



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

**PAPEL DE LA REGIÓN TRANSMEMBRANAL 11
EN LA AFINIDAD POR TIAZIDAS
DEL COTRANSPORTADOR RENAL DE NaCl (NCC)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA
EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA PRESENTA:

MARIA CASTAÑEDA BUENO

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO GAMBA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**PAPEL DE LA REGIÓN TRANSMEMBRANAL 11 EN LA AFINIDAD POR
TIAZIDAS DEL COTRANSPORTADOR RENAL DE NaCl (NCC)**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gerardo Gamba, 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 Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Gamba, por sus valiosas enseñanzas, por su asesoría, apoyo y amistad.

A la Q.F.B. Norma Vázquez, por su ayuda invaluable para la realización de este trabajo, su apoyo constante y su amistad.

A la Dra. Norma Bobadilla, por sus comentarios y sugerencias durante los seminarios y por sus enseñanzas.

A todos mis compañeros del laboratorio, por su amistad, ayuda y apoyo: Diana Pacheco, José Ponce, Consuelo Plata, Paola de los Heros, Aída Venado, Lilia Martínez, Penélope Ortal, Juan Pablo Arroyo, Rocío Acuña, y ZeSergio Melo. A los vecinos, Joyce Trujillo, Victoria Ramírez, Juan Garzón, Rafael Valdés, Jonatan Barrera, César Cortés, Katy Sánchez, Rosalba Pérez y Cristino Cruz.

Y, en especial, a los que participaron de cerca en este proyecto, Erika Moreno, Erika Rodríguez Lobato y Damián Hernández.

Al jurado del Examen de Licenciatura, por el tiempo que dedicaron en la revisión de mi tesis, por sus comentarios y sugerencias:

Presidente:	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Secretario:	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Vocal:	Dr. León David Islas Suárez
Suplente:	Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Suplente:	Dr. Armando Tovar Palacio

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis papás y hermano, por sus consejos y enseñanzas que fueron muy importantes para que pudiera llegar hasta aquí, pero sobre todo por su cariño y su apoyo incondicional.

INDICE

I.	RESUMEN	2
II.	INTRODUCCIÓN	4
	II.1 Cotransportadores de membrana	4
	II.2 El riñón y el manejo de renal de NaC	16
	II.3 Fisiología de la reabsorción en el túbulo contorneado distal	10
	II.4 Clonación de NCC	12
	II.5 Expresión	14
	II.6 Familia SLC12	15
	II.7 Estructura del NCC: Topología y formación de dímeros	17
	II.8 Caracterización funcional de NCCr y NCCfl	20
	II.9 Diuréticos tipo tiazida	25
	II.10 Trabajos previos de estructura-función en NCC	31
	II.11 Trabajos de estructura función en otros cotransportadores de la familia	37
III.	OBJETIVOS	39
	III.1 Objetivo general	
	III.2 Objetivos específicos	
IV.	HIPÓTESIS	39
V.	METODOLOGÍA	40
	V.1 Identificación de residuos potenciales y construcción de mutantes	40
	V.2 Experimentos de expresión funcional	41
	V.3 Ensayos de Western blot	43
VI.	RESULTADOS	44
	VI.1 Alineamiento y diseño de mutantes TM	44
	VI.2 Caracterización funcional	45
	VI.3 Diseño y construcción de mutantes individuales	48
	VI.4 Caracterización funcional	49
	VI.5 Construcción y caracterización de la mutante C576S en NCCfl	50
	VI.6 Análisis de actividad basal y expresión proteica de las mutantes	51
VII.	DISCUSIÓN	54
VIII.	CONCLUSIONES	63
IX.	BIBLIOGRAFÍA	64

I. RESUMEN

Los diuréticos tipo tiazida son de los fármacos más prescritos a nivel mundial ya que constituyen el tratamiento de primera línea para el manejo de la hipertensión arterial. Sin embargo, se sabe poco sobre los residuos o dominios de unión del fármaco a su proteína blanco, el cotransportador renal de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (NCC), el cual se expresa en la membrana apical del túbulo contorneado distal de la nefrona. Previamente se ha demostrado en el laboratorio que los cotransportadores NCC de lenguado (NCCfl) y rata (NCCr) exhiben diferentes afinidades para las tiazidas, con IC_{50} respectivos de 4 μM y 0.4 μM (64), (91) y que las regiones transmembranales (TM) 8 a 12 contienen la información que determina esta diferencia (66).

El objetivo de este trabajo fue identificar los aminoácidos en las regiones TM 8-12 responsables de la diferencia en afinidad por tiazidas entre NCCr y NCCfl. El alineamiento entre distintos NCC de mamífero y NCCfl reveló que en las regiones TM 8-12 existen solo 6 residuos conservados en mamífero, que son diferentes en NCCfl: dos en TM9, tres en TM11 y uno en TM12. Por lo tanto, se diseñaron tres mutantes de NCCr que contienen, cada una, un segmento transmembranal tipo NCCfl: la TM9 con las mutaciones A510T y A516C, la TM11 con A568S, I574C, S575C, y la TM12 con la mutación V601T. Estas se construyeron mediante mutagénesis puntual y todas las clonas obtenidas fueron secuenciadas. Se utilizaron ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema heterólogo de expresión funcional. Éstos se inyectaron con RNAc de NCCr silvestre o mutante y la actividad del transportador se determinó mediante la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de concentraciones crecientes de tiazida, de Na^+ o Cl^- para determinar las afinidades respectivas.

