro está por arriba de su equilibrio electroquímico, mientras que cuando dicha concentración está por debajo del punto de equilibrio, GABA es un neurotransmisor inhibitorio, (25; 92; 115; 127). Por lo tanto, nuestras observaciones sobre las propiedades funcionales de WNK3 tienen implicaciones interesantes para diversos procesos en el sistema nervioso central. Dado que la WNK3 podría tener un papel importante en la regulación de la respuesta a este neurotransmisor.

Demostramos también que WNK3 se expresa a lo largo de la nefrona, incluyendo el asa ascendente de Henle y el túbulo distal, lo cual sugiere que podría tener efecto sobre la actividad de los cotransportadores NKCC2 y NCC respectivamente, en estos lugares. El NKCC2 y el NCC forman parte de los genes implicados en definir la presión arterial normal y por lo tanto, potencialmente pueden estar involucrados en la génesis de la hipertensión arterial esencial. Mutaciones inactivantes del NKCC2 y del NCC producen síndrome de Bartter y síndrome de Gitelman, respectivamente (99; 100; 136; 137); enfermedades que cursan con alcalosis metabólica hipocalémica e hipotensión arterial. Por lo tanto, la disminución en la función de estas proteínas resulta en hipotensión arterial. De hecho, ambas son las receptoras para los diuréticos de mayor utilización en la terapia antihipertensiva (19). Por otro lado, como fue comentado en la introducción, las mutaciones en las cinasas WNK1 y WNK4 producen una enfermedad hereditaria que cursa con hipertensión arterial (155) por un mecanismo que al parecer involucra incremento en la actividad del NCC, por pérdida de regulación negativa sobre este cotransportador (156; 162). Esto sugiere entonces que la hiperactividad del NCC o del NKCC2 podrían estar relacionadas con el desarrollo de hipertensión arterial. La actividad de otros transportadores de la familia ha mostrado también relación con la regulación de la presión arterial. Los ratones

knockout para el NKCC1 desarrollan hipotensión arterial (111), mientras que los ratones *null* para KCC3 desarrollan hipertensión arterial (6). La actividad de este último cotransportador, KCC3, también se ha visto relacionada con el efecto vasodilatador de ciertos fármacos antihipertensivos (5). Por lo tanto, que WNK3 constituya un multi-regulador de la función de todos los cotransportadores electroneutros, la convierte en una cinasa importante en el manejo de la presión arterial y por ende, en un candidato para la génesis de la hipertensión arterial, así como en un nuevo blanco para desarrollo de terapias antihipertensivas.

REGULACIÓN DE LOS COTRANSPORTADORES DE K-Cl⁻ POR LA CINASA WNK3 A TRAVÉS DE SPAK

Diversos estudios bioquímicos y funcionales, han demostrado que las WNKs pueden regular a los cotransportadores electroneutros a través de la activación de otra serina-treonina cinasa denominada SPAK (120) (150). Esta cinasa, fue descubierta recientemente (181) (146) y su actividad se ha relacionado con diversos e importantes procesos celulares, que incluyen diferenciación y proliferación celular (182) (183), rearrreglos del citoesqueleto (184) y recientemente regulación de transportadores iónicos (121) (31). Piechotta y col. (40) demostraron mediante un ensayo de doble híbrido, que algunos miembros de la familia SLC12, como el KCC3 y el NKCC1, interaccionan con SPAK y que esta interacción ocurre a través de un “dominio de unión a SPAK” [RFx(V/I)] presente en la secuencia de los cotransportadores. La distribución tisular de SPAK, mostró que esta cinasa co-localiza con el NKCC1 en las glándulas salivales (121), el plexo coróideo (123), las células parietales del estómago (120) y los ganglios dorsales (145). Asimismo estudios previos demostraron la expresión de SPAK en neuronas y en otros epitelios encargados del transporte de iones, tales como el epitelio renal, particularmente en la nefrona distal (146). Estas observaciones con respecto a SPAK y al NKCC1 estimularon el desarrollo de una serie de estudios con el fin de analizar el mecanismo por el cual SPAK regula la actividad del NKCC1. Primeramente Dowd y col., (31) demostró que la co-expresión de una forma dominante negativa de SPAK (DN-SPAK) con el NKCC1, resultaba en una reducción de la actividad del

cotransportador. Esta forma dominante negativa de SPAK, inhibía la fosforilación de los mismos 2 residuos de treonina del extremo amino terminal del NKCC1 que son fosforilados en presencia de WNK3. Otras dos observaciones importantes de este estudio, fueron primero: que la inhibición del NKCC1 por DN-SPAK se perdía en presencia del inhibidor de la proteína fosfatasa 1, caliculina A. Es decir que el efecto de DN-SPAK resulta de una alteración en la dinámica cinasa/fosfatasa y segundo: el estado de fosforilación de SPAK, coincidía con el del NKCC1, el cual incrementaba significativamente en concentraciones intracelulares bajas de Cl⁻. Esto sugería que SPAK es una cinasa sensible a Cl⁻ involucrada en la regulación del NKCC1. Posteriormente, la interacción entre SPAK y WNK4 quedó demostrada mediante un ensayo de doble híbrido (121). Los experimentos funcionales en ovocitos de *X. laevis* demostraron que para que SPAK regule al NKCC1, es necesaria la presencia de WNK4. Para activar al NKCC1, tanto en condiciones isotónicas como hipertónicas, además de la presencia de ambas cinasas, se requiere su actividad catalítica y la interacción física entre ellas (121). Estos estudios demostró la existencia de una nueva interacción entre las cinasas WNK y SPAK en la regulación del cotransportador de Na-K-Cl.

Recientemente, la interacción entre WNK4-SPAK-NKCC1 se ha analizado con mayor detalle a nivel bioquímico. En células de mamífero, Vitari y Moriguchi (108) (151) identificaron que WNK4 se une a SPAK y la fosforila en dos residuos de treonina, lo que a su vez induce la fosforilación del NKCC1 en su extremo amino. Interesantemente, en estos estudios se demostró que tanto el NKCC2 como el NCC, se fosforilaban también en el extremo amino, en presencia de WNK4 y SPAK. En conclusión estos estudios demuestran que SPAK es una cinasa que interactúa directamente y fosforila a NKCC1, NKCC2 y NCC y que su actividad es regulada por cinasas corriente arriba como WNK1 y WNK4 (26)

Hasta fechas recientes, no se conocía la existencia de una cascada de fosforilación que incluyera a las WNKs y a SPAK en la regulación de los KCCs. Sin embargo, en el 2007, nuestro laboratorio publicó un estudio en el que se demuestra, que WNK4 modula la actividad de los KCCs. En ovocitos de *X. laevis*, WNK4 inhibe la activación de los KCCs durante el aumento del volumen celular y para llevarlo a cabo, requiere su actividad catalítica, ya que en

presencia de una WNK4 catalíticamente inactiva (WNK4 DA), el efecto inhibitorio se perdió por completo (46). La regulación negativa de WNK4, no se vio afectada por la presencia y/o actividad de SPAK. Cuando los ovocitos se co-inyectaron con el cRNA de SPAK o el cRNA de una dominante negativa de SPAK (SPAK KR) junto con el de WNK4, la función de los KCCs permaneció inhibida. Es decir que el efecto de WNK4 sobre los KCCs en el ovocito, es independiente de SPAK. En este estudio, se demostró también una regulación diferencial de los KCCs por WNK4, ya que cuando los experimentos se realizaron en condiciones isotónicas, bajo las cuales los KCCs son inactivos, en presencia de WNK4 DA, esta indujo la activación de KCC3 y KCC2, pero no de KCC1 y KCC4.

Tomando en cuenta este y los estudios anteriores con WNK4 y los CEN, podemos resumir que WNK4 sola, inhibe al NKCC1 (69) y en presencia de SPAK lo activa (40) (108) (150), mientras que WNK4 sola o co-expresada con SPAK, inhibe a los KCCs. De tal manera que en presencia de SPAK, WNK4 activa a los miembros de la familia SLC12 encargados de la entrada de de Cl⁻ e inhibe a los responsables de la salida de este ión. Esta regulación, es similar a la observada para WNK3, que activa al NCC, NKCC1 y NKCC2 e inhibe a los KCCs.

Con el fin de continuar el análisis de las WNKs y SPAK en la regulación de los CEN, decimos analizar el papel de SPAK en la regulación de los KCCs por WNK3. La estrategia empleada, fue mediante la interrupción de la interacción de WNK3 con SPAK. Para llevarlo a cabo, se decidió mutar los 3 motivos de unión a SPAK presentes en la secuencia de WNK3 mediante mutagénesis dirigida. Las clonas resultantes, fueron transcritas *in vitro* para sintetizar a partir de ellas cRNA, el cual fue microinyectado en ovocitos de rana *X. laevis* junto con el cRNA de diferentes KCCs. Nuestros resultados muestran que WNK3 “activa o inactiva” depende de la interacción con SPAK a través de ciertos motivos de unión, para poder llevar a cabo su efecto sobre los KCCs. En condiciones hipotónicas, es decir de activación para los KCCs, WNK3 silvestre inhibe su función. Sin embargo, la mutación del sitio de unión a SPAK F242A modifica esta inhibición previniéndola completamente, lo que sugiere que para inhibir a los KCCs, durante el aumento del volumen celular o presencia de condiciones hipotónicas, WNK3 forma un complejo con SPAK a

través de este motivo de unión. En condiciones isotónicas, bajo las cuales los KCCs se encuentran inactivos y WNK3 DA induce una gran activación de su función, aparentemente, el motivo de unión a SPAK involucrado en esta regulación parece ser el sitio F1337A. Esta mutación en WNK3 DA, previene completamente su efecto activador sobre los cuatro KCCs.

Es interesante notar, que esta misma mutación pero sobre WNK3 silvestre, mantiene la capacidad de inhibir a los KCCs en condiciones hipotónicas. El efecto de esta clona, se probó recientemente en el laboratorio sobre la actividad del NKCC2 (185) y los resultados son interesantes, cuando se comparan con los obtenidos con los KCCs. Para NKCC2 la eliminación de este sitio de unión a SPAK (F1337A) en WNK3, previene su activación por esta cinasa. Lo que sugiere que los sitios de unión a SPAK involucrados en la activación o inhibición de NKCC2 y de los KCCs respectivamente, son diferentes. Un hecho que apoya esta hipótesis, es el análisis de Western blot y de inmunoprecipitación, en donde en el primero, se observa que la expresión tanto de la clona WNK3, como de la F1337A, está en el mismo nivel, mientras que en el segundo, al bajar las proteínas con un anticuerpo anti-c-Myc, epítotope con la cual están marcadas las clonas de WNK3 y revelarlas contra un anticuerpo HA, epítotope con el que está marcado SPAK, se observa que la cantidad de SPAK unida al complejo, disminuye significativamente en presencia de la clona F1337A, comparada con la clona de WNK3 silvestre. Es decir la mutación interrumpe la interacción con SPAK, sin embargo, en la membrana todavía se alcanza a apreciar cierta expresión de SPAK, probablemente la que está interactuando con los otros motivos de unión. Por otra parte, el efecto de WNK3 F1337A sobre los KCCs, demuestra que esta clona posee actividad catalítica, ya que esta es necesaria para inhibirlos en condiciones hipotónicas. Asimismo en presencia de NKCC2, WNK3 F1337A, no lo inhibe como lo haría WNK3 DA, sino que simplemente deja de activarlo. Lo mismo sucede con la clona WNK3 F242A, que es la que deja de inhibir a los KCCs en condiciones hipotónicas, la cual al expresarla en condiciones isotónicas, no se comporta como WNK3 DA, es decir, mantiene su actividad catalítica.

Es importante mencionar, que todas las clonas de WNK3, se encuentran marcadas con la epítotope c-Myc y que al igual que con el NKCC2, la interacción

entre los KCCs, WNK3 y SPAK se va a evaluar mediante ensayos de Western blot y de inmunoprecipitación. Estos ensayos, ya se comenzaron a realizar, sin embargo, por cuestiones de tiempo, los resultados de estos análisis, no se pudieron incluir en la presente tesis. Se espera que estos resultados junto con los ensayos de expresión funcional den lugar a una publicación.

La regulación sobre la función de los KCCs, tanto de WNK3 como de WNK4 en presencia o ausencia de SPAK tiene implicaciones fisiológicas importantes. En el riñón, WNK4 se expresa principalmente en la nefrona distal, en donde inhibe la actividad del NCC y del canal de K^+ , ROMK (156) (162) (72). El papel de esta regulación, es muy importante en el balance de la reabsorción renal de sal y la secreción de potasio. De tal manera que los KCCs constituyen otra vía de transporte de Cl^- , regulada por WNK4.

En el riñón, se expresan tres isoformas del cotransportador de K-Cl, KCC1, KCC3 y KCC4. Aún no se ha llevado a cabo la inmunolocalización de KCC1, sin embargo, se han encontrado transcritos de su RNA mensajero a lo largo de la nefrona (29) (91). KCC3 y KCC4, se expresan en la membrana basolateral del túbulo proximal (16) (104) (148), en donde se ha propuesto, participan en la regulación del volumen celular, ya que las células de esta parte de la nefrona, llevan a cabo el transporte de grandes cantidades de solutos y agua (68) {O'Reilly, M. J Am Soc Nephrol, 2006}. Sin embargo en los ratones knockout para KCC3 o KCC4, no se encontró modificada la función de las células del túbulo proximal. Lo que sugiere que la presencia de al menos un KCC, podría compensar la ausencia de otro. Probablemente mediante un ratón doble knockout de estas isoformas permitiría ahondar en su papel en el túbulo proximal. En el asa ascendente de Henle así como en el túbulo distal, mediante estudios de inmunolocalización se ha detectado la presencia de KCC4 en la membrana basolateral (8) (52). Sin embargo, diversos estudios fisiológicos, han reportado la presencia de un cotransportador de K-Cl en la membrana apical del túbulo distal (9) (36) (147). Debido a que ni KCC3 o KCC4 se han detectado apicalmente en esta región, es probable, que se trate de KCC1. Finalmente, la expresión de KCC4 en la membrana basolateral de las células α -intercaladas del túbulo colector se encuentra relacionada con un papel en la secreción de hidrogeniones, Lo cual ha quedado demostrado, por la presencia de acidosis tubular renal en el ratón knockout de esta isoforma (16).

Debido a que WNK4 se expresa principalmente en el túbulo distal y en el túbulo cortical, es de esperarse que en estas zonas del riñón, regule a los KCCs añadiendo otra vía por la cual WNK4 regula la secreción de potasio. En el túbulo distal WNK4 inhibe al canal de potasio ROMK sin requerir su actividad catalítica (71). Por el contrario para inhibir a los KCCs, WNK4 si depende de la actividad de cinasa, lo que incrementa las posibilidades de regulación de WNK4, ya que está inhibiendo dos vías diferentes de secreción de K^+ , por diferentes mecanismos. El hecho de que se requiera la actividad catalítica para inhibir a los KCCs, sugiere que esta cinasa, induce la fosforilación de estos, ya que como es sabido, los KCCs permanecen inactivos cuando estas proteínas están fosforiladas (3). En el túbulo colector, WNK4 podría regular a KCC4 en las células α -intercaladas. Si este fuera el caso, la inhibición del cotransportador, disminuiría la secreción de iones H^+ en este tipo celular, regulando la acidificación de la orina. Sin embargo, a pesar de que la expresión de WNK4 en el túbulo colector ha quedado demostrada (79) {O'Reilly, M. J Am Soc Nephrol, 2006} (155), su localización particularmente en las células α -intercaladas no se ha identificado.

De acuerdo a nuestros resultados WNK3 se expresa a todo lo largo de la nefrona, con mayor nivel de expresión en el túbulo proximal y asa ascendente de Henle y en menor nivel en el TD y el TC (126). Por lo que se espera que en la parte distal de la nefrona, co-localize con WNK4 y regule también la función de los KCCs. Investigar la función de WNK3 en el riñón y el papel de su interacción con KCC3 en el túbulo proximal, con NKCC2 en el asa ascendente de Henle, con el NCC en el túbulo distal y con el KCC4 en el túbulo cortical, sin duda brindará información sobre la regulación del manejo de electrolitos en estos segmentos de la nefrona.

Exactamente como interacciona WNK3 con SPAK y otras WNKs aún no queda bien establecido. Debido a que las 4 WNKs contienen sitios potenciales de unión a SPAK (27) y dado que WNK1 y WNK4 pueden fosforilar a SPAK, las vías de regulación podrían ser comunes entre estas cinasas. Sin embargo, las características únicas de WNK3, es decir, la regulación recíproca de ambas ramas de la familia de los CEN y su capacidad de sobrepasar los requerimientos de tonicidad extracelulares necesarios para su activación cuando se expresan en el ovocito, puestas en contra a la necesidad de WNK4

de la presencia de SPAK para regular a estos cotransportadores en el mismo sistema de expresión, sugiere que su función no es redundante a la de WNK4/SPAK. Las WNKs y SPAK probablemente, son componentes de una compleja vía de señalización que regula la entrada y salida de Cl^- en la célula, alterando el estado de fosforilación de los cotransportadores de Na-K-Cl y de K-Cl. Aún queda por aclarar como es que las WNKs y SPAK permiten a las células sentir los cambios en volumen y traducir estos cambios en respuestas regulatorias es algo que aún requiere investigación. La estructura de ambas familias de cinasas, con el dominio cinasa en el extremo amino terminal y los dominios regulatorios en el extremo carboxilo terminal, con sitios de unión para proteínas fosfatasas, dominios coil coiled y regiones de unión al citoesqueleto, sugiere que estas cinasas no son simplemente puntos de relevo a lo largo de una cascada de fosforilación. Podría ser que su función sea también como proteínas de andamiaje, que unen a las proteínas reguladoras con los cotransportadores (72). El efecto de la hipertonicidad o el encogimiento celular podría causar cambios conformacionales en las proteínas del citoesqueleto que podrían a su vez activar a WNK3 y/o facilitar la interacción de WNK4 con SPAK

Contrario a lo propuesto inicialmente (95) cada vez es más aceptada la idea, de que el modelo de regulación de los CEN, por el que se coordina la entrada y salida de Cl^- de la célula, no es llevado a cabo por una única cinasa, sino que este ocurre a través de una compleja vía de señalización, que involucra a las WNKs, a SPAK y a las proteínas fosfatasas. Las investigaciones para dilucidar esta cascada apenas comienzan, siendo los estudios en ovocitos de *X laevis* y en células de mamífero en cultivo, los modelos a partir de los cuales se ha obtenido mayor evidencia. Aún falta sin embargo desarrollar modelos *in vivo* como ratones knockout o transgénicos para conocer a fondo las implicaciones fisiológicas de esta regulación, Mientras tanto, nuestros resultados nos permiten suponer sobre los mecanismos que controlan el transporte transepitelial de Cl^- , la regulación de la excitabilidad neuronal y la homeostasis del volumen celular

CONCLUSIONES

- WNK3 aumenta la actividad de NCC, NKCC1 y NKCC2 y previene la activación de los KCCs inducida por el aumento del volumen celular. En cambio, la ausencia de actividad cinasa en WNK3 (WNK3 D294A) produce los efectos contrarios: WNK3-DA activa significativamente a los KCCs en ovocitos incubados en isotonicidad y previene la función de los NKCCs. Es decir que WNK3 y WNK3-DA tienen la capacidad de sobrepasar la regulación característica de los cotransportadores electroneutros por la osmolaridad extracelular.
- La presencia de los inhibidores de las proteínas fosfatasas Caliculina A y Ciclosporina A, previenen la activación de los transportadores de K^+Cl^- por WNK3-DA. De manera tal que WNK3-DA parece inducir la defosforilación de los KCCs, por un mecanismo que involucra la activación de las proteínas fosfatasas PP1 y PP2B. Mientras que la activación de NKCC1 y NKCC2 por WNK3 es resultado de un aumento en la fosforilación de ambos cotransportadores, la cual se reduce en forma significativa en presencia de WNK3-DA.
- A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, proponemos que WNK3 podría ser la cinasa sensible a la concentración de Cl^- intracelular y/o volumen, que regula la actividad de los cotransportadores electroneutros.
- El análisis realizado a lo largo de este proyecto doctoral, muestran claramente que WNK3 modula la función de los miembros de la familia SLC12 mediante procesos de fosforilación y defosforilación y que el papel de SPAK en esta regulación es de gran importancia.
- Nuestros datos sugieren que las WNKs y SPAK, forman parte de los componentes de cinasas y fosfatasas que regulan la entrada y salida de Cl^- a través de los CEN durante la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y la regulación de la presión arterial.

OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. Regulación de los cotransportadores electroneutros por las cinasas WNK.

de los Heros P, Garzón-Muvdi T y Gerardo Gamba. (2006). **Mensaje Bioquímico**, Vol **XXX**: 129-146. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

2. WNK kinases, renal ion transport and hipertensión.

San-Cristobal P, de los Heros P, Ponce-Coria J, Moreno E y Gamba G. (2008). **Am J Nephrol** 28:860-870.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velásquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

REGULACIÓN DE LOS COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS POR LAS CINASAS WNK

Paola de los Heros Rios, Tomás Garzón Muvdi y Gerardo Gamba
Unidad de Fisiología Molecular, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador
Zubirán, e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 1400, México, D. F.
gamba@biomedicas.unam.mx

Abstract

The electroneutral cation/Cl⁻ cotransporter family (SLC12A) encompasses two branches: the K-Cl cotransporter branch, composed of four members (KCC1, KCC2, KCC3, and KCC4), and the Na-(K)-Cl cotransporter branch, composed of three members (NCC, NKCC1, and NKCC2). K-Cl cotransporters mediate Cl⁻ efflux, are inhibited by phosphorylation, and are activated by dephosphorylation. Na-(K)-Cl cotransporters mediate Cl⁻ influx and are activated by phosphorylation. These cotransporters are mutated in human disease, are targets of diuretics and are collectively involved in the regulation of cell volume, neuronal excitability, and blood pressure. A single kinase/phosphatase pathway is thought to coordinate the activities of these cotransporters; however, the mechanisms involved are as yet unknown. The WNK kinases (WNK, with no lysine = K), a family of four novel serine-threonine kinases, are emerging as key regulatory proteins for the SLC12A family. Mutations in WNK1 and WNK4 cause PHAI1, a Mendelian disease that features hypertension and hyperkalemia. WNK4 has been shown to be a regulator of NCC and NKCC1; some of these effects are kinase-dependent, whereas others are independent of WNK4's catalytic activity. Furthermore, WNK1 modulates the effect of WNK4 on NCC. WNK1 has also been found to activate the protein kinases SPAK or OSR1, which regulate activation of various epithelial ion channels including de SLC12A family. WNK3 is coexpressed in different tissues with several cation/Cl⁻ cotransporters and regulates their activity. These data suggests WNKs are crucial components of the kinase/phosphatase signaling pathway that coordinately regulates the Cl⁻ influx and efflux branches of the SLC12A cotransporter family and so their activities.

Keywords: Electroneutral cation/Cl⁻ cotransporter, WNK kinases, phosphorylation, electrolyte homeostasis, blood pressure, cell volume, neuron excitability.

Abreviaturas

Concentración intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$), Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (NCC), Cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida (NKCC1 y NKCC2), Túbulo distal (TD), Cotransportadores electroneutros (CEN), Ácido gama-aminobutírico (GABA), Cinasas WNK (WNKs), Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHA2), Ste-20 cinasa rica en alanina y prolina (SPAK).

Introducción

Una de las grandes interrogantes en los sistemas biológicos es cómo son regulados la función de diversos elementos que componen un sistema, que puede estar integrado por miembros localizados en diversas células y tejidos, para montar una respuesta coordinada y coherente ante diversas perturbaciones fisiológicas. Un ejemplo es el mantenimiento de la homeostasis iónica intra y extracelular, involucrada en funciones que van desde la regulación del volumen celular, en cada célula, funciones de tipo célula o tejido específico (como es la excitabilidad neuronal), y funciones que implican la respuesta coordinada de una variedad de células y órganos como es el caso de la regulación de la presión arterial. Para realizar estos diversos procesos en los que el transporte a través de la membrana plasmática de iones como el sodio (Na^+), el potasio (K^+) y el cloro (Cl^-) es fundamental, las células están equipadas con una serie de proteínas transportadoras de iones u osmolitos, poros, canales y bombas [1], así como proteínas de uniones intercelulares, cuyos mecanismos efectores del transporte han sido en general dilucidados, identificados y estudiados a nivel fisiológico, molecular y genómico. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas proteínas de membrana son reguladas en forma coordinada permanecen sin ser identificados por completo.

A pesar de que las funciones celulares y epiteliales son diversas, los mecanismos a través de los cuales el equilibrio de los electrolitos se alcanza son extremadamente parecidos. El mecanismo predominante por el cual el volumen intracelular se mantiene en la mayor parte de las células, es el aumento o la disminución de la concentración intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) en respuesta a un medio hipertónico o hipotónico respectivamente, minimizando así, el movimiento transmembranal de agua. En nuestro laboratorio el interés está centrado en una familia de proteínas de transporte involucrada en las funciones mencionadas anteriormente, conocida como la familia de cotransportadores electroneutros (CEN) de cationes acoplados a cloro. Esta familia recibe la denominación de SLC12 según la *Human Genome Organization* (HUGO) [2]. Esta compuesta por siete genes claramente identificados que codifican para transportadores de membrana, de los cuales tres utilizan sodio (con o sin potasio), como el catión acoplado al transporte de cloro, mientras que los otros cuatro utilizan potasio como el único catión acoplado al cloro.

En la figura 1 se muestran las dos ramas principales del árbol filogenético de la familia SLC12, así como el grado de identidad entre éstas. De los transportadores acoplados a sodio, un gen codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ sensible a los diuréticos tipo tiazidas (NCC) [3] mientras que dos genes codifican para cotransportadores de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ sensibles al diurético de asa bumetanida (NKCC1 y NKCC2). El NCC se localiza en el humano en el cromosoma 16 y se expresa únicamente en la membrana apical del túbulo contorneado distal en el riñón (TD). El NKCC1 se localiza en el cromosoma 15 y se expresa en la membrana basolateral de múltiples tipos celulares y tisulares, así como en múltiples células no epiteliales [4]. El NKCC2 se localiza en el cromosoma 5 y se expresa exclusivamente en la membrana apical del asa ascendente de Henle en el riñón [5]. Los miembros de la familia que utilizan potasio son todos cotransportadores de $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$, conocidos como KCC1 a KCC4. En el humano, tres genes se localizan en los cromosomas 16, 15 y 5 y corresponden a las isoformas KCC1, KCC3 y KCC4 respectivamente. Su expresión es ubicua [6, 7]. El cuarto gen se ubica en el cromosoma 20 y codifica para la isoforma KCC2 que se localiza exclusivamente en las neuronas [8].

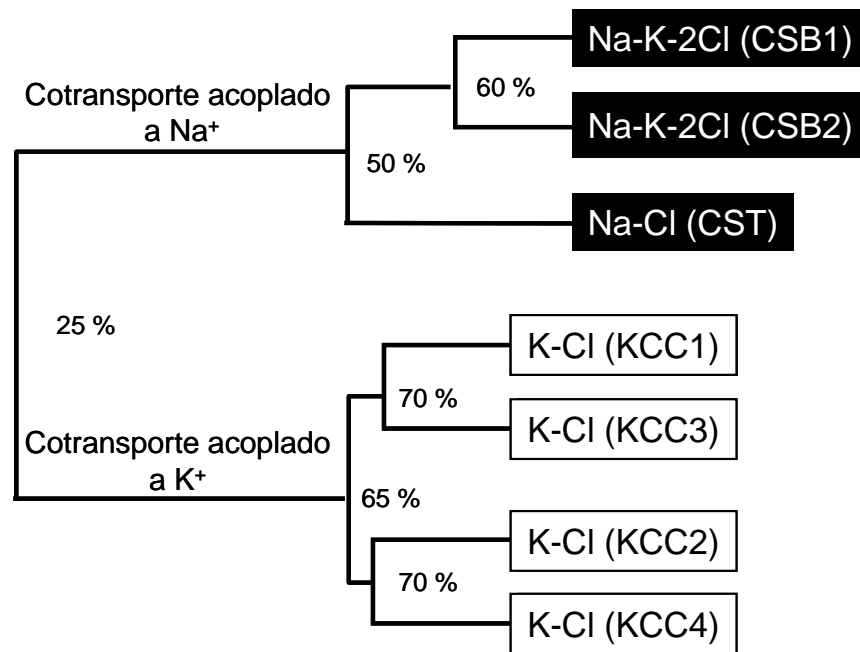


Figura 1. Árbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros de cationes cloro. Existen dos subfamilias. Una compuesta por tres genes que codifican para cotransportadores que utilizan sodio como catión para acoplarse al transporte de cloro (NCC, NKCC1 y NKCC2). La otra está compuesta por cuatro genes que codifican para cotransportadores que solo utilizan potasio como catión acoplado al cloro (KCC1 a KCC4). Los números en porcentaje indican el grado de identidad entre los diferentes miembros de la familia.

Los CEN, son transportadores secundarios que no hidrolizan ATP para su función, sino que dependen del gradiente generado por la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ para mover iones. Por lo tanto, NCC, NKCC2 y NKCC1 (los que utilizan sodio) translocan iones desde fuera hacia adentro de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el sodio. Los KCCs (que utilizan potasio), translocan los iones desde adentro hacia afuera de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el potasio. El sodio que entra a la célula a través del NCC, NKCC2 o NKCC1 es expulsado por la bomba de sodio-potasio, mientras que el potasio que sale a través de los KCCs es regresado a la célula por la misma bomba. Por lo tanto, el resultado neto de la función de los CEN es la concentración o dilución del cloro intracelular.

Una de las funciones celulares en las que el movimiento de cloro juega un papel fundamental es en la regulación del volumen celular [1]. Las células mantienen un volumen celular constante a base de mantener el equilibrio osmolar con el medio exterior. En condiciones de homeostasis, la osmolaridad intracelular y la extracelular es la misma (alrededor de 290 mOsm/kg H_2O). Cuando suceden cambios en la osmolaridad de alguno de los compartimentos, se produce un movimiento de agua a favor de su gradiente, con lo que el volumen celular aumenta o disminuye. La disminución de la osmolaridad extracelular se acompaña de un aumento en el volumen celular, mientras que el aumento en la osmolaridad extracelular se acompaña de encogimiento celular. Debido a la intensa actividad de la ATPasa de Na^+ y K^+ , en la mayoría de las células los cambios en la osmolaridad y por ende, en el volumen celular, se asocian con cambios en la concentración de cloro intracelular y es aquí en donde los CEN juegan un papel fundamental. Se ha demostrado claramente que el NCC y los NKCCs se activan

durante el encogimiento celular, con el fin de aumentar la osmolaridad intracelular para recuperar el volumen original [1,2] Por otra parte los KCCs son transportadores que se activan durante el hinchamiento celular, con el objeto de disminuir la osmolaridad intracelular y así, recuperar el volumen original [1,2].

Por su habilidad para cambiar la concentración intracelular de cloro, una de las funciones importantes de tipo célula-tejido específico en la que están involucrados los CEN, es en determinar el tipo de respuesta a ciertos neurotransmisores que se unen a receptores acoplados a canales de cloro [9, 10]. Por ejemplo en el período prenatal, el ácido gama-aminobutírico (GABA) se comporta como un neurotransmisor excitador ya que numerosas neuronas en esta época de la vida poseen la concentración intraneuronal de cloro elevada. Esto es debido a la intensa actividad del cotransportador de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, el NKCC1 y a la casi nula función del cotransportador de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ KCC2, en las neuronas GABAérgicas. Este neurotransmisor actúa al unirse a un receptor acoplado a un canal de cloro. Al abrirse el canal de cloro y debido a que el potencial de este anión es mayor dentro de la neurona, el cloro sale a favor de su gradiente, despolarizando a la neurona y generando un potencial de acción. En cambio, después del nacimiento, el GABA se vuelve inhibidor en numerosas neuronas debido a que la actividad de los cotransportadores se invierte. Es decir, disminuye la actividad del NKCC1, mientras que aumenta la de KCC2, el cual se encarga de sacar cloro de la célula, con lo que convierte el potencial de este ión en negativo. Por lo tanto, al unirse GABA y abrir el canal de cloro, ahora este anión viaja de donde hay más (el intersticio) hacia donde hay menos (la neurona) resultando en hiperpolarización neuronal y por lo tanto, en inhibición del potencial de acción. Este fenómeno ocurre también en diversos grupos neuronales a lo largo de ciclos circadianos. Así, la actividad de los CEN está involucrada también en la excitabilidad neuronal ya que determina el tipo de respuesta a ciertos neurotransmisores.

Finalmente, los CEN están claramente involucrados en el mantenimiento y determinación de la presión arterial, debido a su presencia y capacidad de transportar sal en los epitelios. El NCC es la principal vía de reabsorción de sal en el túbulo contorneado distal, en donde constituye además el receptor de los diuréticos tipo tiazida, recomendados como la primera línea de terapia antihipertensiva [11]. El NKCC2 es la principal vía de reabsorción de sal en el asa ascendente de Henle y es además el receptor de los diuréticos de asa, como el furosemide y la bumetanida. Mutaciones inactivantes de estas proteínas producen los síndromes de Gitelman y de Bartter, respectivamente, que cursan con hipotensión arterial. Por otro lado, los ratones null, genéticamente modificados para no expresar al NCC, NKCC2 o NKCC1 son hipotensos, mientras que los ratones null para el KCC3 son hipertensos [12]. Indicando que estos miembros de la familia SLC12 intervienen en la regulación de la presión arterial (Tabla 1).

En diversos grupos de estudio, incluyendo el nuestro, se han analizado las propiedades funcionales de los diversos miembros de la familia SLC12 cuando son expresados en forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* [13-15]. Este modelo constituye un sistema excelente para la expresión y análisis de la función y regulación de canales iónicos y transportadores. En estos estudios, los KCCs permanecen inactivos en condiciones de isotonicidad, mientras que el NCC y los NKCCs se activan. Cuando los ovocitos inyectados con los diversos transportadores son expuestos a hipotonicidad, sucede lo contrario: los KCCs se activan, mientras que el NCC y los NKCCs se inhiben [16, 17]. Numerosos estudios han sugerido que la actividad de los miembros de la familia SLC12A, se encuentra regulada por procesos de fosforilación y desfosforilación. La desfosforilación activa a los cotransportadores de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ e inhibe a los cotransportadores de $\text{Na}^+\text{(K)}\text{-Cl}^-$, mientras que la fosforilación inactiva a los KCCs y activa al NCC y los NKCCs. Debido a lo anterior, se ha propuesto que los CEN comparten una vía de señalización común, ya que los estímulos que activan a una rama de la familia, inhiben a la otra y viceversa. Por ejemplo, el aumento del volumen celular, las concentraciones intracelulares altas de Cl^- y la presencia de proteínas fosfatasa, estimulan el transporte a través de los KCCs, pero inhiben a los transportadores de $\text{Na}^+\text{(K)}\text{-Cl}^-$. Por el contrario, la disminución del volumen celular, las concentraciones bajas de Cl^- intracelular y la presencia de inhibidores de las

proteínas fosfatasa que promueven la fosforilación, producen el efecto contrario. En esta vía de señalización, se ha propuesto que el aumento del volumen celular y/o los cambios en la concentración de cloro intracelular, regulan la función de una cinasa intracelular que a su vez regula la función de los CEN [18,19]. La identidad de dicha cinasa, queda aún por determinarse. Sin embargo, evidencias recientes de nuestro y otros laboratorios sugieren que una nueva familia de serina/treonina cinasas, denominadas WNK, podrían ser las cinasas que regulan y coordinan la función de los CEN.

Tabla I. Familia SLC12

Proteína/Nombre del Gen en el Humano	Tamaño (aa)	Iones que mueven	Distribución Tisular y expresión celular	Cromosoma en el humano	Patología	Características del ratón Knockout
NKCC2/ SLC12A1	1099	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻	Específica de riñón Membrana apical del asa ascendente de Henle	15q21.1	Síndrome de Bartter tipo I	Hipocalcemia, alcalosis metabólica, hipercalcemia, pérdida de NaCl, depleción de volumen
NKCC1/ SLC12A2	1212	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻	Ubicua Células no epiteliales y membrana basolateral de las células epiteliales	5q23.3	Ninguna	Alteraciones del movimiento y percepción del dolor; sordera; reducción en la producción de saliva. Sin espermatogénesis.
NCC/ SLC12A3	1021	Na ⁺ /Cl ⁻	Específica de riñón Membrana apical del túbulo contorneado distal	16q13	Síndrome de Gitelman	Hipocalcemia e hipomagnesemia
KCC1/ SLC12A4	1085	K ⁺ /Cl ⁻	Ubicua	16q22	¿Hemoglobinopatías?	
KCC2/ SLC12A5	1116	K ⁺ /Cl ⁻	Específica de SNC	20q13	¿Epilepsia?	Déficit locomotor severo y muerte
KCC3/ SLC12A6	1150	K ⁺ /Cl ⁻	Amplia	15q14	Síndrome de Andermann (ACCPN)	Déficit sensorimotor, neuropatías periféricas
KCC4/ SLC12A7	1083	K ⁺ /Cl ⁻	Amplia, con poca expresión en cerebro	5p15	?	Sordera y acidosis tubular renal

Las Cinastas WNK

Las cinastas WNK constituyen un pequeño grupo de serina/treonina cinastas dentro de la superfamilia de las cinastas, identificadas en el año 2000 [20]. Fueron llamadas WNK debido a que en el sitio catalítico del dominio cinasa, presentan la sustitución de un residuo de lisina por una cisteína. Esta lisina coordina la unión del ATP [21]. Es decir no tienen una lisina en el sitio catalítico, conservada en el resto de las serina/treonina cinastas, por lo que se les llamó cinastas "sin lisina" en inglés "With No lysine=K" = WNK. La mayoría de las serina/treonina cinastas conocidas poseen este residuo catalítico en el subdominio II, mientras que en las WNKs este aminoácido se localiza en el subdominio I. Las cinastas WNK están presentes exclusivamente en eucariontes multicelulares. *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* poseen un gen ortólogo: *Arabidopsis thaliana* expresa al menos ocho genes ortólogos y en el humano se han identificado cuatro miembros de esta familia: WNK1, WNK2, WNK3 y WNK4 [22] con un porcentaje de identidad entre ellos de ~40%.