Observamos que el IC_{50} para las mutantes TM9 y TM12 es similar al de NCCr silvestre (0.2-0.4 μM), mientras que el de la mutante TM11 es similar al de NCCfl (~0.4 μM). Las afinidades por los sustratos de transporte, Cl^- y Na^+ , no se vieron alteradas.

Se construyeron entonces tres nuevas mutantes para determinar cual o cuales de los 3 aminoácidos mutados en TM11 son necesarios para generar este cambio en la afinidad: una doble mutante (DM) con las mutaciones I574C y S575C, y dos mutantes sencillas, la I574C y la S575C. Se observó que la presencia de la mutación I574C es suficiente para conferir una afinidad tipo NCCfl, ya que tanto la DM como la mutante S575C presentan una afinidad similar a la de la mutante TM11 y a la de NCCfl.

Finalmente se observó que las mutantes TM11, DM y S575C tienen una actividad basal mayor a la del cotransportador silvestre, mientras que la mutante I574C presenta una actividad ligeramente menor. Se determinó la cantidad de proteína expresada mediante western blot y se observó una cantidad similar de proteína para todas las clonas inyectadas.

Concluimos que sólo un aminoácido de la región TM 11, la serina 575 en NCCr, cisteína en NCCfl, es responsable de la diferencia de afinidad por tiazidas entre NCC de mamífero y de pez. Este hallazgo podría conducirnos a determinar el sitio de unión de las tiazidas al NCC. Además, este aminoácido también podría ser responsable, al menos en parte, de las diferencias en los niveles de actividad entre NCCr y NCCfl, ya que típicamente NCCfl presenta una mayor actividad. Esta es la primera sustitución encontrada en NCC que produce una ganancia de función. Dado que la actividad de NCC en túbulo contorneado distal se ha relacionado con la regulación de la presión arterial, un aumento en la función de éste debido a dicha mutación podría representar una causa de hipertensión.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Cotransportadores de membrana

Las membranas celulares son las principales barreras encargadas de la compartimentalización de los organismos vivos en prácticamente todos los niveles. Esta compartimentalización es vital para el funcionamiento adecuado de cualquier proceso fisiológico o celular, ya que estos procesos dependen del mantenimiento de un ambiente con características muy específicas. La generación de dichos ambientes se logra mediante la regulación del transporte de sustancias a través de estas barreras hacia espacios específicos. Debido al carácter hidrofóbico de las membranas, las sustancias no polares y sin carga son capaces de atravesar con diferentes grados de libertad estas membranas, por lo que su localización no está regulada de esta forma. Sin embargo, para las moléculas polares, impermeables en las membranas celulares, existen diferentes tipos de mecanismos de transporte cuya actividad es regulada y que además puede ser específica para ciertos compartimentos celulares. Los mediadores de dichos mecanismos de transporte generalmente son proteínas que atraviesan la membrana celular y que generan un paso hidrofílico a través de ésta. El movimiento de sustancias a través de las membranas, como cualquier otro proceso, siempre obedece a las leyes termodinámicas, por lo que para que se lleve a cabo es necesario que éste implique un cambio energéticamente favorable, es decir, que el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) del proceso sea negativo. En el caso del movimiento de moléculas entre compartimentos, un evento energéticamente favorable implicaría el movimiento de éstas del compartimento de mayor al de menor concentración de moléculas, lo cual estaría favorecido por un aumento en la entropía (o del grado de desorden) del sistema. El potencial químico es una medida de la fuerza disponible para el movimiento neto de moléculas de un compartimento a otro y esta fuerza está determinada por el gradiente de concentración que existe entre ellos. Además del gradiente de concentración hay otro factor que puede influir en el movimiento cuando se trata con moléculas cargadas: el voltaje transmembranal (V_m), que se opone a cualquier movimiento de moléculas que generen un aumento en el V_m y favorece los movimientos que disminuyan el V_m . A este factor se le llama potencial eléctrico, y actúa en conjunto con el potencial químico para determinar la dirección del movimiento neto de moléculas. Ambas fuerzas se engloban frecuentemente bajo el término de “potencial electroquímico” o “gradiente electroquímico.”

Los diferentes mecanismos de transporte se clasifican de acuerdo a la fuente de energía que impulsa el transporte a través de ellos. Existen proteínas membranales que actúan únicamente permitiendo el paso de moléculas, impermeables en la bicapa lipídica, a favor de su gradiente

electroquímico (que en este caso constituye la fuente de energía para el transporte). A este tipo de transporte se le llama transporte pasivo o difusión facilitada e incluye a canales, poros y uniportadores. Los primeros generalmente median la entrada o salida de iones de la célula y son proteínas que generan un poro en la membrana mediante el cual los iones pueden pasar libremente. Proteínas similares, pero que median la entrada de otro tipo de sustancias que no son iones, por ejemplo de agua, se denominan poros. En el caso de los canales el paso puede estar regulado mediante la apertura o cierre de una compuerta en la entrada del poro.