Estructura genómica y distribución de las WNKs

WNK1

Actualmente WNK1 es la isoforma de la que se tiene más información en cuanto a estructura genómica y distribución tisular se refiere. Fue la primera en ser identificada durante una búsqueda de nuevos miembros de las MAP cinasas [20]. El gen que la codifica consta de aproximadamente 150 kilobases (Kb) y contiene 28 exones, sin embargo, su transcripción es compleja, ya que existen transcritos de diversas longitudes como se ha demostrado mediante análisis de Northern blot en diferentes tejidos [21, 23]. Un segundo promotor dentro del exon 1, produce un transcrito ligeramente más corto. La isoforma más larga se expresa principalmente en el corazón y músculo esquelético, así como en la mayoría de los epitelios de secreción excepto en el riñón. En éste órgano la expresión de WNK1 es particular, ya que el transcrito predominante es una isoforma corta producto de un sitio alternativo de iniciación de la transcripción dentro del exón 4, que da lugar a una proteína que carece del dominio cinasa [24]. En el riñón esta isoforma corta parece tener una función de regulación sobre la isoforma larga, que a su vez afecta la actividad del NCC [25] y del canal de potasio ROMK [26]. Los análisis de inmunolocalización para WNK1 han demostrado una distribución tejido-específica. Por ejemplo, en el riñón y en los epitelios del colon y la vejiga, su localización es citoplásmica, mientras que en los conductos biliares del hígado y en los ductos pancreáticos, se localiza principalmente en la membrana. En el humano WNK1 se localiza en el cromosoma 12 y constituye una proteína de 251 kDA compuesta de 2,382 amino ácidos. El grado de identidad de las isoformas de WNK1 entre el humano, la rata y el ratón es de ~86% [27].

WNK2

WNK2 está compuesta por 2,216 amino ácidos y se localiza en el humano en el cromosoma 9q22.31 [21]. La distribución tisular de ésta isoforma se desconoce.

WNK3

En el humano, WNK3 se localiza en el cromosoma Xp11.22 y está compuesta por 1,800 residuos de amino ácidos. Su estructura genómica se publicó recientemente y consiste de 24 exones en 165 Kb. Su transcripción produce dos variantes por empalme alternativo basadas en los exones 18 y 22. Mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), se demostró que esta isoforma se expresa en todos los tejidos del humano, con transcripción más abundante en cerebro y riñón [28]. Recientemente mediante un análisis de inmunofluorescencia, se demostró que en el riñón la WNK3 se expresa a todo lo largo de la nefrona, localizándose principalmente en las uniones intercelulares; a diferencia de la WNK1 y la WNK4, cuya expresión se limita a la nefrona distal [29]. En el cerebro de ratón los transcritos de la WNK3 son muy abundantes y su expresión se encuentra estrictamente regulada durante el desarrollo embrionario. Los estudios de hibridación *in situ* revelaron gran expresión de esta isoforma en el hipotálamo y el giro dentado, así como en las capas corticales y en los núcleos talámicos e hipotalámicos. Así mismo, en el cerebro la WNK3 se localiza en los cuerpos celulares de neuronas GABAérgicas, pero no así en la glía [30]. Se sabe que este tipo de neuronas expresan a los cotransportadores NKCC1 y KCC2 [10]. En los ductos pancreáticos, conductos biliares y el epidídimo, el análisis de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti-WNK3, demostró sitios de co-expresión de esta isoforma con WNK1 y WNK4. En estos tejidos WNK3 se localiza en las uniones intercelulares. Esta isoforma se localizó también en tejidos donde no se expresan WNK1 ni WNK4, por ejemplo en el epitelio del intestino delgado y en las células secretoras de Cl⁻ en el estómago [30].

WNK4

La WNK4 se encuentra codificada por 19 exones a lo largo de 16 Kb. y la proteína consta de 1,243 residuos de amino ácidos [23]. Hasta la fecha no se han descrito variantes por empalme alternativo y a pesar de que los estudios iniciales sugerían que se expresaba únicamente en el riñón [23], con expresión citoplasmática y en las uniones intercelulares en el túbulo distal y túbulo colector; se ha demostrado que su expresión es abundante en diferentes epitelios de secreción además del riñón, por ejemplo en el cerebro, colon, páncreas, ductos biliares y el epidídimo, en donde se localiza generalmente en las uniones intercelulares [31]. Es importante hacer notar, que todos los tejidos que expresan WNK1 y WNK4 están fuertemente involucrados en el transporte de Cl⁻.

El porcentaje de identidad entre las WNKs es de aproximadamente 40%; sin embargo, las cuatro cinasas presentan una topología similar (Fig. 2) que consiste de un dominio cinasa altamente conservado subdividido en 12 dominios, característico de las serina/treonina cinasas y localizado en el extremo amino terminal, un dominio auto inhibitorio conservado y un dominio regulador carboxilo terminal [27, 32]. Generalmente, las cinasas se regulan por auto-inhibición lo cual abate la actividad de cinasa, hasta que una señal de activación apropiada libera al dominio auto-inhibitorio. Las evidencias señalan que existe un control similar en las WNKs y que éste involucra su auto-fosforilación [20, 33]. Se ha demostrado que la isoforma WNK1 auto-fosforila residuos de serina tanto *in vitro* como *in vivo*. Aparentemente los residuos clave en la auto-inhibición de la WNK1 son las serinas en las posiciones 378 y 382 ya que la auto-fosforilación de estos aminoácidos, afecta directamente la actividad de cinasa [33]. Así mismo, la auto-inhibición en la WNK1, es a su vez dependiente de dos residuos de fenilalanina altamente conservados en las posiciones 522 y 524. Estos residuos se localizan fuera del dominio de cinasa, pero dentro de un grupo de amino ácidos conservados. La mutación de estas fenilalaninas por alaninas, disminuye aproximadamente en 90% la actividad auto-inhibitoria de la WNK1 [33]. Recientemente Min y cols., [34], resolvieron la estructura cristalográfica de la conformación de baja actividad del dominio de cinasa de la WNK1 a 1.8 Å de resolución.

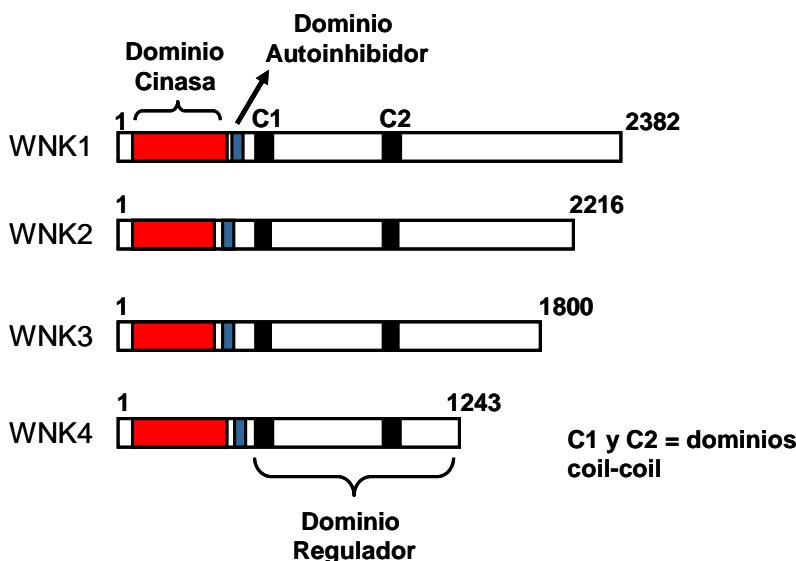


Figura 2. Topología de las cinasas WNK. Existen cuatro isoformas identificadas. En general, las WNKs poseen un dominio cinasa, mostrado en rojo y un dominio auto-inhibidor que se muestra en azul. El resto de la proteína se conoce como el dominio regulador, dentro del cual se encuentran dos dominios tipo giro-giro.

Genómica del pseudohipoaldosteronismo y el papel de las WNK en la génesis de la hipertensión arterial

El interés por el estudio de las WNKs se ha incrementado debido al hecho de que en el humano, se encuentran involucradas en la regulación de la sal por el riñón y por lo tanto en el control de la presión arterial. Mutaciones en las cinasas WNK1 y WNK4 se encontraron asociadas con una forma hereditaria de hipertensión dependiente de sal llamada pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) o síndrome de Gordon [23]. El PHAII es una enfermedad que se hereda en forma autosómica dominante y se caracteriza por la presencia de hipertensión, hipercalemia (niveles séricos de K^+ altos), acidosis metabólica e hipercloremia [35]. Este descubrimiento ha provocado una amplia búsqueda de los mecanismos fisiológicos por los cuales las WNKs regulan la presión arterial, así como la relación entre diferentes mutaciones en las WNKs y otros tipos de hipertensión [36].

Se ha observado que existen al menos cuatro genes involucrados en la producción de PHAII. Existen familias con PHAII que cosegregan con regiones en el cromosoma 1 [37], en el cromosoma 12 [38] y en el cromosoma 17 [37]. Además, hay una familia cuyo análisis de enlace fue negativo a estas tres regiones, lo que indica que debe haber un cuarto gen cuyas mutaciones pueden causar la enfermedad, pero que aún no ha sido mapeado [39]. Wilson y cols., [23] demostraron que los genes causantes de PHAII en los cromosomas 12 y 17 son la WNK1 y la WNK4, respectivamente. En el caso de la WNK1 se trata de deleciones en el intrón 1 que acortan el tamaño del intrón de 42 a 22 kb. La secuencia de la WNK1 no se ve afectada, pero si el nivel de expresión. Como consecuencia de esta deleción los niveles de expresión de la WNK1 aumentan, seguramente al perder algún elemento de regulación negativa localizado en éste intrón. Por lo tanto, el resultado es la sobreexpresión de la WNK1; es decir, ganancia en la función del gen. Este patrón bioquímico correlaciona bien con el hecho de que la enfermedad se hereda en patrón dominante, ya que con que un solo alelo esté afectado, es suficiente para que se exprese la enfermedad debido a la hiperfunción que resulta de la sobreexpresión del gen. La sobreexpresión de la WNK1 en una familia francesa con PHAII ha sido corroborada por Achard y cols., [40].

En el caso de pacientes con PHAII por mutaciones en el gen que codifica para la WNK4, las mutaciones son del tipo puntual. En todos los casos son mutaciones en una región de 10 amino ácidos, en la que todos ellos tienen carga. El cambio de un residuo con carga negativa por uno con carga positiva es causante de la enfermedad [23]. Todavía no queda claro el mecanismo molecular, ya que el PHAII por mutaciones en WNK4 también se hereda en forma autosómica dominante. Como veremos adelante, en algunos casos (en los que se afecta el canal de potasio y las proteínas claudinas) se ha observado que estas mutaciones producen ganancia en la función de WNK4, lo que correlaciona con el tipo de herencia, sin embargo, en otros casos como las mutaciones que afectan al NCC resultan en pérdida de la función. Para explicar una enfermedad dominante con pérdida de la función, el mecanismo tendría que ser el de la haploinsuficiencia o bien, que el producto del alelo mutado interaccione en forma negativa con el producto del alelo normal.

No se ha identificado todavía el gen en el cromosoma 1 causante de PHAII en las familias reportadas por Mansfield y cols., [37].

Regulación de los cotransportadores electroneutros por las cinasas WNK1 y WNK4: Mecanismo del pseudohipoaldosteronismo tipo II

En el riñón, las WNK4 y WNK1 fueron identificadas mediante anticuerpos específicos en el túbulo distal y el túbulo colector. Estos segmentos adyacentes de la nefrona son importantes para la homeostasis del pH, del NaCl y del K^+ . Los descubrimientos de que las mutaciones en los genes *prkwnk1* y *prkwnk4* ocasionan PHAII, junto con el hecho de su localización en la nefrona

distal, parecen indicar que estas cinasas forman parte de una nueva vía de señalización, importante para el control de la presión sanguínea y la homeostasis de los electrolitos. La regulación de estas cinasas, de los efectores y reguladores de la vía, así como los mecanismos causantes de la enfermedad, aún no se conocen totalmente, sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo múltiples estudios en los que se ha analizado el papel fisiológico y fisiopatológico de la WNK4.

Los estudios iniciales para definir las bases genéticas del PHAI se enfocaron en el cotransportador de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ sensible a los diuréticos tipo tiazidas (NCC), debido a dos razones principales. La primera es que el fenotipo del PHAI se corrige por completo con el tratamiento con diuréticos tipo tiazidas, los cuales inhiben específicamente la reabsorción de NaCl a través del NCC en el TD [35]. La segunda razón es que el fenotipo del PHAI es la imagen en espejo del síndrome de Gitelman, una enfermedad de herencia autosómica recesiva que se caracteriza por alcalosis metabólica, hipocalcemia e hipotensión arterial, originado por mutaciones de pérdida de función en el NCC [41]. Estas observaciones son consistentes con hiperfunción del NCC como la causa del PHAI, por lo que inicialmente se sugirió que la presencia de mutaciones de ganancia de función en el NCC, podrían ser las causantes del PHAI. Sin embargo, no se encontró evidencia de enlace positivo en familias con PHAI y la región del cromosoma 16 en donde se localiza el gen *slc12a3* que codifica para el NCC [42]. Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que las WNK regulen la función del NCC y que alteraciones en dicha regulación resulten en hiperfunción del NCC. Esta hipótesis se evaluó simultáneamente en nuestro laboratorio y en el de Ellison y col., [43, 44]. En ambos casos se demostró que WNK4 regula la actividad del NCC. Cuando el transportador se co-expresó en ovocitos de *X. laevis* con WNK4, la captación de Na^+ por el NCC disminuyó en más del 70% cuando se comparó con ovocitos inyectados únicamente con el NCC. Los experimentos realizados tanto con la proteína verde fluorescente unida al NCC, como la inmunodetección de la expresión del NCC en la superficie celular, demostraron que el efecto de WNK4 sobre el NCC está mediado en gran parte por la reducción en la llegada del cotransportador a la membrana plasmática del ovocito. Este efecto fue dependiente de la actividad cinasa, ya que al co-inyectar una mutante de WNK4 sin actividad cinasa, no se produjo ninguna reducción en la función del NCC [43]. Cuando se analizó el efecto de las mutaciones de WNK4 que originan PHAI, éstas eliminaron tanto la inhibición de la actividad del NCC por WNK4, como la reducción en la expresión del transportador en la membrana. A estas observaciones le siguieron aquellas realizadas en el canal de potasio ROMK y en las claudinas. Utilizando una estrategia similar en ovocitos de *X. laevis*, Kahle y cols., [45] observaron que WNK4 inhibe la función de ROMK y que las mutaciones de WNK4 producen mayor inhibición del canal. El mecanismo no depende de la actividad cinasa de WNK4 y al parecer resulta de la regulación de la expresión de ROMK en la membrana celular por un mecanismo relacionado con la internalización de vesículas vía clatrina. En el caso de las claudinas 1, 2 3 y 4, consideradas como transportadores paracelulares de cloro, se ha observado que la WNK4 incrementa su función y que las mutaciones de tipo PHAI tienen un efecto positivo, de tipo ganancia en la función [46]. Por lo tanto, la propuesta que se acepta en este momento es que la WNK4 inhibe la función del NCC y estimula la función de ROMK y las claudinas. Las mutaciones de tipo PHAI en la WNK4 resultan en pérdida de la función inhibitoria del NCC. La consecuencia de esto es el aumento en la tasa de reabsorción de sal con el consecuente desarrollo de hipertensión arterial. Por otro lado, las mutaciones de tipo PHAI en WNK4 también producen ganancia en la función sobre la inhibición de ROMK y la estimulación de las claudinas. Esto resulta en disminución de la secreción de potasio en el túbulo colector, con el consecuente desarrollo de la hipercalcemia [27].

A diferencia de WNK4, en la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento, la WNK1 no ha mostrado tener efecto directo sobre el NCC u otros sistemas de transporte de la nefrona distal. Al parecer, la WNK1 tiene efecto indirecto a través de su interacción y regulación de otras cinasas, incluyendo la WNK4. Por ejemplo, en ensayos de expresión heteróloga del NCC en ovocitos de *X. laevis* se ha observado que WNK1 no tiene efecto sobre la actividad del NCC. Sin embargo, WNK1 bloquea el efecto inhibitorio de WNK4 sobre el NCC, es decir, WNK1 inhibe a WNK4 [44, 47]. De hecho, se ha observado que existe interacción entre WNK1 y WNK4

y que la actividad de WNK1 regula la auto-fosforilación de la WNK4 [36, 48]. Así mismo, recientemente se ha observado tanto a nivel bioquímico [49-50] como funcional [51] que la WNK1 regula la actividad de las cinasas SPAK y OSR1. Estas cinasas pertenecen al grupo de las cinasas STE-20 (Ste-20 related proline-alanine-rich kinase) [52] y en los últimos años se ha obtenido evidencia de que interaccionan y regulan la función de algunos miembros de la familia de los CEN [53-54], particularmente la del NKCC1. En otras palabras, evidencias recientes sugieren que la WNK1 regula la actividad de cotransportadores de la familia de los CEN a través de la interacción con SPAK y OSR1. Adicionalmente, existe también evidencia de que WNK1 puede regular la función del canal epitelial de sodio del túbulo colector a través su interacción con otra cinasa conocida como SGK1 (serum-glucocorticoid kinase 1) [55].

En el riñón como se mencionó, se expresa predominantemente una isoforma corta de la WNK1, cuyo inicio de transcripción ocurre en el intron 4 y carece de la mayor parte del dominio cinasa. ¿Cómo entonces el aumento en la expresión de la isoforma larga de la WNK1 produce las consecuencias renales de PHAI como hipertensión arterial e hipercalemia?. La respuesta a esta pregunta parece ser la interacción entre ambas isoformas de la WNK1. Dos trabajos recientes abordan este punto. Subramanya y cols., [25] analizaron el efecto de la interacción entre las isoformas corta y larga de la WNK1 sobre la función del NCC, mientras que Lazrak y cols., [26] hicieron lo mismo sobre el canal de potasio ROMK. La conclusión de ambos estudios fue la misma. La isoforma corta inhibe a la isoforma larga de WNK1. Así, en pacientes con PHAI lo que sucede es que la sobreexpresión de la isoforma larga sobrepasa el efecto regulador negativo de la isoforma corta. Es decir WNK1 inhibe el efecto negativo de WNK4 sobre el NCC y este efecto inhibitorio de WNK1 es a su vez bloqueado por la isoforma corta de WNK1. Por lo tanto, la cadena de eventos es la siguiente: en condiciones normales hay 9 veces más isoformas cortas que largas de WNK1, por lo que WNK1 permanece inhibida. En los pacientes con PHAI, se invierte esta proporción y ahora hay 9 veces más isoforma larga que isoforma corta, por lo que esta última ya no puede inhibir a la isoforma larga de WNK1. Esto tiene como consecuencia que la isoforma larga de WNK1, ahora activa, inhiba en forma exagerada a la WNK4, que a su vez deja de inhibir al NCC y esto trae como consecuencia el aumento en la tasa de reabsorción de sal en el túbulo distal e hipertensión arterial.

Como se mencionó WNK4 además de expresarse en el riñón, se expresa ampliamente en diferentes epitelios involucrados en el manejo de Cl⁻, lo cual sugiere que esta cinasa, podría estar regulando la actividad de un diverso grupo de proteínas involucradas en la regulación del transporte de Cl⁻ en estos epitelios. En 2004, Kahle y cols., [31] demostraron que WNK4 regula la actividad de NKCC1; uno de los principales reguladores del transporte de Cl⁻ en la membrana basolateral de las células epiteliales. La entrada de Cl⁻ a través del NKCC1 es parte integral para la secreción de éste ión en epitelios como los de los conductos pancreáticos, el colon, los conductos sudoríparos, el epidídimo y el tracto respiratorio [56]. El efecto de WNK4 sobre el NKCC1 se analizó en ovocitos de *X. laevis*, en donde al co-expresarlos la cinasa redujo en más de un 95% la actividad del cotransportador. De manera similar al NCC, la inhibición del NKCC1 por WNK4, ocurre por una reducción en la expresión del cotransportador en la membrana. Lo anterior demuestra que WNK4 juega un papel en la regulación y flujo de los electrolitos en diversos epitelios extra-renales.