Por otro lado, también existen proteínas que son capaces de mediar el transporte de moléculas en contra de potencial electroquímico, sin embargo, este transporte no rompe con las leyes termodinámicas ya que este movimiento que consume energía (endergónico) se acopla a otro proceso que libera energía (exergónico). A este tipo de transporte se le llama transporte activo. Dicho proceso exergónico puede ser la hidrólisis de ATP, en cuyo caso se otorga el nombre de transporte activo primario, o el movimiento de una segunda molécula a favor de su gradiente electroquímico, mecanismo que recibe el nombre de transporte activo secundario. Se llama secundario porque el gradiente que es disipado para proveer la energía necesaria para el transporte de la otra molécula en contra de su gradiente, es generado en un inicio por un transportador activo primario. Dentro de los transportadores activos secundarios encontramos dos subtipos: aquellos que mueven ambos solutos en la misma dirección (cotransportadores) y aquellos que mueven uno en dirección opuesta al otro (intercambiadores). El funcionamiento de ambos sigue el mismo principio. La estructura terciaria de estas proteínas membranales consiste en varias α -hélices, el número generalmente varía entre 10 y 14, que atraviesan la membrana celular. Estas hélices están acomodadas de tal manera que forman una hendidura hidrofílica en donde se encuentra el sitio de unión de los sustratos de transporte. Esta hendidura hidrofílica no está expuesta de manera permanente al ambiente extracelular e intracelular, sino que cambios en la conformación de la proteína alternan la exposición de ésta a uno de estos dos ambientes a la vez, pero nunca al mismo tiempo. En los transportadores de este tipo que se han cristalizado se ha observado que los segmentos transmembranales de la proteína se agrupan en dos estructuras, una amino-terminal y otra carboxi-terminal, que, a pesar de que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, presentan una conformación similar, de tal forma que la estructura completa del transportador adquiere un carácter simétrico (2), (25), (99). Las dos estructuras interactúan y cada una forma una mitad de lo que finalmente constituye al transportador completo. Se ha propuesto que estas dos estructuras rotan alrededor de un eje para cambiar el lado de la membrana al que está expuesto el sitio de unión de los sustratos. El mecanismo de transporte consiste en la

unión de los sustratos desde una de las caras de la membrana al sitio de unión en el transportador y un cambio conformacional posterior que expone a los sustratos unidos a la otra cara de la membrana de tal forma que cuando se disocian éstos ha ocurrido el transporte (22), (2). Esto explica dos características básicas del transporte mediado por cotransportadores e intercambiadores. La primera es que el transporte es saturable, es decir, la velocidad de transporte aumenta conforme aumenta la cantidad de sustrato disponible para el transporte, sin embargo, alcanza un límite establecido por la capacidad de la proteína de cambiar de conformación. La segunda característica es la especificidad que se debe a que sólo los sustratos tienen la estructura química necesaria para establecer las interacciones adecuadas con su sitio de unión en el transportador.

El presente trabajo está enfocado en el estudio de la proteína NCC que es un cotransportador de este tipo. Su estructura cristalográfica todavía no se ha determinado, por lo que sólo se cuenta con la evidencia estructural de otros cotransportadores para hacer inferencias al respecto. En capítulos posteriores se profundizará más en los datos estructurales que se conocen de esta proteína.

II.2 El riñón y el manejo renal de NaCl

El riñón realiza varias funciones que son vitales para el funcionamiento adecuado del organismo: participa en la eliminación de toxinas y productos metabólicos; produce hormonas involucradas en el metabolismo de calcio, regulación de la presión arterial, y eritrogénesis; y, finalmente, participan en el mantenimiento de la homeostasis corporal, regulando el volumen, el pH y la concentración de electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-) en los fluidos corporales (12).

La regulación del *volumen* del fluido extracelular (FEC) es esencial para el mantenimiento de la presión arterial dentro de límites necesarios para la adecuada perfusión y función de los tejidos. El organismo regula el volumen del FEC a través del monitoreo y ajuste del contenido corporal de cloruro de sodio (NaCl). El riñón es el único órgano a través del cual podemos eliminar NaCl en forma finamente regulada.

Por otro lado, debido a que el riñón puede separar la excreción de sal de la de agua, este órgano juega un papel esencial en el mantenimiento de la *osmolaridad* del FEC mediante el monitoreo y el ajuste del contenido de agua. Esto es básico debido a que cambios importantes en la osmolaridad afectan el volumen celular y por lo tanto, las funciones celulares.

Estos dos sistemas, el de control de *volumen* y control de *osmolaridad*, se complementan, ya que los cambios en el contenido de NaCl corporal generan cambios en el volumen de FEC gracias a la acción del sistema de mantenimiento de la osmolaridad que activa el aumento en el contenido de agua para evitar que el NaCl genere una alteración osmótica.

Todas estas funciones se logran gracias a la acción conjunta de tres procesos fundamentales que realiza el riñón: filtración, reabsorción y secreción.

Estos se realizan a lo largo de la nefrona, que es la unidad funcional del riñón. Un riñón está constituido por millones de nefronas, y cada una de ellas está conformada por un glomérulo y un túbulo. El glomérulo es un conglomerado de capilares rodeado por una cápsula de tejido epitelial, la cápsula de Bowman. Esta cápsula consta de dos capas, una capa interna formada por células llamadas podocitos, de origen epitelial, que recubren a los capilares glomerulares, y una capa externa denominada capa parietal. Entre estas dos capas se genera un espacio, el espacio de Bowman, que es continuo con el lumen tubular. El túbulo, por su parte, está formado por un epitelio simple, cuyas características van cambiando de acuerdo a la función que se realiza en cada segmento.

La *filtración* es el movimiento de plasma libre de proteínas desde el capilar glomerular hacia el espacio de Bowman. Ésta depende de la integridad de la pared capilar, y de la presión intracapilar, que a su vez está determinada por la presión de perfusión renal y de las resistencias de las arteriolas eferentes y aferentes.

El espacio de Bowman, como ya se dijo, es continuo con el lumen del túbulo renal al cual entra el filtrado glomerular que es idéntico al plasma, con excepción de que no contiene macromoléculas como las proteínas plasmáticas. Por lo tanto, el filtrado glomerular es expuesto a los procesos de *reabsorción* y *secreción* a lo largo de la nefrona para convertir una gran cantidad de ultrafiltrado plasmático en una pequeña cantidad de orina. El filtrado glomerular normal es aproximadamente de 125 ml/min (180 litros en 24 hrs), mientras que la producción promedio de orina es de 0.8 a 1.2 ml/min (1 a 2 litros en 24 horas).

La reabsorción y secreción pueden ser procesos pasivos, determinados únicamente por gradientes electroquímicos y la permeabilidad de la pared tubular, o procesos activos en los cuales está involucrada toda una maquinaria celular (*procesos transcelulares*) que provee la energía y el medio de transporte para que se lleven a cabo.

En términos generales, la *reabsorción transcelular* es posible gracias a la actividad de la *ATPasa de Na⁺/K⁺ basolateral* que saca sodio y mete potasio a la célula, y de esta forma genera un gradiente electroquímico que favorece la entrada apical de Na⁺ a través de diversas proteínas que permiten su difusión hacia el interior celular (canales), o que acoplan la entrada

de sodio al movimiento de otros solutos que también requieren reabsorberse (transportadores secundarios). Los transportadores secundarios se dividen en dos clases: aquellos que mueven ambos solutos transportados en la misma dirección (*cotransportadores*) y aquellos que acoplan la entrada de un soluto a la célula a la salida de otro (*intercambiadores*).

La porción tubular de la nefrona se ha dividido, con fines prácticos, en segmentos de acuerdo a criterios funcionales y anatómicos (Figura 1). Enumerados del segmento más próximo al glomérulo al más distal, éstos son:

- túbulo proximal,
- asa de Henle, que se subdivide en:
 - asa descendente delgada,
 - asa ascendente delgada y
 - asa ascendente gruesa,
- túbulo contorneado distal,
- túbulo conector,
- túbulo colector, subdividido en:
 - colector inicial,
 - colector cortical,
 - colector medular (externo e interno).

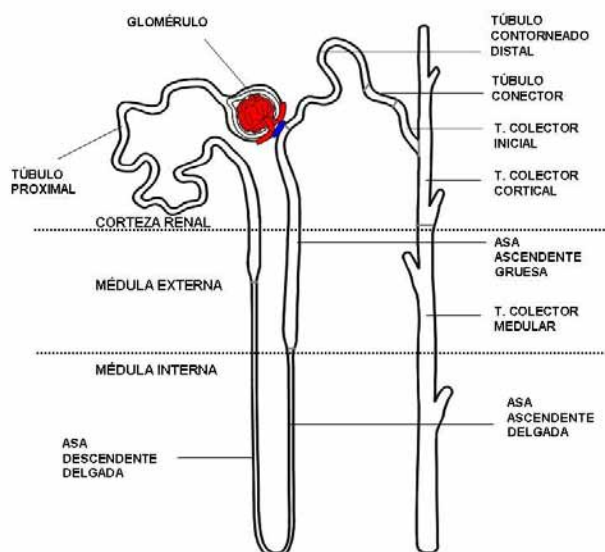


Figura 1. Estructura de la nefrona

En términos muy generales el papel en la reabsorción de NaCl de cada uno de estos elementos es el siguiente. En el **túbulo proximal** se recupera la mayor parte del filtrado glomerular. Se

reabsorbe la totalidad de los nutrientes filtrados, como glucosa y aminoácidos, acoplando el transporte de éstos a la entrada de sodio. El gradiente para la entrada de sodio es generado por la ATPasa de Na^+/K^+ basolateral, un mecanismo que es general para la reabsorción de Na^+ a lo largo del epitelio. Además se reabsorbe Na^+ mediante un intercambiador Na^+/H^+ apical, y un cotransportador basolateral de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Este mecanismo es además importante en la regulación ácido-base del organismo. En total se reabsorbe alrededor de un 65% de la cantidad total de Na^+ filtrada. El Cl^- se reabsorbe por vía paracelular en la parte inicial de este segmento, obedeciendo al gradiente eléctrico y químico transepitelial que genera la entrada de Na^+ . En la parte final el Cl^- se reabsorbe por vía transcelular, acoplado a la salida de aniones como formato, oxalato o HCO_3^- . Dado que este es un segmento permeable al agua, toda la reabsorción de Na^+ va acompañada de reabsorción agua, y de esta forma la concentración luminal de Na^+ se mantiene constante.

El *asa de Henle* forma parte del sistema para concentrar o diluir la orina. Participa en la generación de un intersticio medular hipertónico a través de la reabsorción de NaCl en un segmento impermeable al agua. Esta hipertonicidad es explotada río abajo por los túbulos colectores en donde la reabsorción de agua es estimulada por la diferencia entre la osmolaridad luminal y la intersticial. La regulación de la permeabilidad al agua en los túbulos colectores es parte esencial del mecanismo biológico para regular la osmolaridad plasmática mediante la generación de orina diluida o concentrada. En el asa de Henle se lleva a cabo un 25% de la reabsorción total de NaCl . Los mecanismos de transporte utilizados son un cotransportador electroneutro de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, llamado NKCC2, que se expresa únicamente en el asa ascendente gruesa, y un transporte paracelular pasivo en la porción del asa ascendente delgada. El transportador NKCC2 es blanco de los llamados *diuréticos de asa*, como bumetanida o furosemida.