Regulación de los cotransportadores electroneutros por la cinasa WNK3

Hasta la fecha, se conoce poco sobre la regulación de WNK2 y WNK3. Recientemente, nuestro grupo de investigación llevo a cabo el análisis del efecto de WNK3 sobre la función de los CEN [29, 30, 57].

En estos estudios se empleo la técnica de expresión funcional en ovocitos de *X. laevis*, en los cuales se microinyectó el RNA complementario (RNAc) de diversos cotransportadores (NCC, NKCC, o KCCs) solos o en presencia del RNAc de WNK3. Además de analizar para cada

caso el efecto de la WNK3 silvestre, también se evaluó el papel de una variante de WNK3 denominada WNK3-D294A. Ésta posee una mutación puntual que elimina la actividad de cinasa, lo que permite determinar si el efecto observado en la WNK3 silvestre depende o no de la actividad de cinasa. Tomando en cuenta que en WNK4, algunos de sus efectos dependen de la actividad de cinasa [43, 46], mientras que otros no [45].

En contraste con el efecto inhibitorio reportado de WNK4 sobre el NCC, la co-expresión de WNK3 con éste transportador, produjo un incremento significativo en su actividad; por otro lado, la mutante WNK3-D295A redujo en ~85% la captación de $^{22}\text{Na}^+$ [29] (Fig. 3A). Cuando WNK3 se co-expresó con el NCC unido a la proteína verde fluorescente (NCC-GFP), WNK3 incrementó al triple la expresión de NCC-GFP en la superficie del ovocito, mientras que la cinasa no funcional, produjo el efecto contrario (Fig. 3A). Estos resultados correlacionan con los efectos observados en los ensayos de captación y sugieren que WNK3 regula al NCC y que al menos parte de esta regulación se logra a través de la modificación de la presencia del NCC en la membrana plasmática. De manera similar, la actividad de NKCC2 y de NKCC1 se incrementó al doble cuando se co-inyectaron con la WNK3 silvestre, mientras que la cinasa no funcional inhibió los dos transportadores en ~70% [30] (Fig. 3B y 3C). La activación de NKCC2 y NKCC1 se asoció con un aumento en la fosforilación de dos residuos de treonina en los extremos amino terminales de los transportadores, necesarios para su completa activación. Por otra parte, cuando se co-expresaron con la cinasa mutada, la fosforilación de los transportadores se redujo en forma significativa, lo cual puede correlacionarse con la inhibición de la actividad observada. Lo anterior indica que los efectos de WNK3 sobre NKCC1 y NKCC2 están asociados con la fosforilación de los sitios regulatorios del extremo amino terminal, mientras que el efecto dominante negativo de la cinasa mutada, podría atribuirse a la actividad de fosfatasa sobre los transportadores.

Nuestros datos sugieren que en el riñón, la cinasa WNK3 incrementa de manera importante la entrada apical de NaCl en el túbulo distal y en el asa de Henle a través de estos cotransportadores, a diferencia de WNK1 y WNK4 cuya acción se localiza hacia regiones más distales de la neurona. Es posible que WNK3 también lleve a cabo alguna función en estas mismas regiones. La activación por la WNK3 es específica, ya que puede ser revertida por la sustitución de un amino ácido del dominio de cinasa. Los efectos de la forma inactiva de WNK3 sobre los NCC y NKCC son interesantes y podrían reflejar un efecto *in vivo* normal, el cual podría regularse a través de la auto-fosforilación de la WNK3 [36].

En contraste a la activación del NCC y el NKCC, WNK3 produjo un potente efecto inhibitorio sobre las isoformas del transportador de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$, aún en condiciones hipotónicas bajo las cuales los cotransportadores de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ se encuentran activos. Cuando los experimentos se llevaron a cabo en presencia de la mutante WNK3-D294A, bajo condiciones isotónicas en las cuales los KCCs son normalmente inactivos, se observó un incremento significativo en su función (Fig. 4A y 4B).

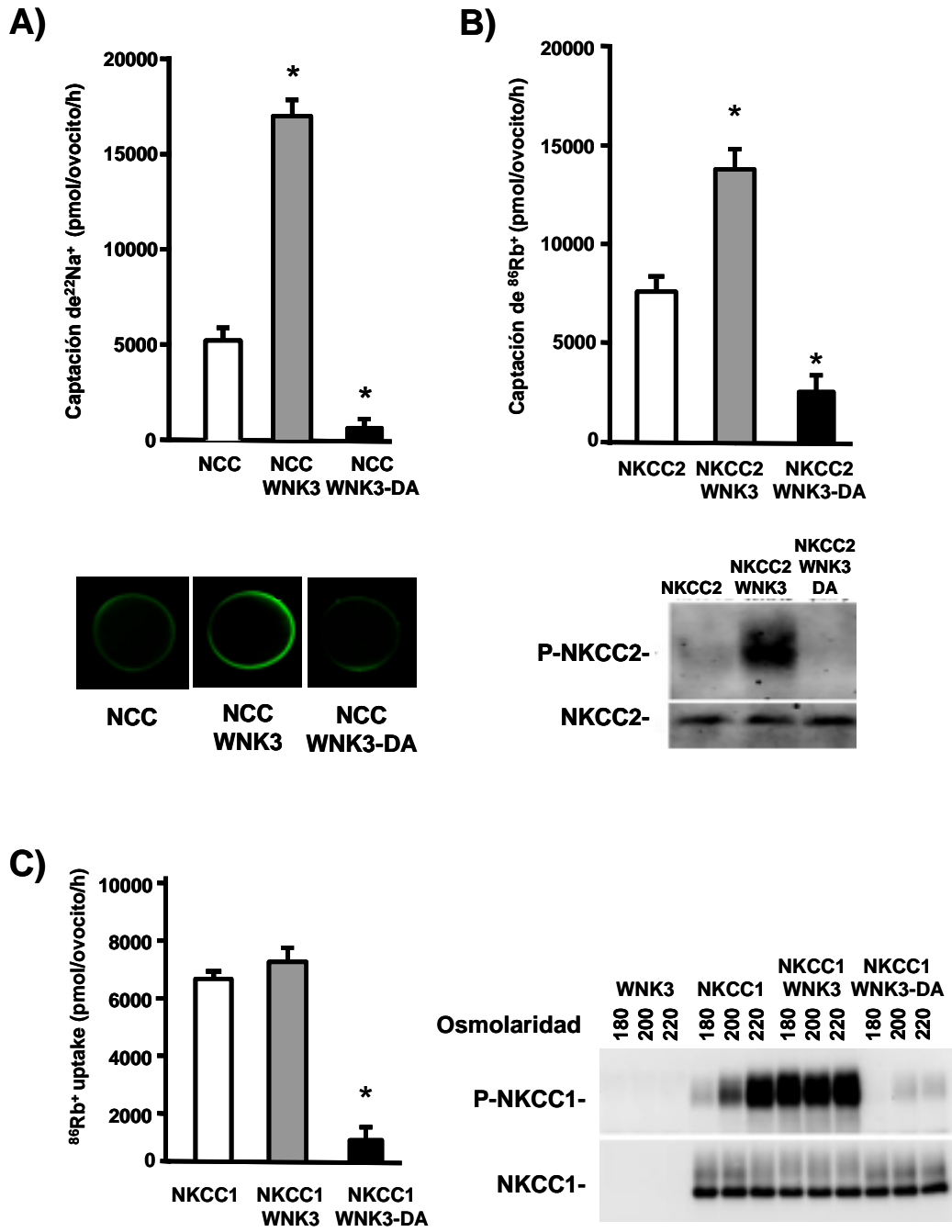


Figura 3. A) Ovocitos de *Xenopus laevis* se inyectaron con los RNAs del NCC solo, en combinación con WNK3 silvestre o con la WNK3 catalíticamente inactiva. En el panel inferior se muestra la regulación de la expresión del NCC en la membrana. Los ovocitos se inyectaron con RNac del NCC marcado con EGFP o en combinación con WNK3 silvestre o mutante. La expresión en la superficie del NCC se cuantificó por microscopía confocal. B) Ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con los RNAs del NKCC2, en combinación con WNK3 silvestre o con la WNK3 catalíticamente inactiva. En el panel inferior se muestra que WNK3 regula la fosforilación del NKCC2. Western Blot empleando el anticuerpo antifosfo- NKCC2 o anti-NKCC2 C) Ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con los RNAs del NKCC1, en combinación con WNK3 silvestre o con la WNK3 catalíticamente inactiva. Western Blot empleando el anticuerpo antifosfo- NKCC1 o anti-NKCC1. Todos los ensayos de captación de iones radiactivos se llevaron a cabo en condiciones de isotonicidad.

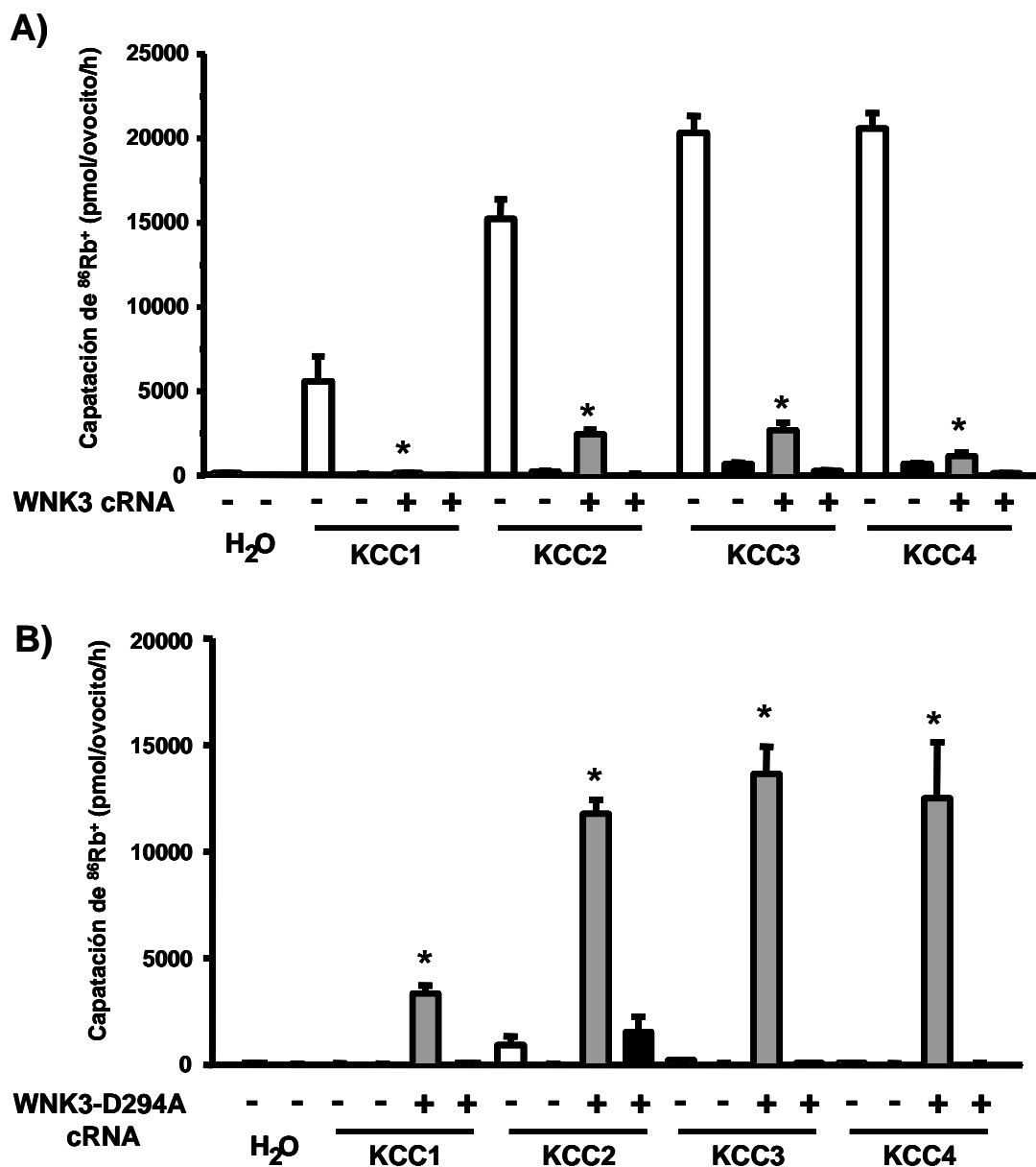


Figura 4. A) Efecto de WNK3 silvestre en el cotransporte de K^+Cl^- inducido por aumento del volumen celular bajo condiciones hipotónicas. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se inyectaron con agua ó 0.2 $\mu g/\mu l$ de RNAc de cada KCC o junto con el RNAc de WNK3 silvestre. B) Efecto de WNK3-D294A catalíticamente inactiva sobre el cotransporte de K^+Cl^- en condiciones isotónicas. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se inyectaron con agua ó 0.2 $\mu g/\mu l$ de RNAc de cada KCC o junto con el RNAc de WNK3-D294A. La captación de $^{86}Rb^+$ se evaluó 4 días después en condiciones hipotónicas en presencia (barras blancas) o ausencia de Cl^- (barras negras) en el medio de captación. Cada barra representa el promedio \pm ES de 15 ovocitos por cada grupo *, $p < 0.01$ vs. control.

En resumen, hemos observado que WNK3 activa a los transportadores que inducen la entrada de cloro a la célula (NCC, NKCC2 y NKCC1) e inactiva a los KCCs encargados de sacar éste ión de la célula. Sorprendentemente, la mutante WNK3-D294A tiene el efecto contrario: inhibe a los NCC, NKCC2 y NKCC1, pero activa a los KCCs. Los efectos de la mutante WNK3-D294A son independientes de lo que suceda con el volumen celular. Por un lado, en condiciones hipotónicas, WNK3 bloquea la activación de los KCCs, mientras que en condiciones de isotonicidad, en las que permanecen inactivos los KCCs, la mutante WNK3-D294A induce la activación de estos cotransportadores. Esto indica que la presencia de WNK3 y la mutante WNK3-D294A tiene efectos similares a los que se obtienen para la modificación del volumen celular. Dado que los CEN participan de manera importante en la regulación del volumen celular, proponemos que WNK3 puede ser la cinasa o una de las cinasas que responden a Cl⁻ y que regulan el volumen celular en respuesta a cambios osmóticos y/o cambios en la [Cl⁻]. Estos eventos pueden tener implicaciones importantes en múltiples fenómenos fisiológicos en los que los CEN están involucrados, como la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y la regulación de la presión arterial.

Referencias

1. Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E y Haussinger D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78: 247-306.
2. Gamba G. (2005). Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423-493.
3. Gamba G, Saltzberg S N, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger M A, Brenner B M y Hebert S C. (1993). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2749-2753.
4. Xu J-C, Lytle C, Zhu T T, Payne J A, Benz Jr.E y Forbush III B. (1994). Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2201-2205.
5. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA y Hebert SC. (1994). Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722.
6. Gillen C M, Brill S, Payne J A and Forbush III B. (1996). Molecular cloning y funcional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271: 16237-16244.
7. Mount D B, Mercado A, Song L, Xu J, George Jr.A L, Delpire E y Gamba G. (1999). Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16355-16362.
8. Payne J A, Stevenson T J y Donaldson L F. (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271: 16245-16252.
9. Mercado A, Mount DB y Gamba G. (2004). Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res* 29: 17-25.
10. Delpire E. (2000). Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15: 309-312.
11. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr. y Roccella EJ. (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 289: 2560-2571.
12. Delpire E y Mount DB. (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* 64: 803-843.
13. Monroy A, Plata C, Hebert SC y Gamba G. (2000). Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F161-F169.
14. Moreno E, Tovar-Palacio C, De Los HP, Guzman B, Bobadilla NA, Vazquez N, Riccardi D, Poch E y Gamba G. (2004). 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* 279: 16553-16560.

15. Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC y Gamba G. (2002). Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms. *J Biol Chem* 277: 11004-11012.
16. Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB y Gamba G. (2000). Functional Comparison of the K⁺-Cl⁻ Cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem* 275: 30326-30334.
17. Song L, Mercado A, Vazquez N, Xie Q, Desai R, George AL, Gamba G y Mount DB. (2002). Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res* 103: 91-105.
18. Flatman PW. (2002). Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1566: 140-151.
19. Lytle C. (1998). A volume sensitive protein kinase regulates the Na-K-2Cl cotransporter in duck red blood cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 274: C1002-C1010.
20. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ y Cobb MH. (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275: 16795-16801.
21. Verissimo F y Jordan P. (2001). WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20: 5562-5569.
22. Kahle KT, Wilson FH y Lifton RP. (2005). Regulation of diverse ion transport pathways by WNK4 kinase: a novel molecular switch. *Trends Endocrinol Metab* 16: 98-103.
23. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X y Lifton RP. (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112.
24. Cope G, Golbang A y O'Shaughnessy KM. (2005). WNK kinases and the control of blood pressure. *Pharmacol Ther* 106: 221-231.
25. Subramanya AR, Yang CL, Zhu X y Ellison DH. (2006). Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F619-F624.
26. Lazrak A, Liu Z y Huang CL. (2006). Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1615-1620.
27. Gamba G. (2005). Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F245-F252.
28. Holden S, Cox J y Raymond FL. (2004). Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). *Gene* 335: 109-119.
29. Rinehart J, Kahle KT, de los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G y Lifton RP. (2005). WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16777-16782.
30. Kahle KT, Rinehart J, de los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I y Lifton RP. (2005). WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16783-16788.
31. Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS y Lifton RP. (2004). WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2064-2069.
32. Wang Z, Yang CL y Ellison DH. (2004). Comparison of WNK4 and WNK1 kinase and inhibiting activities. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 939-944.
33. Xu BE, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ y Cobb MH. (2002). Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. *J Biol Chem* 277: 48456-48462.
34. Min X, Lee BH, Cobb MH y Goldsmith EJ. (2004). Crystal Structure of the Kinase Domain of WNK1, a Kinase that Causes a Hereditary Form of Hypertension. *Structure (Camb)* 12: 1303-1311.
35. Gordon RD. (1986). Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension* 8: 93-102.
36. Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, Goldsmith EJ y Cobb MH. (2005). Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem* 280: 26653-26658.
37. Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N y Lifton RP. (1997). Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet* 16: 202-205.
38. Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM, Fournier A, Corvol P y Jeunemaitre X. (2000). A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am J Hum Genet* 67: 302-310.

39. Disse-Nicodeme S, Desitter I, Fiquet-Kempf B, Houot AM, Stern N, Delahousse M, Potier J, Ader JL y Jeunemaitre X. (2001). Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. *J Hypertens* 19: 1957-1964.
40. Achard JM, Warnock DG, Disse-Nicodeme S, Fiquet-Kempf B, Corvol P, Fournier A y Jeunemaitre X. (2003). Familial hyperkalaemic hypertension: phenotypic analysis in a large family with the WNK1 deletion mutation. *Am J Med* 114: 495-498.
41. Simon D B, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet F E, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner H M, Koolen M, Gainza F J, Gitelman H J y Lifton R P. (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 12: 24-30.
42. Simon DB, Farfel Z, Ellison D, Bia M, Tucci J, y Lifton RP. (1995). Examination of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a candidate gene in Gordon's syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 6: 632.
43. Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G y Lifton RP. (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 680-684.
44. Yang CL, Angell J, Mitchell R y Ellison DH. (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 111: 1039-1045.
45. Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC y Lifton RP. (2003). WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. *Nat Genet* 35: 372-376.
46. Kahle KT, MacGregor GG, Wilson FH, Van Hoek AN, Brown D, Ardito T, Kashgarian M, Giebisch G, Hebert SC, Boulpaep EL y Lifton RP. (2004). Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: Insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14877-14882.
47. Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR and Ellison DH. (2005). Mechanisms of WNK1 y WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Clin Invest* 115: 1379-1387.
48. Yang CL y Ellison DH. (2003). WNK1 interacts physically with WNK4. *J Am Soc Nephrol* 14: 77A.
49. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K y Shibuya H. (2005). WNK1 Regulates Phosphorylation of Cation-Chloride-coupled Cotransporters via the STE20-related Kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 280: 42685-42693.
50. Vitari AC, Deak M, Morrice NA y Alessi DR. (2005). The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391: 17-24.
51. Gagnon KB, England R y Delpire E. (2006). Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C134-C142.
52. Strange K, Denton J y Nehrke K. (2006). Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology (Bethesda)* 21: 61-68.
53. Piechotta K, Lu J y Delpire E. (2002). Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 277: 50812-50819.
54. Dowd BF y Forbush B. (2003). PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem* 278: 27347-27353.
55. Xu BE, Stippec S, Chu PY, Lazrak A, Li XJ, Lee BH, English JM, Ortega B, Huang CL y Cobb MH. (2005). WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10315-10320.
56. Haas M y Forbush B, III. (2000). The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol* 62: 515-534.
57. de los Heros P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, Mount DB, Lifton RP, Hebert SC y Gamba G. (2006). WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1976-1981.

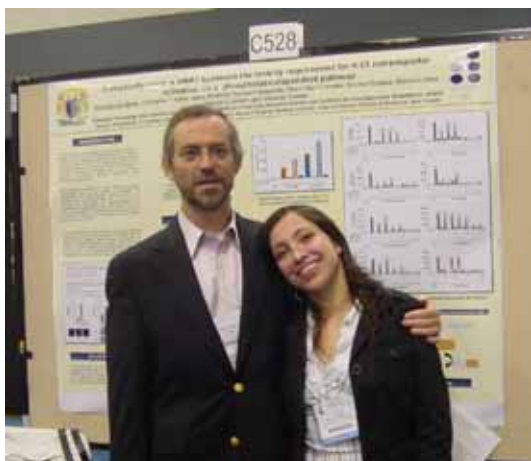
REGULACIÓN DE LOS COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS POR LAS CINASAS WNK

Resumen

La familia de cotransportadores electroneutros de cationes-Cl⁻ (SLC12A) esta conformada por 2 ramas principales: la de los cotransportadores de K⁺-Cl⁻, compuesta por cuatro miembros (KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4) y la de los cotransportadores de Na⁺-(K⁺)-Cl⁻, compuesta por tres miembros (NCC, NKCC1 y NKCC2). Los cotransportadores de K⁺-Cl⁻ regulan el eflujo de Cl⁻, son inhibidos por fosforilación y se activan por desfosforilación. Los cotransportadores de Na⁺-(K⁺)-Cl⁻ regulan el influjo de Cl⁻ y se activan por fosforilación. Las mutaciones en algunos de los miembros de esta familia se encuentran relacionadas con enfermedades en el humano, otros constituyen el blanco de diversos diuréticos y en general se encuentran involucrados en la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y la presión sanguínea. Se ha propuesto una vía de cinasas y fosfatasas que coordina las actividades de estos cotransportadores, sin embargo, los mecanismos involucrados aún se desconocen. Estudios recientes indican que las cinasas WNK, una familia recientemente descrita de cuatro serina treonina cinasas, regulan a la familia SLC12A. Las mutaciones en WNK1 y WNK4 dan origen al síndrome de Gordon, una forma hereditaria de hipertensión que se caracteriza por la presencia de hipercalemia (alta concentración de potasio en sangre) y acidosis metabólica. Se ha demostrado que WNK4 regula a NCC y a NKCC1. Algunos de estos efectos son dependientes de la actividad de cinasa, mientras que otros son independientes de su actividad catalítica. Así mismo, WNK1 modula el efecto de WNK4 sobre el cotrasportador NCC. Se ha observado que WNK1 activa también a la proteína cinasa SPAK, la cual regula la activación de diversos canales iónicos epiteliales, que incluyen a la familia SLC12A. WNK3 se co-expresa con varios cotransportadores catión/Cl⁻ en diversos tejidos regulando su actividad. Estos datos sugieren que las WNKs, son componentes cruciales de la vía de señalización de cinasas y fosfatasas que regulan de forma coordinada el eflujo e influjo de Cl⁻ a través de los cotransportadores electroneutros.

Palabras clave: Cotransportador electroneutro catión/Cl⁻, cinasas WNK, fosforilación, electrolitos, presión sanguínea, volumen celular, excitabilidad neuronal.

Semblanza del Dr. Gerardo Gamba.



Gerardo Gamba nació en 1961. Es Médico Cirujano por la Facultad de Medicina de la UNAM (1984). Especialista en Medicina Interna y de Nefrología por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (1985 a 1990). En ambas especialidades recibió certificación por parte de los consejos correspondientes. En su preparación como investigador científico recibió con mención honorífica los grados de Maestro (1990) y Doctor (1994) en Ciencias Médicas por parte de la Facultad de Medicina de la UNAM. Realizó una estancia post-doctoral de 3 años en la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard. Fue becario de instituciones nacionales como CONACYT, la SEP y la Fundación México en Harvard, e

internacionales como *Fogarty International Center* y la *American Heart Association*.

Actualmente es jefe de la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, localizada en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Es investigador titular C/PRIDE D y miembro del Sistema Nacional de Investigadores, en el nivel III. Ha publicado 74 artículos en revistas internacionales, muchos de ellos en revistas con alto factor de impacto, por los que ha recibido por esto más de 3000 citas. Ha dirigido 13 tesis (7 de licenciatura, 2 de maestría y 4 de doctorado). Recibió en 1999 el Premio Miguel Alemán Valdés en el área de la Salud y la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos en el área de Ciencias Naturales. Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias (1999) y de la Academia Nacional de Medicina (2003).

La principal actividad del Dr. Gamba es la investigación científica. Sin embargo, dedica parte de su tiempo a la clínica, a la docencia, y al trabajo editorial. Cuatro meses del año es revisor en pisos de hospitalización en medicina interna o nefrología en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Es profesor titular de la materia de fisiología humana en la Facultad de Medicina de la UNAM y en la Facultad Mexicana de Medicina de la Universidad La Salle. Es editor en jefe de la Revista de Investigación Clínica, la cual es una de las revistas mexicanas indizadas en todos los índices internacionales. En esta ha publicado 45 manuscritos en español, 19 de los cuales son de investigación clínica original y el resto de revisión o editoriales.

Semblanza de maestra Paola de los Heros

Paola de los Heros es Bióloga por la Facultad de Ciencias y Maestra en Ciencias Bioquímicas por la Facultad de Química de la UNAM. Actualmente está realizando su tesis doctoral. Las tres tesis la realizó bajo la tutela del Dr. Gerardo Gamba. Su productividad es poco usual en un estudiante de doctorado. Es autora en siete manuscritos. Tres publicados en la revista *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, tres en el *American Journal of Physiology* y uno en el *Journal of Biological Chemistry*.

WNK Kinases, Renal Ion Transport and Hypertension

Pedro San-Cristobal^a Paola de los Heros^a José Ponce-Coria^a Erika Moreno^{a, b}
Gerardo Gamba^a

^aMolecular Physiology Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, and ^bUniversidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, México

Key Words

Diuretics · Distal convoluted tubule · Salt transport · Potassium excretion · Phosphorylation

Abstract

Two members of a recently discovered family of protein kinases are the cause of an inherited disease known as pseudohypoaldosteronism type II (PHAII). These patients exhibit arterial hypertension together with hyperkalemia and metabolic acidosis. This is a mirror image of Gitelman disease that is due to inactivating mutations of the *SLC12A3* gene that encodes the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter. The uncovered genes causing PHAII encode for serine/threonine kinases known as WNK1 and WNK4. Physiological and biochemical studies have revealed that WNK1 and WNK4 modulate the activity of several transport pathways of the aldosterone-sensitive distal nephron, thus increasing our understanding of how diverse renal ion transport proteins are coordinated to regulate normal blood pressure levels. Observations discussed in the present work place WNK1 and WNK4 as genes involved in the genesis of essential hypertension and as potential targets for the development of antihypertensive drugs.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Arterial hypertension is one of the most common diseases affecting more than one billion people worldwide. Most of the affected patients belong to a category known as essential hypertension, which means the origin of their disease is unknown. Unfortunately, most of the time increased blood pressure is not associated with any particular symptom, but induces a remarkable increase in the risk of fatal illnesses such as heart attack, aneurysm or stroke, due to increased pressure on the arterial wall accelerating the processes of atherosclerosis. Arterial hypertension is a prototype of what is currently known as polygenic disease, in which it is postulated that normal variation throughout the genome, due to changes at the single-base level, known as single-nucleotide polymorphisms (SNPs), predispose individuals to an increased susceptibility to environmental factors (i.e. sugar consumption and diabetes mellitus, or salt intake and arterial pressure) to produce the disease. SNPs can also be the reason for the well-known variation in the type or magnitude of response to antihypertensive drugs observed within the population (pharmacogenomics). While the origins of hypertension are unknown, several lines of evidence demonstrate that pressure natriuresis in the kidney plays a key role in the long-term regulation of arterial pressure and that arterial hypertension only occurs when the pressure natriuresis relationship in the kidney

is switched to the right (Guytonian hypothesis) [1]. That is, increased arterial blood pressure is required in order to achieve normal salt urinary output.

Because arterial hypertension is polygenic, in order to understand the mechanisms of the disease, it is important to identify genes involved in blood pressure regulation. A very successful approach used over the last decade has been unmasking genes causing monogenic diseases that exhibit high or low blood pressure levels under the assumption that if altered function of a single gene is enough to produce an abnormal change in blood pressure, it is highly likely that the gene could be involved in the genesis of essential hypertension. More than 15 genes have been identified following this strategy [2]. Supporting the Guytonian hypothesis, all recognized genes are involved in the maintenance of renal salt balance. Good examples of genes discovered by this strategy that have increased our understanding of hypertension mechanisms are the serine/threonine kinases of the WNK family.

WNK Kinases and Genetic Hypertension

Identification of WNK Kinases as Proteins Involved in the Regulation of Arterial Blood Pressure

Two monogenic diseases resulting in abnormal variations in blood pressure exhibit mirror images in their clinical features. On the one hand, Gitelman disease (OMIM No. 263800) is an autosomal recessive disorder associated with arterial hypotension, together with hypokalemic metabolic alkalosis and hypocalciuria. This monogenic disease is due to mutations in the *SLC12A3* gene located in the human chromosome 16 that encodes for the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter (NCC) that is expressed in the apical membrane of the distal convoluted tubule (DCT) [3–5] (table 1). The mutations are of the ‘loss of function’ type resulting in inactivation of the cotransporter [9–11]. The absence of NCC activity decreases salt reabsorption in the DCT, resulting in dehydration and arterial hypotension. The consequential increase in salt delivery to the connecting tubule (CNT) and collecting duct (CD) induces increased potassium and hydrogen secretion producing the hypokalemic metabolic alkalosis. On the other hand, a disease known by several names such as Gordon’s disease, familial hyperkalemic hypertension or pseudohypoaldosteronism type II (PHAII; OMIM No. 145260) exhibits a mode of inheritance that is compatible with autosomal dominant transmission and features arterial hypertension that is accom-

Table 1. Genetic defects in PHAII and Gitelman disease

Disease	Location	Gene	Defect	Reference
PHAII1	12p13.3	<i>PRKWINK1</i>	intronic deletion	12
PHAII2	17q21	<i>PRKWINK4</i>	missense mutations	11
PHAII3	1q31–42	unknown	unknown	11
PHAII4	unknown	unknown	unknown	13
Gitelman	16q13	<i>SLC12A3</i>	mutations	3–5

panied by hyperkalemic metabolic acidosis and hypercalciuria. This phenotype is Cl⁻ dependent and is corrected with low doses of thiazide-type diuretics [12]. Thus, PHAII is a mirror image of Gitelman disease, strongly suggesting that increased activity of the NCC must be implicated. However, initial genomic analysis demonstrated no significant linkage of kindred with PHAII to the *SLC12A3* gene on chromosome 16 in patients with PHAII [13], making it unlikely that the cause of PHAII is activating mutations of the NCC. Later, locus heterogeneity of PHAII was identified by Mansfield et al. [14] when positive linkage analysis was observed in two loci: one located in chromosome 1q31–q42 and another in chromosome 17p11–q21 (table 1). The evidence of genetic heterogeneity of PHAII was increased by Disse-Nicodeme et al. [15, 16], who observed in French kindreds a positive linkage to chromosome 12p13.3 and in another family no linkage to the *SLC12A3* gene or to chromosomes 1, 12 and 17. Thus, at least 4 genes are capable of producing the same disease independently (table 1).

At about the time heterogeneity of PHAII was observed, in their effort to clone novel members of the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated protein kinases from brain tissue, the Cobb group in Texas [17] identified a new type of serine/threonine kinase that lacks the canonical lysine observed in all serine/threonine kinases in the subdomain II of the kinase domain. Due to the absence of this lysine, the new kinase was named WNK1 for ‘with no lysine (K)’. This report would probably have passed unnoticed by the renal community if not for a study months later in which the Lifton group from Yale, following the positional cloning strategy [8], identified that the cause of PHAII in families with positive linkage to chromosome 12 was due to deletion of a fragment of intron 1 in the *PRKWINK1* gene, encoding WNK1.

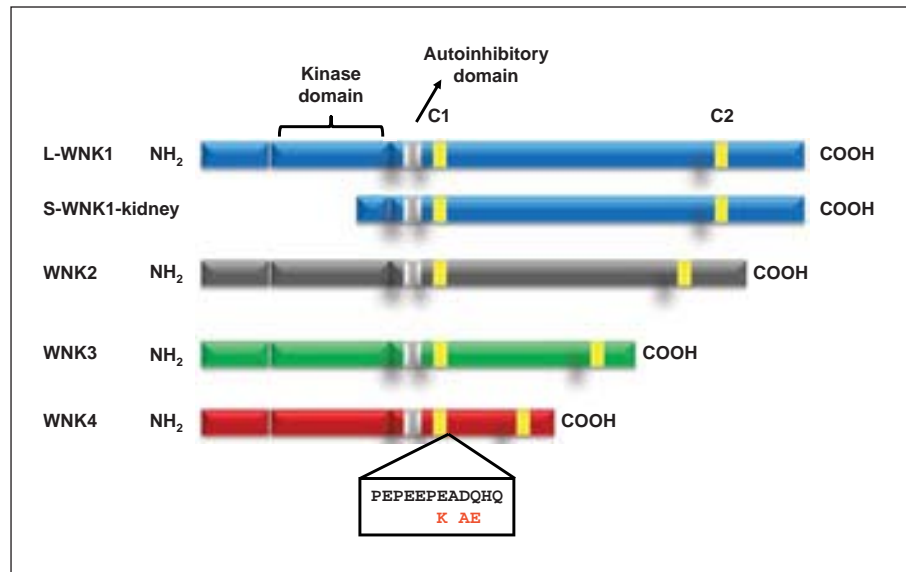


Fig. 1. Proposed model of WNK proteins. The central kinase domain is shown by a bracket. The autoinhibitory domain and the coiled-coil domains are highlighted. Locations of the negatively charged residues in which WNK4 mutations occur are shown below WNK4.

Two Forms of PHAII Are due to Mutations in WNK Kinases

Wilson et al. [8] uncovered 2 genes causing PHAII. They first observed that 2 kindreds with significant linkage to chromosome 12p13 cosegregated with a 41- or 21-kb deletion, respectively, within the first large intron of *PRKWINK1*. No mutations or deletions within the WNK1-coding sequence were detected in these families. The expression of WNK1 mRNA in leukocytes in affected individuals was observed to be 5-fold higher than in nonaffected members of the family. Thus, genomic deletions of the first intron of WNK1 increase the expression of an otherwise normal WNK1 kinase. Supporting this hypothesis, Delaloy et al. [18] later revealed that the region that goes from -2,500 to -1,200 of the human *PRKWINK1* promoter represses transcription of the gene. To date, these are the only 2 PHAII kindreds in which deletion of *PRKWINK1* genes have been reported.

The other form of PHAII that is due to mutations in WNK kinases is the one in which positive linkage was observed with human chromosome 17. Four independent missense mutations in the *PRKWINK4* gene were observed by Wilson et al. [8] in these families. Interestingly, 3 out of 4 missense mutations occur within a highly conserved acidic region that is located within the carboxyl-terminal domain, just after the first coiled-coil domain (fig. 1). This negatively charged region contains 10 amino acid residues that are 100% identical between WNK1, WNK2 and WNK4, and 70% with WNK3. Six out of 10 amino acid residues in this region of WNK4 are charged.

The 3 missense mutations that occur in this region change or eliminate the charge of a residue (E562K, D564A and Q565E mutations). Golbang et al. [19] later reported another PHAII kindred in which asparagine 564 is mutated to histidine (D564H). In addition, Wilson et al. [8] also observed that mutation R1185C cosegregates with PHAII in another family. This mutation, although outside the acidic domain, also changes the charge of an amino acid residue. Thus, the PHAII that cosegregates with the *PRKWINK4* gene is due to point mutations that change 1 charged amino acid residue. It is believed that this alteration probably affects the way in which WNK4 interacts with other proteins or charged molecules, resulting in modification of the effect of WNK4 upon transport systems.

The WNK Family Is Composed of Four Members

After the cloning and identification of WNK1 from the rat kidney [17], it was soon observed that the WNK family is composed of 4 members that were named WNK1, WNK2, WNK3 and WNK4 (fig. 1). The corresponding genes *PRKWINK1*, *PRKWINK2*, *PRKWINK3* and *PRKWINK4* are located in human chromosomes 12, 9, X and 17, respectively. As shown in figure 1, WNK kinases are composed of 3 domains. A serine/threonine kinase domain of 274 residues is flanked by a short amino-terminal domain of 146–220 amino acid residues and a large carboxyl-terminal domain of 786–1,888 residues containing an autoinhibitory domain and 2 coiled-coil domains that could be important for protein-protein in-

teraction. The degree of identity among the 4 WNKs at the amino- and carboxyl-terminal domains is below 20%, whereas at the serine/threonine kinase it is above 80%. The WNK1 kinase domain crystal structure was resolved at 1.8 Å demonstrating that the catalytic lysine is located in the β -strand 2, rather than strand 3 as in other serine/threonine kinases [20]. Several in vitro studies have shown that WNK kinases can interact amongst each other at the protein-protein level [21–23] or by phosphorylation processes [24], as well as with many other kinase proteins including mitogen-activated protein kinases [6, 25], transforming growth factor β signaling pathway kinases [26], synaptotagmin [27] and STE-20-related kinases like serine-proline-alanine-rich kinase (SPAK) or oxidative stress response kinase 1 (OSR1) [7, 28–31].

WNK1 is a ubiquitously expressed kinase with predominant expression in the kidney, heart, muscle and testis in the rat [17], mouse [32] and human [33]. In most tissues, it is predominantly expressed in polarized epithelial cells. In the kidney it is expressed along the entire nephron [32, 34]. By RT-PCR analysis it has been observed that WNK3 transcripts are present in all tissues [35], and by immunohistochemistry WNK3 protein was shown to be expressed in all nephron segments, as well as in epithelial cells of several organs such as the pancreas, biliary duct, stomach and intestine [36]. In contrast to WNK1 and WNK4, WNK3 protein is highly expressed in the central nervous system in which it is present in cell bodies of neurons expressing ionotropic γ -aminobutyric acid A receptors [36]. WNK4 is mainly expressed in the aldosterone-sensitive distal nephron. At the protein level it has been shown to be present in the DCT and CD [8, 34], and at the mRNA level, by single-nephron RT-PCR, WNK4 transcripts have been shown to be expressed also in the thick ascending limb of Henle's loop [34]. In addition, Kahle et al. [37] observed that WNK4 transcript and protein are present in several epithelial tissues, in which expression is more prominent in tight junctions. Interestingly, all epithelia expressing WNKs are heavily involved in Cl^- transport.