El *túbulo distal* y el sistema de *túbulos colectores*, son los sitios que llevan a cabo el control fino de la excreción de sal y agua. A pesar de que a estos se encargan de reabsorber únicamente un ~10% del NaCl filtrado, son los principales sitios de control de la reabsorción de NaCl y agua, que responden a la acción de hormonas como aldosterona, angiotensina y hormona antidiurética (ADH), las cuales son efectoras de los mecanismos de control de volumen y osmolaridad del FEC.

En los *túbulos colectores*, el Na^+ es reabsorbido a través de un canal de sodio apical (ENaC), y esta reabsorción genera un voltaje transepitelial negativo en el lumen que permite la reabsorción paracelular de Cl^- . Este voltaje también impulsa la secreción de potasio hacia el lumen, vía un canal de K^+ apical llamado ROMK. El Cl^- es también reabsorbido a través de

un proceso transcelular que involucra un intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical, y un canal de Cl^- basolateral (12).

Sobre los mecanismos de reabsorción en el túbulo distal se hablará con más detalle en el siguiente apartado.

II.3 Fisiología de la reabsorción en el túbulo contorneado distal

Los primeros estudios hechos sobre la reabsorción en túbulo distal eran exclusivamente estudios de microperfusión in vivo, en los cuales se medía el flujo transepitelial a través de un sistema en que se controlaba la solución que perfundía al segmento tubular, y ésta era recuperada al final del segmento (17). La versión clásica de “túbulo distal” comprendía el segmento entre la mácula densa (el último segmento del asa ascendente gruesa, en donde entran en contacto el glomérulo y el túbulo renal), y la primera confluencia con otra nefrona. Muchos estudios de microperfusión distal se realizaron considerando todo este segmento, y así se estableció que éste es responsable de alrededor de un 10% de la reabsorción del NaCl filtrado (24).

Posteriormente se observó que este segmento en realidad comprendía varios subsegmentos que se podían diferenciar por sus características tanto morfológicas como funcionales. Estos subsegmentos fueron llamados: túbulo contorneado distal, túbulo conector, y túbulo colector inicial.

El túbulo contorneado distal (TCD) se dividió después en dos segmentos más: el TCD temprano y el TCD tardío (también conocidos como TCD1 y TCD2). La región temprana está compuesta principalmente por células de TCD, mientras que la región tardía es una especie de zona de transición y, por lo tanto, contiene células de TCD, y células principales e intercaladas, las cuales son características de los túbulos conector y colectores.

Las células de TCD son altas y presentan una amplificación importante de la membrana apical y basolateral. La amplificación basolateral es más importante que la apical y consiste en procesos de tipo lamelar dentro de los cuales hay una gran cantidad de mitocondrias. La membrana apical se caracteriza por formar numerosas microvellosidades cortas. Estas células son las más ricas en mitocondrias de toda la nefrona y, congruente con esto y con la gran amplificación basolateral, son aquellas en las que se detecta la más alta actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ (73).

Los primeros estudios de microperfusión que se hicieron para distinguir el papel en la reabsorción de Na^+ de cada uno de los subsegmentos del túbulo distal clásico, revelaron diferencias importantes en los mecanismos de reabsorción utilizados en cada segmento. En 1975, Kunau et. al. identificaron a la nefrona distal (después de la macula densa) como el sitio de acción de los *diuréticos tipo tiazida* (53). Estudios posteriores delimitaron el sitio de acción de las tiazidas específicamente al TCD, en donde estos diuréticos bloquean un cotransporte acoplado de Na^+ y Cl^- , cuya actividad no altera el voltaje transepitelial. Esta vía es la responsable de prácticamente *el total* de la reabsorción de sal en este segmento. Por otro lado, en la zona correspondiente al túbulo conector y al colector inicial, se encontró que la reabsorción de Na^+ se daba a través de otras vías, incluyendo una vía electrogénica sensible a *amilorida* (fármaco que bloquea a los canales de sodio denominados ENaC) (17), (24). Años después se logró la clonación del gen codificante del transportador responsable de la actividad de reabsorción en TCD. Se trataba de un *cotransportador* que cumplía con todas las características mencionadas, al cual se llamó *NCC* (*Na^+/Cl^- cotransporter*) (30), (29). A partir de entonces la caracterización de la fisiología molecular de la reabsorción de sodio en esta zona de la nefrona se hizo posible.

Como muestra la figura 2, en las células de TCD, la ATPasa Na^+/K^+ basolateral genera el gradiente de Na^+ necesario para la entrada apical de este catión, a la cual se acopla la entrada de Cl^- vía NCC. El Na^+ atraviesa así el epitelio, mientras que el Cl^- , cuya concentración intracelular es elevada a niveles por encima del equilibrio electroquímico, sale a través de la membrana basolateral vía el canal de Cl^- , *CLC-K2*. La continua actividad de la ATPasa Na^+/K^+ es posible gracias a la extrusión apical de K^+ vía el canal de potasio llamado *ROMK* (98), y un cotransportador de K^+/Cl^- , *KCC1* (3), (31).

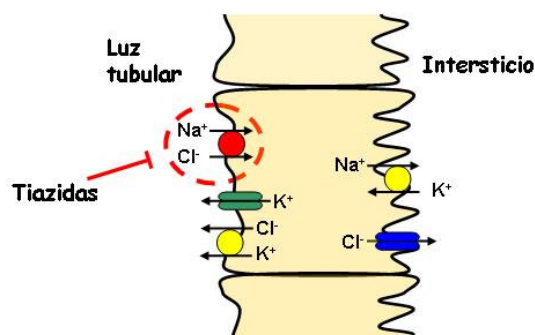


Figura 2. Mecanismo de reabsorción de NaCl en TCD.