The molecular diversity of the WNK family has been shown to be increased by expression of several alternative splicing variants described in WNK1 and WNK3. Two independent groups [18, 38] observed by Northern blot analysis 2 WNK1 transcripts, 9.0 and 10.5 kb in size, that differ in the length of the 3' untranslated region. These transcripts are present in all tested tissues and are known as L-WNK1. In addition, there is an approximately 8.0-kb transcript expressed only in the kidney that is due to alternative splicing of exons 1–4. The transcription of this

isoform is under control of an intron 4 alternative promoter and contains sequences from an extra exon located between exons 4 and 5 which has been designed as exon 4a. As shown in figure 1, at the protein level the consequence of this splicing mechanism is a shorter WNK1 isoform that lacks the first 437 amino acid residues, including almost the entire kinase domain. This shorter, truncated isoform is known as S-WNK1. By in situ hybridization it has been demonstrated that within the kidney, L-WNK1 isoforms are present all along the entire nephron, whereas S-WNK1 is only present in the aldosterone-sensitive distal nephron, particularly abundant in the DCT and CNT. These locations are very important to understand the mechanism by which overexpression of L-WNK1 produces activation of the NCC (see below). For WNK1 another 5 different transcripts have been detected due to splicing of exons 9, 11 and 12, either separately or in combination. The functional consequences of all these isoforms are unknown. Finally, human WNK3 exhibits at least 2 alternative variants. One is due to usage of an alternative splice donor into exon 18 that introduces 47 amino acid residues, and the other is due to splicing of exon 22 [35]. The functional consequences of these splicing isoforms are unknown.

Modulation of Renal Ion Transport Systems by WNKs

Several lines of evidence suggested that WNKs would be critical regulators of renal ion transport systems: (1) WNK1 and WNK4 are predominantly expressed in the aldosterone-sensitive distal nephron; (2) in addition to hypertension, PHAII patients exhibit hyperkalemia, metabolic acidosis and hypercalciuria consistent with impairment of the normal renal excretion of these ions; (3) PHAII is the mirror image of Gitelman disease that is due to inactivating mutations of the NCC; (4) the PHAII clinical picture is easily reverted by very low doses of thiazide-type diuretics [12].

Effects of WNK4 upon Distal Nephron Transport Systems

Due to the mirror image between Gitelman disease and PHAII, and the exquisite sensitivity of this latter disease to thiazides, the first transport system that was studied was the NCC, which is the major salt transport pathway in the DCT (fig. 2). The effect of WNK4 upon NCC activity was assessed using the heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocytes, which was used to clone these and other transporters [39, 40], and in which

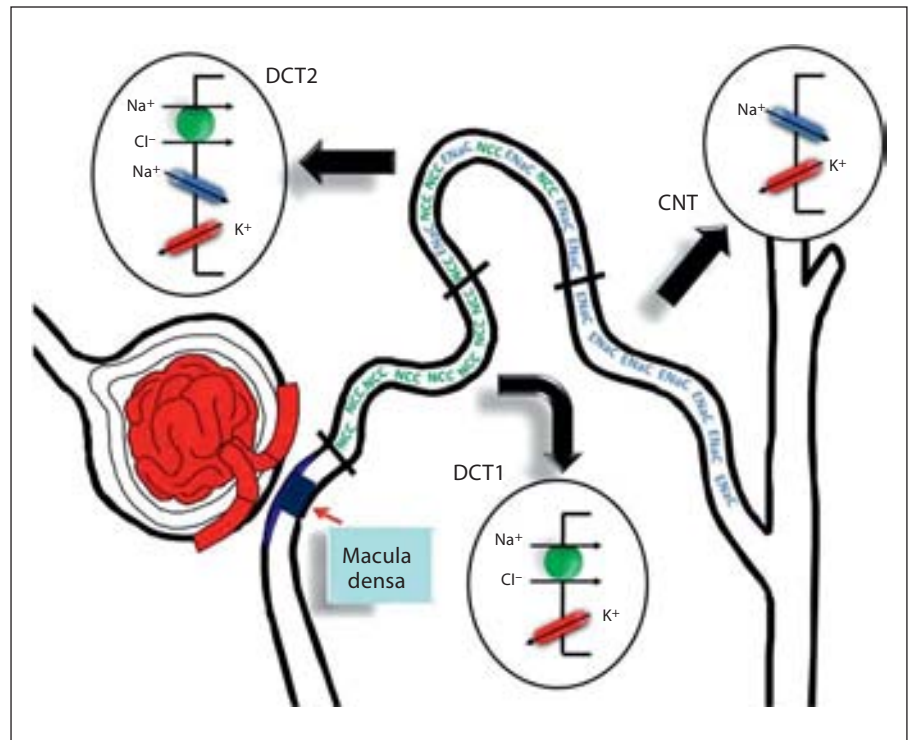


Fig. 2. Salt and potassium transport systems in the DCT and CNT. The DCT begins few cells after the macula densa; it is divided into 2 portions, the DCT1 in which the salt reabsorption pathway is the NCC and the DCT2 in which salt reabsorption takes place through both, the NCC and ENaC. Then, the ENaC is the major salt reabsorption pathway in the CNT and downstream in the CD. In all these segments, the ROMK is the major potassium-secretory pathway. As discussed in the text, L-WNK1, S-WNK1 and WNK4 are heavily expressed in these nephron segments.

most of the functional properties of the NCC have been analyzed [41]. Two independent groups obtained comparable results simultaneously [42, 43]. When coexpressed in oocytes, WNK4 reduces the activity of NCC by decreasing the amount of the cotransporter present on the cell surface. This negative effect upon the NCC was dependent on the WNK4 kinase activity and was also eliminated by introducing the PHAII mutation Q562E (mouse sequence; table 2). These observations were later corroborated by other groups using culture cells as expression systems [19, 44, 45] and, also, added the evidence that decreased expression of NCC on the cell surface is not associated with increased dynamin-induced vesicle internalization but is rather due to increased lysosomal degradation of NCC protein.

PHAII is associated with hyperkalemia and potassium excretion in the nephron that predominantly occurs in the aldosterone-sensitive distal nephron. Thus, another obvious target for WNK4 regulation was the renal outer medullary potassium channel (ROMK) that is the major renal potassium-secretory pathway in the apical membrane of the distal nephron (fig. 2). Similar to NCC, WNK4 is a negative regulator of the ROMK [46]. However, there are important differences between WNK4 ef-

Table 2. Modulation of renal ion transport systems by WNKs

	WNK4	PHAII WNK4	S1169D WNK4	WNK1
NCC	↓	↑	↓	–
ROMK	↓	↓↓	↑	↓
ENaC	↓	↑	↑	↑
Claudin 4	↑	↑↑	n.d.	↑
KCCs	↓	↓	n.d.	n.d.

ROMK = Renal outer medullary potassium channel; ENaC = epithelial Na channel; KCC = K-Cl cotransporter; n.d. = not determined.

fects upon the NCC than upon the ROMK (table 2). First, WNK4 catalytic activity is not required for ROMK inhibition. Second, the mechanism is due to a WNK4-induced increased internalization of the ROMK via clathrin-coated pits. These observations performed originally in *Xenopus* oocytes have been confirmed in mammalian cells [47], in which it has been observed that WNK4 interacts with a protein known as intersectin that is in-

volved in the clathrin-induced endocytosis. Additionally, treatment of HEK-293 cells with siRNA against WNK1 and WNK4 resulted in increased activity of the ROMK, indicating that, indeed, basal activity of the channel is modulated by both kinases [48]. Third, while for the NCC PHAII type mutations in WNK4 prevented the dominant negative effect, for ROMK they resulted in increased inhibition. This observation can explain the hyperkalemia in PHAII patients since inhibition of the ROMK is increased by mutant WNK4.

A third candidate target for WNK4 is the apical epithelial sodium channel (ENaC) that in the distal nephron is an important pathway for sodium reabsorption (fig. 2). In addition, activity of the ENaC is required for ROMK potassium excretion since the luminal negative potential that is generated by sodium translocation is required for potassium to be secreted. Ring et al. [49] demonstrated that WNK4 reduces the activity of the ENaC. This effect does not require WNK4 catalytic activity and is lost by elimination of the PPXY motif of the ENaC β - or γ -subunit, indicating that, similar to ROMK, it is due to clathrin-mediated endocytosis. Interestingly, PHAII type mutations in WNK4 prevent the inhibitory effect of WNK4 upon the ENaC (table 2).

The fourth identified targets for WNK4 are the proteins mediating paracellular Cl^- flux in the distal nephron known as claudins. Two independent groups [50, 51] observed simultaneously in MDCKII cells that WNK4 increases the paracellular transport of Cl^- but not that of Na^+ . This effect requires WNK4 catalytic activity and is associated with phosphorylation of claudin 4 in its carboxyl-terminal domain. In addition, PHAII-type mutations in WNK4 are associated with a further increase in Cl^- permeability and phosphorylation of claudin 4 (table 2). Finally, WNK4 also inhibits the activity of the K-Cl cotransporters KCC1, KCC3 and KCC4 [52], which in the distal nephron are critical for potassium secretion in the DCT [53] and acid secretion in the CD [54]. KCC4 knockout mice feature metabolic acidosis. The WNK4 inhibitory effect is kinase dependent but was not affected by PHAII-type mutations (table 2).

Effects of WNK1 upon Distal Nephron Transport Systems

The effect of WNK1 upon distal transport systems is probably more complex than WNK4 since it has been demonstrated that WNK1 is a regulator of other WNKs by phosphorylation processes [55] or by WNK-to-WNK interactions at the protein level [21, 22]. For instance, Yang et al. [43] observed that WNK1 has no direct effect

upon the NCC, but prevents the WNK4-induced inhibition of the NCC. That is, when the NCC and WNK4 were coexpressed together in *X. laevis* oocytes, WNK4 induced inhibition of NCC activity. However, when WNK1 was added to the coexpression cocktail, the WNK4 inhibitory effect of the NCC was lost. Later on, Subramanya et al. [56] analyzed the effect of the L-WNK1 and S-WNK1 variants of WNK1 upon the NCC and its WNK4 regulation. Their observations are very important to understand the mechanism by which increased expression of a normal L-WNK1 in PHAII patients produces increased activity of the NCC. These authors demonstrated that while L-WNK1 prevented the WNK4-induced inhibition of the NCC, S-WNK1 by interacting with L-WNK1 in a dominant negative fashion eliminated the L-WNK1-induced inhibition of WNK4. As was discussed above, while L-WNK1 is present in several epithelial cells and along the entire nephron, S-WNK1 is mainly expressed in the DCT and CNT [34, 38]. Thus, it is proposed that in normal subjects the ratio of S-WNK1/L-WNK1 expression in the DCT and CNT is in favor of S-WNK1, and thus, the shorter isoform by highjacking L-WNK1 prevents its inhibitory effect upon WNK4, allowing WNK4 to keep the NCC inhibited. In PHAII patients due to intronic deletions of the *PRKWINK1* gene that increases expression of L-WNK1, the ratio S-WNK1/L-WNK1 is reduced. As a consequence, L-WNK1 is able to inhibit WNK4 and thus, NCC activity is increased, augmenting salt reabsorption in the DCT and thus arterial pressure. Similarly, it has been demonstrated that S-WNK1 and L-WNK1 interact with each other regulating ROMK activity. Lazrak et al. [48] observed in HEK cells transfected with ROMK that L-WNK1 decreased the activity of the channel. This effect of L-WNK1 requires the L-WNK1 catalytic activity and can be prevented by coexpression of S-WNK1. In the same study it was observed that exposing rats to a K^+ -deficient diet was associated with increased expression of L-WNK1 and decreased expression of S-WNK1, consistent with a situation in which ROMK activity is decreased since K^+ secretion is maximally reduced. Consistent with these findings, O'Reilly et al. [34] also observed that the ratio S-WNK1/L-WNK1 and the expression of WNK4 at the mRNA level are modulated by low- and high-potassium diets.

WNK1 is also a modulator of ENaC activity. In a very interesting study, Xu et al. [57] demonstrated that ENaC can be regulated by WNK1, via another kinase known as serum glucocorticoid kinase (SGK). WNK1 induces a phosphorylation of SGK which in turn phosphorylates and inhibits a protein named Need4 that is known to re-

duce ENaC activity by promoting its endocytosis via a clathrin-dependent mechanism. Therefore, ENaC activity is enhanced. Interestingly, SGK is known to be a key kinase through which aldosterone achieves its effects upon distal nephron transport mechanisms. Finally, similar to WNK4, WNK1 also increases paracellular Cl⁻ fluxes, an effect that was associated with increased phosphorylation of claudin 4 (table 2).

WNKs Lie Upstream of Kinases Involved in the Regulation of Ion Transporters

Biochemical and functional analysis revealed that WNK kinases and the cation-coupled chloride cotransporter (SLC12 family) interact with each other and with another family of serine/threonine kinases known as SPAK and OSR1 that belong to the STE-20 family. On the one hand, Piechota et al. [28, 58] observed that some members of the SLC12 family, such as the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC3 and the basolateral isoform of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter, NKCC1, interact with SPAK in a 2-hybrid yeast system. They observed that these interactions occurred through an 'SPAK-binding domain' [RFx(V/I)] present in the cotransporter sequence. Simultaneously, it was demonstrated by Dowd and Forbush [59] that modulation of NKCC1 activity by intracellular chloride concentration involved the activity of this kinase. On the other hand, Vitari et al. [29] observed that immunoprecipitation of WNK1 or WNK4 brought SPAK as an interacting protein. In this study they observed in an *in vitro* phosphorylation assay using the amino-terminal domain of NKCC1 that the presence of WNK1, WNK4, SPAK or OSR1 alone was not enough to achieve NKCC1 phosphorylation. Only when WNK1 or WNK4 was added together with SPAK or OSR1, did NKCC1 become phosphorylated. This effect disappeared when catalytically inactive kinases were used. The conclusion of the study was that WNK1 or WNK4 is able to induce phosphorylation of NKCC1 only when SPAK or OSR1 is present. Similar observations were obtained by Moriguchi et al. [31] for NKCC1, and also for the apical isoform of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter, NKCC2, and for the NCC. These observations are supported by the observations of Gagnon et al. [7] at the functional level. These authors observed in *X. laevis* oocytes that injecting WNK4 cRNA had no effect upon the NKCC1 cotransporter, unless SPAK cRNA was added to the injecting cocktail. They observed that injecting cRNA of both kinases resulted in a significant activation of NKCC1. Interestingly, this interaction does not seem to be required for WNK4-induced inhibition of the K⁺-Cl⁻ cotransport-

ers [52]. Finally, detailed definitions of the interacting domains between WNK4 and SPAK were informed [30, 60]. Thus, it is currently believed that at least for some cotransporters, WNK1 or WNK4 lie upstream of SPAK/OSR1 kinases.

In vivo Mouse Models of PHAII

All the above observations regarding modulation of renal ion transport systems by WNKs were done in heterologous expression systems of either amphibian or mammalian origin. Thus, it was necessary to demonstrate that the proposed mechanisms by which PHAII-type mutations in WNKs produce the disease actually occur in an *in vivo* model. Regarding WNK1 the only study in which genetic manipulation of WNK1 has been performed is in the WNK1 knockout mice produced by Zambrowicz et al. [61]. Mice homozygous for WNK1 deletion died before day 13 of gestation, indicating that WNK1 is an important protein for embryogenesis. However, WNK1 heterozygous mice survived to adulthood and displayed a significant reduction in arterial blood pressure, indicating that WNK1 plays a key role in maintaining normal blood pressure.

Two groups have produced transgenic mice overexpressing WNK4 containing a PHAII-type mutation. First, Lalioti et al. [62] generated bacterial artificial chromosome transgenic mice overexpressing either wild-type WNK4 or a WNK4 gene containing one of the PHAII-type mutations (Q562E). Interesting observations were done in this study: when compared with control mice, PHAII-WNK4 transgenic mice were hypertensive, whereas wild-type WNK4 transgenic mice were hypotensive. When exposed to a low-K⁺ diet, PHAII-WNK4 transgenic mice were hyperkalemic (approx. 5.3 mM) and when exposed to a high-K⁺ diet, these animals developed a dramatic increase in serum K⁺ to values over 8.0 mM. In contrast, wild-type WNK4 transgenic mice were hypokalemic (approx. 3.7 mM). Furthermore, PHAII-WNK4 transgenic mice exhibited metabolic acidosis and were hypercalciuric. Within the histological analysis, the observations were more impressive: wild-type WNK4 transgenic mice exhibited a significant reduction in the number and size of DCTs. In contrast, PHAII-WNK4 transgenic mice exhibited a remarkable increase in the number and size of distal tubules, that is DCT hypertrophy and hyperplasia. Therefore, overexpression of PHAII-WNK4 recapitulated the PHAII phenotype, and interestingly, overexpression of wild-type WNK4 recapitulated a phenotype that is similar to Gitelman disease, in which NCC activity is absent. Finally, to find out to what extent the

effects of WNK4 were due to modulation of NCC activity, the PHAII-WNK4 transgenic mice were crossed with NCC knockout mice. The PHAII phenotype disappeared in the new colony. Renal histology was normal, with no changes in the DCT when compared with normal controls. Arterial blood pressure and all other parameters were corrected. Even the hyperkalemia during the high- K^+ diet was prevented, implicating NCC as a key protein, not only for the development of hypertension, but also for hyperkalemia. In the same study, treating PHAII-WNK4 transgenic mice with thiazides also corrected the phenotype. A second transgenic model that has been formed is a knockin of a PHAII mutation (D561A) that was introduced into the endogenous WNK4 locus [63]. In this study it was also observed that knockin mice reproduced the phenotype of the disease with hypertension, hyperkalemia and metabolic acidosis. At the molecular level it was shown that NCC, ENaC and BK K^+ channel expression was increased, with no change in WNK4 and the ROMK. Increased phosphorylation of SPAK/OSR1 was observed in the knockin mice supporting the hypothesis that WNK4 affects the activity of NCC by interacting with, and/or phosphorylation of, STE-20 kinases. In addition, it was also observed that PHAII-WNK4 induced phosphorylation of the NCC at serine 71 where it was previously shown that its phosphorylation was associated with the activity of the NCC [64]. These studies strongly suggest that, as predicted in the heterologous expression systems, wild-type WNK4 is a potent inhibitor of NCC, and PHAII-type mutations eliminate this WNK4 property releasing the NCC from a tonic inhibition by this kinase. However, the consequences of transgenic wild-type WNK4 or PHAII-type WNK4 upon transport systems such as the ROMK, ENaC or paracelin were not reported in detail, and thus, the WNK4 in vitro effects upon this transport system still need to be confirmed in vivo.

Implications of WNK4 for Renal Physiology

The effects of WNK4 upon renal transport systems shown in table 2 reveal that WNK4 exists in at least 3 different states of function. One is the wild-type WNK4 that inhibits NCC, ROMK and ENaC, with slight stimulation of paracellular Cl^- flux. One can think of this as an equilibrium state. A second clearly identified state is the one resulting from PHAII mutations. In this state, WNK4 no longer inhibits the NCC and ENaC resulting in increased activity of these pathways, and increased inhibition of the ROMK. Simultaneously, paracellular Cl^- flux is also enhanced. A third state involves the effect of WNK4 phos-

phorylation by SGK kinase. WNK4 contains a canonical SGK phosphorylation site at serine 1169. Ring et al. [65] first showed that WNK4 is phosphorylated at this site by SGK. Then they observed that mutation of S1169 for alanine, which eliminates the possibility that WNK4 becomes phosphorylated at this site, had no effect upon WNK4-induced inhibition of the ROMK or ENaC. In contrast, mutation of serine 1169 for aspartic acid (S1169D) that mimics the phosphorylation state of this serine resulted in a WNK4 kinase that lost the inhibitory effect upon the ENaC or ROMK, resulting in increased activity of these channels [65]. However, this mutation S1169D has no effect upon the WNK4-induced inhibition of the NCC [Gamba G., unpubl. observations]. The differential functional properties of WNK4 revealed by these different states, together with observations in PHAII patients and transgenic mice, place WNK4 as the potential kinase and the key molecular switch that explains how the kidney handles the effect of aldosterone as a salt-retaining and K^+ -losing hormone. In physiological conditions, losing fluid volume increases aldosterone levels, which in turn activates salt-retaining mechanisms, without affecting the normal urinary potassium excretion. This is achieved by activating the NCC, ENaC and paracellular Cl^- flux, without changing or even reducing the ROMK. As discussed above, WNK4 harboring a PHAII-type mutation mimics this situation. In contrast, another stimulus for aldosterone secretion is hyperkalemia. In this situation, aldosterone release is associated with increased K^+ excretion, without affecting salt retention. This is achieved by increasing ENaC and ROMK activity, without affecting the NCC. Thus, salt reabsorption is not increased in the DCT1 allowing enough sodium to be delivered to the DCT2 and CNT, in which the increased activity of the ENaC and ROMK promotes potassium secretion into the lumen (fig. 2).

Future Research for WNKs, Renal Ion Transport and Human Hypertension

Observations from PHAII patients, transgenic animals and in vitro transfection models together strongly suggest that WNKs and several ion transport systems in the kidney work together to maintain salt and potassium homeostasis and, as a consequence, arterial blood pressure homeostasis. Alterations in the activity of WNKs and/or transport systems are clearly associated with human diseases featuring arterial hypertension or hypotension [2]. One important area that is currently being stud-

ied is defining the role that WNKs can have upon the most common forms of hypertension, particularly since a considerable proportion of patients with essential hypertension exhibit low plasma renin activity, suggesting that increased blood pressure in these patients is due to salt retention. In this regard, the *WNK4* gene in chromosome 17 is just 1 Mb from the locus *DI7SI299* that has shown the strongest linkage with hypertension in the Framingham Heart Study population [66], and recent studies suggest the association of SNPs or variants of *PRKWINK1* or *PRKWINK4* with arterial hypertension [67, 68]. It is equally important to define drug development against WNK kinases. The facts that mice heterozygous

for *WNK1* deletion exhibit a significantly lower blood pressure than normal mice and that PHAII-*WNK4* transgenic or knockin mice are hypertensive suggest that drugs affecting the functional properties of *WNK1* or *WNK4* could play a potential role in the treatment of arterial hypertension.

Acknowledgments

The work performed in our laboratory has been possible thanks to the support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 59992) and National Institutes of Health grants DK-064635 to G.G.

References

- Guyton AC: Blood pressure control – special role of the kidneys and body fluids. *Science* 1991;252:1813–1816.
- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS: Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001;104:545–556.
- Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet FE, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ, Lifton RP: Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 1996;12:24–30.
- Lemmink HH, van den Heuvel LP, van Dijk HA, Merckx GF, Smilde TJ, Taschner PE, Monnens LA, Hebert SC, Knoers NV: Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families. *Pediatr Nephrol* 1996;10: 403–407.
- Mastroianni N, Bettinelli A, Bianchetti M, Colussi G, de Fusco M, Sereni F, Ballabio A, Casari G: Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1019–1026.
- Kunchaparty S, Palcso M, Berkman J, Zquez H, Desir GV, Bernstein P, Reilly RF, Ellison DH: Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol* 1999;277:F643–F649.
- De Jong JC, Van der Vliet WA, van den Heuvel LP, Willems PH, Knoers NV, Bindels RJ: Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter: evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1442–1448.
- Sabath E, Meade P, Berkman J, de los Heros P, Moreno E, Bobadilla NA, Vazquez N, Ellison DH, Gamba G: Pathophysiology of functional mutations of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in Gitelman disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287: F195–F203.
- Mayan H, Vered I, Mouallem M, Tzadok-Witkon M, Pauzner R, Farfel Z: Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3248–3254.
- Simon DB, Farfel Z, Ellison D, Bia M, Tucci J, Lifton RP: Examination of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a candidate gene in Gordon's syndrome. 1995, p 632.
- Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N, Lifton RP: Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31–42 and 17p11–q21. *Nat Genet* 1997;16:202–205.
- Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM, Fournier A, Corvol P, Jeunemaitre X: A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am J Hum Genet* 2000;67:302–310.
- Disse-Nicodeme S, Desitter I, Fiquet-Kempf B, Houot AM, Stern N, Delahousse M, Potier J, Ader JL, Jeunemaitre X: Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. *J Hypertens* 2001;19:1957–1964.
- Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH: *WNK1*, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 2000;275:16795–16801.
- Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP: Human hypertension caused by mutations in *WNK* kinases. *Science* 2001;293:1107–1112.
- Delaloy C, Lu J, Houot AM, Disse-Nicodeme S, Gasc JM, Corvol P, Jeunemaitre X: Multiple promoters in the *WNK1* gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. *Mol Cell Biol* 2003;23: 9208–9221.
- Golbang AP, Murthy M, Hamad A, Liu CH, Cope G, Hoff WV, Cuthbert A, O'Shaughnessy KM: A new kindred with pseudohypoaldosteronism type II and a novel mutation (564D→H) in the acidic motif of the *WNK4* gene. *Hypertension* 2005;46:295–300.
- Min X, Lee BH, Cobb MH, Goldsmith EJ: Crystal structure of the kinase domain of *WNK1*, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. *Structure (Camb)* 2004;12:1303–1311.
- Yang CL, Ellison DH: *WNK1* interacts physically with *WNK4*. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:77A.
- Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, Ellison DH: Mechanisms of *WNK1* and *WNK4* interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Clin Invest* 2005;115:1379–1387.
- Yang CL, Zhu X, Ellison DH: The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a *WNK* kinase signaling complex. *J Clin Invest* 2007;117:3403–3411.
- Xu BE, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ, Cobb MH: Regulation of *WNK1* by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. *J Biol Chem* 2002;277:48456–48462.

- 23 Xu BE, Stippec S, Lenertz L, Lee BH, Zhang W, Lee YK, Cobb MH: WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004;279:7826–7831.
- 24 Moniz S, Verissimo F, Matos P, Brazao R, Silva E, Kotevelets L, Chastre E, Gespach C, Jordan P: Protein kinase WNK2 inhibits cell proliferation by negatively modulating the activation of MEK1/ERK1/2. *Oncogene* 2007;26:6071–6081.
- 25 Lee BH, Chen W, Stippec S, Cobb MH: Biological cross-talk between WNK1 and the transforming growth factor beta-Smad signaling pathway. *J Biol Chem* 2007;282:17985–17996.
- 26 Lee BH, Min X, Heise CJ, Xu BE, Chen S, Shu H, Luby-Phelps K, Goldsmith EJ, Cobb MH: WNK1 phosphorylates synaptotagmin 2 and modulates its membrane binding. *Mol Cell* 2004;15:741–751.
- 27 Piechotta K, Lu J, Delpire E: Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 2002;277:50812–50819.
- 28 Gagnon KB, England R, Delpire E: Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C134–C142.
- 29 Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR: The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 2005;391:17–24.
- 30 Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, Karlsson HK, Alessi DR: Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem J* 2006;397:223–231.
- 31 Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H: WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 2005;280:42685–42693.
- 32 Choate KA, Kahle KT, Wilson FH, Nelson-Williams C, Lifton RP: WNK1, a kinase mutated in inherited hypertension with hyperkalemia, localizes to diverse Cl⁻-transporting epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:663–668.
- 33 Verissimo F, Jordan P: WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 2001;20:5562–5569.
- 34 O'Reilly M, Marshall E, Macgillivray T, Mittal M, Xue W, Kenyon CJ, Brown RW: Dietary electrolyte-driven responses in the renal WNK kinase pathway in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2402–2413.
- 35 Holden S, Cox J, Raymond FL: Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). *Gene* 2004;335:109–119.
- 36 Kahle KT, Rinehart J, de los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP: WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16783–16788.
- 37 Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS, Lifton RP: WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2064–2069.
- 38 O'Reilly M, Marshall E, Speirs HJ, Brown RW: WNK1, a gene within a novel blood pressure control pathway, tissue-specifically generates radically different isoforms with and without a kinase domain. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2447–2456.
- 39 Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyano-shita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC: Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2749–2753.
- 40 Brown DD: A tribute to the *Xenopus laevis* oocyte and egg. *J Biol Chem* 2004;279:45291–45299.
- 41 Gamba G: Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 2005;85:423–493.
- 42 Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G, Lifton RP: Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:680–684.
- 43 Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH: WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 2003;111:1039–1045.
- 44 Golbang AP, Cope G, Hamad A, Murthy M, Liu CH, Cuthbert AW, O'Shaughnessy KM: Regulation of the expression of the Na/Cl cotransporter (NCCT) by WNK4 and WNK1: evidence that accelerated dynamin-dependent endocytosis is not involved. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F1369–F1376.
- 45 Cai H, Cebotaru V, Wang YH, Zhang XM, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB: WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. *Kidney Int* 2006;69:2162–2170.
- 46 Kahle KT, Wilson FH, Lifton RP: Regulation of diverse ion transport pathways by WNK4 kinase: a novel molecular switch. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:98–103.
- 47 He G, Wang HR, Huang SK, Huang CL: Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1. *J Clin Invest* 2007;117:1078–1087.
- 48 Lazrak A, Liu Z, Huang CL: Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1615–1620.
- 49 Ring AM, Cheng SX, Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, Lalioti MD, Volkman HM, Wilson FH, Hebert SC, Lifton RP: WNK4 regulates activity of the epithelial Na⁺ channel in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:4020–4024.
- 50 Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, Suda S, Hayama A, Sasaki S, Uchida S: Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4690–4694.
- 51 Kahle KT, MacGregor GG, Wilson FH, Van Hoek AN, Brown D, Ardito T, Kashgarian M, Giebisch G, Hebert SC, Boulpaep EL, Lifton RP: Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14877–14882.
- 52 Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, Delpire E, Gamba G: WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1197–F1207.
- 53 Amorim JB, Bailey MA, Musa-Aziz R, Giebisch G, Malnic G: Role of luminal anion and pH in distal tubule potassium secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F381–F388.
- 54 Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ: Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl cotransporter KCC4. *Nature* 2002;416:874–878.
- 55 Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, Goldsmith EJ, Cobb MH: Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem* 2005;280:26653–26658.
- 56 Subramanya AR, Yang CL, Zhu X, Ellison DH: Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F619–F624.
- 57 Xu BE, Stippec S, Chu PY, Lazrak A, Li XJ, Lee BH, English JM, Ortega B, Huang CL, Cobb MH: WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:10315–10320.
- 58 Piechotta K, Garbarini N, England R, Delpire E: Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. *J Biol Chem* 2003;278:52848–52856.

- 59 Dowd BF, Forbush B: PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem* 2003;278:27347-27353.
- 60 Villa F, Goebel J, Rafiqi FH, Deak M, Thastrup J, Alessi DR, van Aalten DM: Structural insights into the recognition of substrates and activators by the OSR1 kinase. *EMBO Rep* 2007;8:839-845.
- 61 Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, Richter LJ, Piggott J, Beltrandel Rio H, Buxton EC, Edwards J, Finch RA, Friddle CJ, Gupta A, Hansen G, Hu Y, Huang W, Jaing C, Key BW Jr, Kipp P, Kohlhauff B, Ma ZQ, Markesich D, Payne R, Potter DG, Qian N, Shaw J, Schrick J, Shi ZZ, Sparks MJ, Van Sligtenhorst I, Vogel P, Walke W, Xu N, Zhu Q, Person C, Sands AT: Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14109-14114.
- 62 Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, Toka HR, Nelson-Williams C, Ellison DH, Flavell R, Booth CJ, Lu Y, Geller DS, Lifton RP: Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet* 2006;38:1124-1132.
- 63 Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin SH, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S: Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 2007;5:331-344.
- 64 Pacheco-Alvarez D, San Cristobal P, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Munoz E, Diaz A, Juarez ME, Gimenez I, Gamba G: The Na-Cl cotransporter is activated and phosphorylated at the amino terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 2006;281:28755-28763.
- 65 Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, Hebert SC, Lifton RP: An SGK1 site in WNK4 regulates Na⁺ channel and K⁺ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:4025-4029.
- 66 Levy D, De Stefano AL, Larson MG, O'Donnell CJ, Lifton RP, Gavras H, Cupples LA, Myers RH: Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17: genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2000;36:477-483.
- 67 Newhouse SJ, Wallace C, Dobson R, Mein C, Pembroke J, Farrall M, Clayton D, Brown M, Samani N, Dominiczak A, Connell JM, Webster J, Lathrop GM, Caulfield M, Munroe PB: Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension Study. *Hum Mol Genet* 2005;14:1805-1814.
- 68 Tobin MD, Raleigh SM, Newhouse S, Braund P, Bodycote C, Ogleby J, Cross D, Gracey J, Hayes S, Smith T, Ridge C, Caulfield M, Sheehan NA, Munroe PB, Burton PR, Samani NJ: Association of WNK1 gene polymorphisms and haplotypes with ambulatory blood pressure in the general population. *Circulation* 2005;112:3423-3429.

REFERENCIAS

1. **Adragna N C and Lauf P K.** Quinine and Quinidine inhibit and reveal heterogeneity of K-Cl cotransport in low K sheep erythrocytes. *J Membrane Biol* 142: 195-207, 1994.
2. **Adragna NC, Ferrell CM, Zhang J, Di Fulvio M, Temprana CF, Sharma A, Fyffe RE, Cool DR and Lauf PK.** Signal transduction mechanisms of K⁺-Cl⁻ cotransport regulation and relationship to disease. *Acta Physiol (Oxf)* 187: 125-139, 2006.
3. **Adragna NC, Fulvio MD and Lauf PK.** Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J Membr Biol* 201: 109-137, 2004.
4. **Adragna NC and Lauf PK.** Role of nitrite, a nitric oxide derivative, in K-Cl cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells. *J Membr Biol* 166: 157-167, 1998.
5. **Adragna NC, White RE, Orlov SN and Lauf PK.** K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C381-C390, 2000.
6. **Adragna NC, Yanfang C, Delpire E, Lauf PK and Morris M.** Hypertension in K-Cl cotransporter-3 knockout mice. In: Cell volume and signaling, edited by Lauf PK and Adra. New York: Springer, 2004, p. 379-386.
7. **Amlal H, Wang Z and Soleimani M.** Potassium depletion downregulates chloride-absorbing transporters in rat kidney. *J Clin invest* 101: 1045-1054, 1998.
8. **Amlal H, Paillard M and Bichara M.** Cl⁻-dependent NH₄⁺ transport mechanisms in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol* 267: C1607-C1615, 1994.
9. **Amorim JB, Bailey MA, Musa-Aziz R, Giebisch G and Malnic G.** Role of luminal anion and pH in distal tubule potassium secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F381-F388, 2003.
10. **Bauer J and Lauf PK.** Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: III. Differential reactivity of membrane SH groups with N-ethylmaleimide and iodoacetamide. *J Membr Biol* 73: 257-261, 1983.

11. **Becker M, Nothwang HG and Friauf E.** Differential expression pattern of chloride transporters NCC, NKCC2, KCC1, KCC3, KCC4, and AE3 in the developing rat auditory brainstem. *Cell Tissue Res* 312: 155-165, 2003.
12. **Bergeron MJ, Gagnon E, Wallendorff B, Lapointe JY and Isenring P.** Ammonium transport and pH regulation by K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F68-F78, 2003.
13. **Bialojan C and Takai A.** Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256: 283-290, 1988.
14. **Bize I, Güvenç B, Robb A, Buchbinder G and Brugnara C.** Serine/threonine protein phosphatases and regulation of K-Cl cotransport in human erythrocytes. *Am J Physiol* 277: C926-C936, 1999.
15. **Bize I, Munoz P, Canessa M and Dunham PB.** Stimulation of membrane serine-threonine phosphatase in erythrocytes by hydrogen peroxide and staurosporine. *Am J Physiol* 274: C440-C446, 1998.
16. **Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX and Jentsch TJ.** Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co- transporter Kcc4. *Nature* 416: 874-878, 2002.
17. **Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, Faulhaber J, Ehmke H, Pfeffer C, Scheel O, Lemcke B, Horst J, Leuwer R, Pape HC, Volkl H, Hubner CA and Jentsch TJ.** Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J* 22: 5422-5434, 2003.
18. **Brown-Borg HM, Zhang FP, Huhtaniemi I and Bartke A.** Developmental aspects of prolactin receptor gene expression in fetal and neonatal mice. *Eur J Endocrinol* 134: 751-757, 1996.
19. **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr. and Roccella EJ.** The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 289: 2560-2571, 2003.
20. **Clayton GH, Owens GC, Wolff JS and Smith RL.** Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. *Brain Res Dev Brain Res* 109: 281-292, 1998.

21. **Cope G, Golbang A and O'Shaughnessy KM.** WNK kinases and the control of blood pressure. *Pharmacol Ther* 106: 221-231, 2005.
22. **Cossins AR and Gibson JS.** Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells. *J Exp Biol* 200 (Pt 2): 343-352, 1997.
23. **De Los Heros P., Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, Mount DB, Lifton RP, Hebert SC and Gamba G.** WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1976-1981, 2006.
24. **Delpire E and Lauf P K.** Kinetics of DIDS inhibition of swelling-activated K-Cl cotransport in low K shepp erythrocytes. *J Membrane Biol* 126: 89-96, 1992.
25. **Delpire E.** Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15: 309-312, 2000.
26. **Delpire E and Gagnon KB.** SPAK and OSR1, key kinases involved in the regulation of chloride transport. *Acta Physiol (Oxf)* 187: 103-113, 2006.
27. **Delpire E and Gagnon KB.** Genome-wide analysis of SPAK/OSR1 binding motifs. *Physiol Genomics* 28: 223-231, 2007.
28. **Demir E, Irobi J, Erdem S, Demirci M, Tan E, Timmerman V, De Jonghe P and Topaloglu H.** Andermann syndrome in a Turkish patient. *J Child Neurol* 18: 76-79, 2003.
29. **Di Stefano A, Jounier S and Wittner M.** Evidence supporting a role for KCl cotransporter in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int* 60: 1809-1823, 2001.
30. **Disse-Nicodeme S, Desitter I, Fiquet-Kempf B, Houot AM, Stern N, Delahousse M, Potier J, Ader JL and Jeunemaitre X.** Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. *J Hypertens* 19: 1957-1964, 2001.
31. **Dowd BF and Forbush B.** PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem* 278: 27347-27353, 2003.