Además de modular la entrada de Na^+ y Cl^- , NCC también modula la reabsorción de calcio y magnesio. Una disminución en la función de NCC, por bloqueo con tiazidas o por otras

causas, aumenta la reabsorción de calcio, y un aumento en la función de NCC produce el efecto contrario, por mecanismos poco claros hasta el momento (34), (10), (60).

Por último, la función de NCC también impacta el metabolismo de K^+ y el balance ácido-base. El bloqueo de la función de NCC por el uso de tiazidas puede provocar *hipokalemia*. La causa de esto es un aumento en el volumen de líquido y en la cantidad de NaCl que llega a túbulo colector al estar bloqueado NCC, que permite que aumente el intercambio de Na^+ con K^+ por los canales ENaC y ROMK, respectivamente. El aumento luminal de Na^+ en colectores favorece la reabsorción a través del canal ENaC, generando un potencial eléctrico negativo en el lumen, que favorece la salida de K^+ . Así mismo, la actividad de ENaC es necesaria para mantener la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ la cual se requiere para la secreción de K^+ . Por último, la contracción del volumen extracelular ocasionada por el uso de tiazidas puede activar el eje renina-angiotensina-aldosterona, y la aldosterona circulante exacerbar el efecto sobre la secreción de K^+ (12), (18).

Los efectos en el balance ácido-base están ligados a los efectos en el metabolismo de K^+ . Se sabe que la hipokalemia puede causar *alcalosis metabólica*, así como la alcalosis puede ser causa de hipokalemia. Una disminución en la concentración plasmática de K^+ disminuye la cantidad de K^+ unido a proteínas, y estos sitios de unión pueden unir a cambio H^+ disminuyendo así la concentración plasmática de H^+ . Además la secreción de H^+ también se ve aumentada en colector en respuesta a un aumento en el flujo y a la cantidad de NaCl que llega a este sitio (12).

Los efectos opuestos se observan cuando la función de NCC se encuentra elevada, es decir, se desarrolla hiperkalemia y acidosis metabólica. Esto se ha visto en personas con enfermedades genéticas cuya fisiopatología se explica principalmente por aumentos en la función de NCC (32), o en modelos animales transgénicos en que esta función está aumentada (57).

II.4 Clonación de NCC

El primer DNAC de NCC que fue clonado fue el de un pez que pertenece a la clase de los teleosteos, *Pseudopleuronectes americanus* o lenguado de invierno (30).

Evidencias previas indicaban que los mecanismos de reabsorción de NaCl eran similares en TCD de mamíferos y en la vejiga urinaria de este pez.

Se demostró que en ambos epitelios la reabsorción de Na^+ y Cl^- era interdependiente, y que la tasa de reabsorción de éstos era idéntica. El transporte era además electroneutro, ya que no

generaba cambios en el voltaje transepitelial (92), (74). También se observó que esta actividad era sensible exclusivamente a diuréticos tipo tiazida (86), (17), (24). De hecho, la observación original que demostró que las tiazidas inhiben a un transportador de NaCl fue llevada a cabo en la vejiga urinaria del lenguado (85) y posteriormente en TCD de mamífero (17), (24). La incapacidad de los diuréticos de asa, bumetanida y furosemida (inhibidores de NKCC), de inhibir este transporte, y la observación de que la presencia de K^+ no era necesaria para este, indicaban que se trataba de un mecanismo diferente al observado en el asa ascendente gruesa, cuya estequiometría propuesta era $Na^+/K^+/2Cl^-$ (86), (93). También se descartó que se tratara de un transporte paralelo de Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- , que resultara en una entrada neta de NaCl electroneutra, ya que no se observó sensibilidad a amilorida (inhibidor del intercambiador Na^+/H^+), ni a estilbenos (inhibidores del intercambiador de Cl^-/HCO_3^-) (86), (24). Finalmente, en ambos epitelios se observó que la inhibición de la reabsorción de NaCl con tiazidas resultaba en un aumento en el transporte transepitelial de calcio (17), (103).

Debido a que las tasas de transporte eran mayores en la vejiga de lenguado que en el TCD de mamífero, y a que la vejiga urinaria de lenguado representaba una oportunidad de acceder más fácilmente a una mayor cantidad de tejido que presentara este tipo de transporte, el primer gen clonado fue el de esta especie.

Para la clonación se utilizó una técnica de expresión funcional basada en el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de *Xenopus laevis*. (Esta técnica será explicada a detalle más adelante en la sección de metodología, ya que fue una herramienta esencial en el presente trabajo). Se fraccionó por tamaño el RNA extraído de la vejiga de lenguado, se inyectó éste en ovocitos de rana y después de cierto periodo de incubación se observó la capacidad de cada fracción de generar un transporte de $^{22}Na^+$ sensible a tiazidas y dependiente de la presencia de Cl^- en el medio. Una vez identificada la fracción capaz de producir esta actividad, se sintetizó DNAc, el cual se clonó en el plásmido adecuado para generar una biblioteca a partir de la cual se pudiera sintetizar nuevamente RNAc. La biblioteca de DNAc se dividió aleatoriamente en grupos a partir de los cuales se sintetizó RNAc que fue inyectado en ovocitos para lograr detectar la actividad del cotransportador. El grupo que presentó esta actividad fue progresivamente subdividido hasta que se aisló una sola clona que correspondía a un DNAc de 3.7 kb que por sí sola inducía la expresión de un cotransportador de NaCl sensible a tiazidas en los ovocitos. La clona fue secuenciada y en 1993 se publicó su estructura primaria, junto con un análisis del perfil de inhibición por diferentes diuréticos y distintas tiazidas, una predicción topológica computacional, y un análisis de la expresión del cotransportador en diferentes tejidos del lenguado (30).

La secuencia clonada contenía un único marco de lectura abierto de 3069 nucleótidos que correspondía a una proteína de 1023 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 112 kDa. A esta proteína se le llamó inicialmente *CST* (*cotransportador sensible a tiazidas*), aunque posteriormente se le llamó también *NCC* (*cotransportador de Na⁺/Cl⁻*), una vez que se identificaron otras proteínas relacionadas filogenéticamente.

Al inyectar RNAc de *CST* en ovocitos se observó que el transporte de Na⁺ mediado por *NCC* es insensible a bumetanida, furosemida, amilorida (inhibidor de ENaC), EIPA (inhibidor del intercambiador Na⁺/H⁺), estilbenos o acetazolamida (inhibidor de la anhidrasa carbónica, AC). Este último hallazgo tiene importancia histórica debido a que el grupo sulfonamida (-SO₂NH₂) que presentan todas las tiazidas, les confiere en teoría la habilidad de actuar como inhibidores de la *anhidrasa carbónica*, por lo que se pensó por años que las tiazidas debían su acción diurética, al menos en parte, a este efecto. Estudios previos, habían demostrado que la acción natriurética de las tiazidas administradas en animales no se debían a una actividad como inhibidor de la AC, ya que la administración de otros inhibidores clásicos de la AC no producían este efecto (54). Sin embargo, la clonación y expresión del cotransportador fue la prueba definitiva de que la inhibición del transporte no se debía a la inhibición de la anhidrasa carbónica: como ya se dijo, el transporte era insensible a acetazolamida, además de que el perfil de potencia relativa de distintas tiazidas para inhibir a la actividad de *NCC*, resultó ser completamente distinto al perfil con que inhiben a la AC (30).

El DNAc de *NCC* de lenguado se utilizó como sonda para clonar el *NCC* de mamífero, mediante técnicas basadas en la homología de secuencias. Se clonó el gen de *NCC* de rata, junto con el gen de *NKCC2*, ya que el grado de identidad entre ambos cotransportadores resultó ser del 50%, ya que estos pertenecen a la misma familia de proteínas (29). Hasta el momento se han identificado molecularmente el *NCC* de ratón, conejo y humano. El grado de identidad entre los *NCC* de mamífero es superior al 90% y de cada uno de ellos en relación con el lenguado es de aproximadamente 60% (95), (83), (59).

II.5 Expresión

Desde 1988 Beaumont et al. (8) realizaron estudios de unión (binding) con [³H]metolazona en rata e identificaron dos sitios de unión para las tiazidas. Uno de baja afinidad (K_d=289 nM), que observaron en varios tejidos, y otro de alta afinidad (K_d= 4.27 nM), presente únicamente en membranas de corteza renal, con un perfil de afinidad por distintas tiazidas similar al de su

potencia como diuréticos. Se observó mediante análisis de autoradiografía *in situ* que la [³H]metolazona se unía específicamente en los TCD (9), lo que concordaba con los resultados de los trabajos de localización funcional mediante microperfusión previamente mencionados (ver apartado II.2).

La clonación del NCC generó herramientas más poderosas para estudiar la expresión y localización del cotransportador tales como sondas para análisis de Northern blot e hibridación *in situ* (29), iniciadores para análisis de RT-PCR en nefronas individuales (101) o anticuerpos para análisis de Western blot e inmunofluorescencia (72), (6).

En el caso del NCC de lenguado (NCC_{fl}) se detectó, mediante Northern blot, la expresión de un transcrito de 3.7 kb específico de la vejiga urinaria, y un transcrito de 3 kb, producto de un empalme alternativo que elimina los primeros 299 aminoácidos (que comprenden la región amino terminal y las primeras tres regiones TM), presente en diversos tejidos incluyendo gónadas, intestino, ojo, cerebro, músculo esquelético y corazón (30). Sin embargo, las consecuencias funcionales de esta modificación en la secuencia no se conocen aún.

Por otro lado, en la rata se observó, mediante Northern blot, la presencia exclusiva de NCC en riñón, y mediante estudios de hibridación *in situ* e inmunofluorescencia, se delimitó la expresión a únicamente la región correspondiente a TCD, y más específicamente a las microvellosidades apicales de este segmento. Se encontró que la abundancia de la proteína es mayor en las zonas más proximales del TCD y va disminuyendo gradualmente conforme se aproxima hacia el túbulo conector (29; 72).

En años recientes se ha logrado determinar que existe expresión del NCC en otros tejidos fuera del riñón que incluyen el intestino (7) y el hueso (23). En este último tejido la presencia de NCC podría explicar el efecto benéfico que tienen las tiazidas sobre la densidad mineral ósea y la prevención de fracturas patológicas (50; 77).

II.6 Familia SLC12

NCC pertenece a la familia de acarreadores de solutos SLC12 según la base de datos del comité de nomenclatura de la organización del genoma humano, HUGO, por sus siglas en inglés (*Human Genome Organization*) (39), (1). Esta familia está conformada por 9 miembros, incluidos en base a la homología de secuencias entre ellos, pero únicamente se conoce la función de 7 de éstos. En la figura 3 se puede observar el árbol filogenético de la familia, así como el porcentaje de identidad entre cada miembro.