32. **Duhm J and Becker B F.** Studies of lithium transport across the red cell membrane. *J Membrane Biol* 51: 263-286, 1979.
33. **Dunham PB and Ellory JC.** Passive potassium transport in low potassium sheep red cells: dependence upon cell volume and chloride. *J Physiol* 318: 511-530, 1981.
34. **Dupre N, Howard HC, Mathieu J, Karpati G, Vanasse M, Bouchard JP, Carpenter S and Rouleau GA.** Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol* 54: 9-18, 2003.
35. **Ehringer MA, Thompson J, Conroy O, Xu Y, Yang F, Canniff J, Beeson M, Gordon L, Bennett B, Johnson TE and Sikela JM.** High-throughput sequence identification of gene coding variants within alcohol-related QTLs. *Mamm Genome* 12: 657-663, 2001.
36. **Ellison DH, Velazquez H and Wright FS.** Stimulation of distal potassium secretion by low lumen chloride in the presence of barium. *Am J Physiol* 248: F638-F649, 1985.
37. **Flatman PW.** Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1566: 140-151, 2002.
38. **Gagnon E, Bergeron MJ, Daigle ND, Lefoll MH and Isenring P.** Molecular Mechanisms of Cation Transport by the Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporter: STRUCTURAL INSIGHT INTO THE OPERATING CHARACTERISTICS OF THE ION TRANSPORT SITES. *J Biol Chem* 280: 32555-32563, 2005.
39. **Gagnon KB, England R and Delpire E.** Characterization of SPAK and OSR1, Regulatory Kinases of the Na-K-2Cl Cotransporter. *Mol Cell Biol* 26: 689-698, 2006.
40. **Gagnon KB, England R and Delpire E.** Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C134-C142, 2006.
41. **Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA and Hebert SC.** Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722, 1994.

42. **Gamba G.** Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423-493, 2005.
43. **Gamba G.** Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F245-F252, 2005.
44. **Gamba G.** WNK lies upstream of kinases involved in regulation of ion transporters. *Biochem J* 391: e1-e3, 2005.
45. **Garay R P, Nazaret C, Hannaert P A and Gragoe Jr.E J.** Demonstration of a $[K^+, Cl^-]$ -cotransport system in human red cells by its sensitivity to [(Dihydroindenyl)oxy]alkanoic acids: regulation of cell swelling and distinction from the bumetanide-sensitive $[Na^+, K^+, Cl^-]$ -cotransport system. *Mol Pharmacol* 33: 696-701, 1988.
46. **Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, Delpire E and Gamba G.** WNK4 Kinase is a Negative Regulator of K^+ - Cl^- Cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1197-F1207, 2007.
47. **Gibson JS, Speake PF, Muzyamba MC, Husain F, Luckas MC and Ellory JC.** $K(+)$ transport in red blood cells from human umbilical cord. *Biochim Biophys Acta* 1512: 231-238, 2001.
48. **Gillen C M, Brill S, Payne J A and Forbush III B.** Molecular cloning and functional expression of the K - Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271: 16237-16244, 1996.
49. **Gimenez I, Isenring P and Forbush B, III.** Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na - K - Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions. *J Biol Chem* 277: 8767-8770, 2002.
50. **Gordon RD.** Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension* 8: 93-102, 1986.
51. **Gordon RD and Hodsman GP.** The syndrome of hypertension and hyperkalaemia without renal failure: long term correction by thiazide diuretic. *Scott Med J* 31: 43-44, 1986.

52. **Greger R and Schlatter E.** Properties of the basolateral membrane on the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflügers Arch* 396: 325-334, 1983.
53. **Greger R, Schlatter E and Lang F.** Evidence for electroneutral sodium chloride cotransport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch* 396: 308-314, 1983.
54. **Gusev GP, Agalakova NI and Lapin AV.** Potassium transport in red blood cells of frog *Rana temporaria*: demonstration of a K-Cl cotransport. *J Comp Physiol [B]* 165: 230-237, 1995.
55. **Haas M and Forbush B, III.** The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol* 62: 515-534, 2000.
56. **Hebert SC, Desir G, Giebisch G and Wang W.** Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 85: 319-371, 2005.
57. **Hiki K, D'Andrea R J, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland G R, Vadas M A and Gamble J R.** Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 274: 10661-10667, 1999.
58. **Holden S, Cox J and Raymond FL.** Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWINK3). *Gene* 335: 109-119, 2004.
59. **Holtzman E J, Kumar S, Faaland C A, Warner F, Louge P J, Erickson S J, Ricken G, Waldman J and Dunham P B.** Cloning, characterization, and gene organization of K-Cl cotransporter from pig and human kidney and *C. elegans*. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 275: F550-F564, 1998.
60. **Howard HC, Dube MP, Prevost C, Bouchard JP, Mathieu J and Rouleau GA.** Fine mapping the candidate region for peripheral neuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in the French Canadian population. *Eur J Hum Genet* 10: 406-412, 2002.
61. **Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K and Jentsch TJ.** Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30: 515-524, 2001.
62. **Isenring P, Jacoby S C and Forbush III B.** The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7179-7184, 1998.

63. **Jarolimek W, Lewen A and Misgeld U.** A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons. *J Neurosci* 19: 4695-4704, 1999.
64. **Jennings ML.** Volume-sensitive K⁽⁺⁾/Cl⁽⁻⁾ Cotransport in Rabbit Erythrocytes. Analysis of the rate-limiting activation and inactivation events. *J Gen Physiol* 114: 743-758, 1999.
65. **Jennings ML and al Rohil N.** Kinetics of activation and inactivation of swelling-stimulated K⁺/Cl⁻ transport. The volume-sensitive parameter is the rate constant for inactivation. *J Gen Physiol* 95: 1021-1040, 1990.
66. **Jennings ML and Schulz RK.** Okadaic acid inhibition of KCl cotransport. Evidence that protein dephosphorylation is necessary for activation of transport by either cell swelling or N-ethylmaleimide. *J Gen Physiol* 97: 799-817, 1991.
67. **Jensen F.** Regulatory volume decrease in carp red blood cells: mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated potassium and amino acid transport. *J Exp Biol* 198: 155-165, 1995.
68. **Jentsch TJ.** Chloride transport in the kidney: lessons from human disease and knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 16: 1549-1561, 2005.
69. **Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS and Lifton RP.** WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2064-2069, 2004.
70. **Kahle KT, MacGregor GG, Wilson FH, Van Hoek AN, Brown D, Ardito T, Kashgarian M, Giebisch G, Hebert SC, Boulpaep EL and Lifton RP.** Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: Insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14877-14882, 2004.
71. **Kahle KT, Rinehart J, De Los HP, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I and Lifton RP.** WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16783-16788, 2005.

72. **Kahle KT, Rinehart J, Ring A, Gimenez I, Gamba G, Hebert SC and Lifton RP.** WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda)* 21: 326-335, 2006.
73. **Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC and Lifton RP.** WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. *Nat Genet* 35: 372-376, 2003.
74. **Kahle KT, Wilson FH and Lifton RP.** Regulation of diverse ion transport pathways by WNK4 kinase: a novel molecular switch. *Trends Endocrinol Metab* 16: 98-103, 2005.
75. **Kaji D M and Tsukitani Y.** Role of protein phosphatase in activation of KCl cotransport in human erythrocytes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 260: C178-C182, 1991.
76. **Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A and Sato K.** The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104: 933-946, 2001.
77. **Karadsheh MF, Byun N, Mount DB and Delpire E.** Localization of the kcc4 potassium-chloride cotransporter in the nervous system. *Neuroscience* 123: 381-391, 2004.
78. **Karadsheh MF and Delpire E.** Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons. *J Neurophysiol* 85: 995-997, 2001.
79. **Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, Toka HR, Nelson-Williams C, Ellison DH, Flavell R, Booth CJ, Lu Y, Geller DS and Lifton RP.** Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet* 38: 1124-1132, 2006.
80. **Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M,**

Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la BM, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A and Morgan MJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.

81. **Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E and Haussinger D.** Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78: 247-306, 1998.
82. **Lauf PK.** Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: I. Dependence on chloride and external ions. *J Membr Biol* 73: 237-246, 1983.
83. **Lauf PK.** Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: IV. Furosemide inhibition as a function of external Rb⁺, Na⁺, and Cl⁻. *J Membr Biol* 77: 57-62, 1984.
84. **Lauf PK.** Foreign anions modulate volume set point of sheep erythrocyte K-Cl cotransport. *Am J Physiol* 260: C503-C512, 1991.

85. **Lauf PK and Adragna NC.** K-Cl Cotransport: Properties and Molecular Mechanism. *Cell Physiol Biochem* 10: 341-354, 2000.
86. **Lauf PK and Theg BE.** A chloride dependent K⁺ flux induced by N-ethylmaleimide in genetically low K⁺ sheep and goat erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 92: 1422-1428, 1980.
87. **Lauf PK, Zhang J, Delpire E, Fyffe RE, Mount DB and Adragna NC.** K-Cl co-transport: immunocytochemical and functional evidence for more than one KCC isoform in high K and low K sheep erythrocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130: 499-509, 2001.
88. **Lazrak A, Liu Z and Huang CL.** Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006.
89. **Lemmink HH, van den Heuvel LP, van Dijk HA, Merx GF, Smilde TJ, Taschner PE, Monnens LA, Hebert SC and Knoers NV.** Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families. *Pediatr Nephrol* 10: 403-407, 1996.
90. **Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, Goldsmith EJ and Cobb MH.** Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem* 280: 26653-26658, 2005.
91. **Liapis H, Nag M and Kaji DM.** K-Cl cotransporter expression in the human kidney. *Am J Physiol* 275: C1432-C1437, 1998.
92. **Lu J, Karadsheh M and Delpire E.** Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 39: 558-568, 1999.
93. **Lytle C.** Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and calyculin-A involves phosphorylation at common sites. *J Biol Chem* 272: 15069-15077, 1997.
94. **Lytle C.** A volume sensitive protein kinase regulates the Na-K-2Cl cotransporter in duck red blood cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 274: C1002-C1010, 1998.
95. **Lytle C and McManus T.** Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1422-C1431, 2002.

96. **Lytle C, McManus TJ and Haas M.** A model of Na-K-2Cl cotransport based on ordered ion binding and glide symmetry. *Am J Physiol* 274: C299-C309, 1998.
97. **Mansfield TA, Simon D B, Farfel Z, Bia M, Tucci J R, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis M A, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N and Lifton R P.** Multilocus linkage of familial hiperkalemia and hypertension, pseudohypoaldosternism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nature Genetics* 16: 202-205, 1997.
98. **Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N and Lifton RP.** Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet* 16: 202-205, 1997.
99. **Mastroianni N, Bettinelli A, Bianchetti M, Colussi G, de Fusco M, Sereni F, Ballabio A and Casari G.** Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome. *Am J Hum Genet* 59: 1019-1026, 1996.
100. **Meade P, Sabath E and Gamba G.** Fisiopatología molecular del síndrome de Bartter. *Rev Invest Clin* 55: 74-83, 2003.
101. Mercado, A., Mount, D. B., Cortes, R., Vazquez, N., and Gamba, G. Functional characterization of two alternative isoforms of the KCC3 K-Cl cotransporter. *FASEB J* 16, A58. 2002.

Ref Type: Abstract

102. **Mercado A, Mount DB and Gamba G.** Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res* 29: 17-25, 2004.
103. **Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB and Gamba G.** Functional Comparison of the K⁺-Cl⁻ Cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem* 275: 30326-30334, 2000.
104. **Mercado A, Vazquez N, Song L, Cortes R, Enck AH, Welch R, Delpire E, Gamba G and Mount DB.** Amino-Terminal Heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ Cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1246-F1261, 2005.
105. **Mikawa S, Wang C, Shu F, Wang T, Fukuda A and Sato K.** Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 136: 93-100, 2002.

106. **Monroy A, Plata C, Hebert SC and Gamba G.** Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F161-F169, 2000.
107. **Moreno E, Tovar-Palacio C, De Los HP, Guzman B, Bobadilla NA, Vazquez N, Riccardi D, Poch E and Gamba G.** 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* 279: 16553-16560, 2004.
108. **Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K and Shibuya H.** WNK1 Regulates Phosphorylation of Cation-Chloride-coupled Cotransporters via the STE20-related Kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 280: 42685-42693, 2005.
109. **Mount D B, Mercado A, Song L, Xu J, George Jr. A L, Delpire E and Gamba G.** Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16355-16362, 1999.
110. **Mount DB and Gamba G.** Renal potassium-chloride cotransporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 685-691, 2001.
111. **Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA and Koller BH.** Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na(+)-K(+)- 2Cl(-) cotransporter. *J Clin Invest* 105: 441-450, 2000.
112. **Pacheco-Alvarez D, San Cristobal P, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Munoz E, Diaz A, Juarez ME, Gimenez I and Gamba G.** The Na-Cl cotransporter is activated and phosphorylated at the amino terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 281: 28755-28763, 2006.
113. **Payne J A.** Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 273: C1516-C1525, 1997.
114. **Payne J A, Stevenson T J and Donaldson L F.** Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271: 16245-16252, 1996.
115. **Payne JA, Rivera C, Voipio J and Kaila K.** Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26: 199-206, 2003.

116. **Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K and Cobb MH.** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183, 2001.
117. **Pearson MM, Lu J, Mount DB and Delpire E.** Localization of the K(+)-Cl(-) cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience* 103: 481-491, 2001.
118. **Pellegrino CM, Rybicki AC, Musto S, Nagel RL and Schwartz RS.** Molecular identification and expression of erythroid K:Cl cotransporter in human and mouse erythroleukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 24: 31-40, 1998.
119. **Perry PB and O'Neill WC.** Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am J Physiol* 265: C763-C769, 1993.
120. **Piechotta K, Garbarini N, England R and Delpire E.** Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. *J Biol Chem* 278: 52848-52856, 2003.
121. **Piechotta K, Lu J and Delpire E.** Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 277: 50812-50819, 2002.
122. **Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC and Gamba G.** Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms. *J Biol Chem* 277: 11004-11012, 2002.
123. **Plotkin M D, Kaplan M R, Peterson L N, Gullans S R, Hebert S C and Delpire E.** Expression of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter BSC2 in the nervous system. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 272: C173-C183, 1997.
124. **Plotkin M D, Snyder E Y, Hebert S C and Delpire E.** Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 33: 781-795, 1997.
125. **Race JE, Makhlof FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB and Holtzman EJ.** Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol* 277: C1210-C1219, 1999.

126. **Rinehart J, Kahle KT, De Los HP, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G and Lifton RP.** WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16777-16782, 2005.
127. **Rivera C, Voipio J, Payne J A, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M and Kaila K.** The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397: 251-255, 1999.
128. **Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K and Saarma M.** BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol* 159: 747-752, 2002.
129. **Roussa E, Shmukler BE, Wilhelm S, Casula S, Stuart-Tilley AK, Thevenod F and Alper SL.** Immunolocalization of potassium-chloride cotransporter polypeptides in rat exocrine glands. *Histochem Cell Biol* 117: 335-344, 2002.
130. **Russell JM.** Sodium-Potassium-Chloride Cotransport. *Physiol Rev* 80: 211-276, 2000.
131. **Sangan P, Brill SR, Sangan S, Forbush B, III and Binder HJ.** Basolateral K-Cl cotransporter regulates colonic potassium absorption in potassium depletion. *J Biol Chem* 275: 30813-30816, 2000.
132. **Schoenherr CJ, Paquette AJ and Anderson DJ.** Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9881-9886, 1996.
133. **Shen MR, Chou CY, Hsu KF, Hsu YM, Chiu WT, Tang MJ, Alper SL and Ellory JC.** KCl Cotransport Is an Important Modulator of Human Cervical Cancer Growth and Invasion. *J Biol Chem* 278: 39941-39950, 2003.
134. **Shen MR, Chou CY, Hsu KF, Liu HS, Dunham PB, Holtzman EJ and Ellory JC.** The KCl cotransporter isoform KCC3 can play an important role in cell growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14714-14719, 2001.
135. **Sheng S, Li J, McNulty KA, Avery D and Kleyman TR.** Characterization of the selectivity filter of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 275: 8572-8581, 2000.

136. **Simon D B, Karet F E, Hamdan J M, Di Pietro A, Sanjad S A and Lifton R P.** Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics* 13: 183-188, 1996.
137. **Simon D B, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet F E, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner H M, Koolen M, Gainza F J, Gitelman H J and Lifton R P.** Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 12: 24-30, 1996.
138. **Song L, Mercado A, Vazquez N, Xie Q, Desai R, George AL, Gamba G and Mount DB.** Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res* 103: 91-105, 2002.
139. **Starke LC and Jennings ML.** K-Cl cotransport in rabbit red cells: further evidence for regulation by protein phosphatase type 1. *Am J Physiol* 264: C118-C124, 1993.
140. **Strange K, Denton J and Nehrke K.** Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology (Bethesda)* 21: 61-68, 2006.
141. **Strange K, Singer TD, Morrison R and Delpire E.** Dependence of KCC2 K-Cl cotransporter activity on a conserved carboxy terminus tyrosine residue. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C860-C867, 2000.
142. **Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalón DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ and Marra MA.** Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16899-16903, 2002.

143. **Su W, Shmukler BE, Chernova MN, Stuart-Tilley AK, de Franceschi L, Brugnara C and Alper SL.** Mouse K-Cl cotransporter KCC1: cloning, mapping, pathological expression, and functional regulation. *Am J Physiol* 277: C899-C912, 1999.
144. **Subramanya AR, Yang CL, Zhu X and Ellison DH.** Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F619-F624, 2006.
145. **Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM and Delpire E.** Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci* 20: 7531-7538, 2000.
146. **Ushiro H, Tsutsumi T, Suzuki K, Kayahara T and Nakano K.** Molecular cloning and characterization of a novel Ste20-related protein kinase enriched in neurons and transporting epithelia. *Arch Biochem Biophys* 355: 233-240, 1998.
147. **Velazquez H, Ellison D H and Wright F S.** Luminal influences on potassium secretion: chloride, sodium and thiazide diuretics. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 262: F1076-F1082, 1992.
148. **Velazquez H and Silva T.** Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: expression in distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F49-F58, 2003.
149. **Verissimo F and Jordan P.** WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20: 5562-5569, 2001.
150. **Vitari AC, Deak M, Morrice NA and Alessi DR.** The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391: 17-24, 2005.
151. **Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, Karlsson HK and Alessi DR.** Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem J* 397: 223-231, 2006.
152. **Vu TQ, Payne JA and Copenhagen DR.** Localization and developmental expression patterns of the neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina. *J Neurosci* 20: 1414-1423, 2000.

153. **Wang Z, Yang CL and Ellison DH.** Comparison of WNK4 and WNK1 kinase and inhibiting activities. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 939-944, 2004.
154. **Weil-Maslansky E, Gutman Y and Sasson S.** Insulin activates furosemide-sensitive K⁺ and Cl⁻ uptake system in BC3H1 cells. *Am J Physiol* 267: C932-C939, 1994.
155. **Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X and Lifton RP.** Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112, 2001.
156. **Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G and Lifton RP.** Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 680-684, 2003.
157. **Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, Deutch AY, Lovinger DM and Delpire E.** Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* 12: 258-268, 2002.
158. **Xu J-C, Lytle C, Zhu T T, Payne J A, Benz Jr.E and Forbush III B.** Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2201-2205, 1994.
159. **Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ and Cobb MH.** WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275: 16795-16801, 2000.
160. **Xu BE, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ and Cobb MH.** Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. *J Biol Chem* 277: 48456-48462, 2002.
161. **Yan GX, Chen J, Yamada KA, Kleber AG and Corr PB.** Contribution of shrinkage of extracellular space to extracellular K⁺ accumulation in myocardial ischaemia of the rabbit. *J Physiol (Lond)* 490 (Pt 1): 215-228, 1996.
162. **Yang CL, Angell J, Mitchell R and Ellison DH.** WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 111: 1039-1045, 2003.

163. **Yang CL and Ellison DH.** WNK1 interacts physically with WNK4. *J Am Soc Nephrol* 14: 77A, 2003.

164. **Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR and Ellison DH.** Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Clin Invest* 115: 1379-1387, 2005.