Los 7 miembros cuya función se conoce son cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a Cl⁻. Dos subfamilias son claramente identificadas. Una es la que utiliza sodio (con o sin potasio) como catión y cuenta con tres miembros: NCC, NKCC1 y NKCC2 y la otra utiliza únicamente potasio como catión y está compuesta por 4 miembros: KCC1-4. El grado de identidad entre ambas subfamilias es de 25%, mientras que entre los miembros de cada subfamilia varía entre el 50 y 70%. El grado de identidad de NCC con los otros transportadores de la subfamilia que utiliza sodio es de 50%. Esta similitud en la secuencia se refleja en una topología muy similar con 12 regiones TM y un asa extracelular entre las TM 7 y 8. Sin embargo, NKCC1 y NKCC2 presentan una diferencia funcional importante respecto a NCC, ya que, además de Na⁺, transportan K⁺, con una estequiometría de 1Na⁺:1K⁺:2Cl⁻, de tal forma que se conserva la electroneutralidad. La dirección de transporte para esta subfamilia, en condiciones fisiológicas, es hacia el interior de la célula, ya que está dirigido por el gradiente de Na⁺.

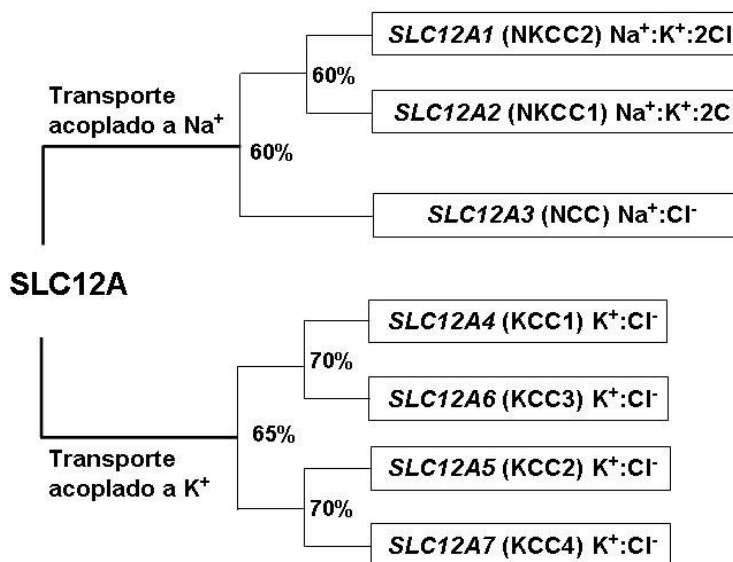


Figura 3. Árbol filogenético de la familia SLC12

Por otro lado, los KCCs median la salida de iones de la célula ya que el transporte está determinado por el gradiente de K⁺. En este caso la estequiometría es 1:1, como en el caso de NCC y se trata también de proteínas de 12 regiones TM, sin embargo, la topología es un poco diferente, ya que el asa extracelular y los sitios de glicosilación se encuentran entre las regiones TM 5 y 6 (31).

II.7 Estructura del NCC: Topología y formación de dímeros.

Topología. Desde que se conoció la secuencia primaria del cotransportador se realizó un análisis de hidropatía, utilizando el método de Kyte-Doolittle, a partir del cual se propuso una estructura topológica de 12 dominios transmembranales (TM) con los extremos amino y carboxilo del lado citoplásmico (30). Esta predicción coincidió con las predicciones hechas posteriormente para los cotransportadores de la misma familia, NKCC1 y NKCC2 (98), (29). El único trabajo experimental que se ha llevado a cabo hasta el momento para determinar la validez de estas predicciones topológicas fue hecho en el 2000 por el grupo de Turner (33). Estos autores realizaron una comparación de predicciones topológicas para NKCC1 hechas con distintos métodos teóricos conocidos, y encontraron discrepancias entre ellos. Las principales discrepancias se concentraban en las regiones TM 9 a 12, ya que en esta zona, el análisis de hidropatía revelaba 2 regiones hidrofóbicas de ~36 aminoácidos que algunos métodos interpretaban como 4 regiones TM, 9, 10, 11 y 12, mientras que otros métodos sólo las interpretaban como 2 regiones, prediciendo así estructuras de únicamente 10 segmentos TM.

Los autores usaron entonces un método bioquímico para analizar la capacidad de cada segmento TM de insertarse a la membrana. Se usó un sistema de traducción *in vitro*, y lo que se traducía era cada uno de los segmentos TM predichos, solos o por parejas, fusionados a secuencias de glicosilación en el extremo C-terminal. Exponiendo estos péptidos generados a microsomas (vesículas membranosas formadas a partir de restos de retículo endoplásmico), se evaluó la capacidad de inserción mediante la presencia o no de glicosilación, la cual sólo se podía producir si la secuencia era insertada en la membrana del microsoma y expuesta a la maquinaria de glicosilación presente en el interior de éste.

Los primeros 8 segmentos, con una longitud típica de 20 aminoácidos cada uno, demostraron la capacidad de funcionar como secuencias de anclaje en membrana. Por otro lado, las regiones 9-10 y 11-12, de ~36 aminoácidos cada una, demostraron la capacidad de insertarse en la membrana cuando se traducían en parejas, en una conformación que cruzaba 2 veces la membrana, de tal forma que el extremo amino quedara del mismo lado que el carboxilo. Se propuso entonces que cada una de estas dos grandes zonas hidrofóbicas de 36 residuos podrían estar formando, en vez de una sola gran alfa hélice, un par de hélices compactadas, atravesando 2 veces la membrana, una conformación que recibe el nombre de “horquilla

helicoidal” (helical hairpin) (62), (63). Otra posibilidad propuesta fue que se formara una estructura no helicoidal o parcialmente helicoidal.

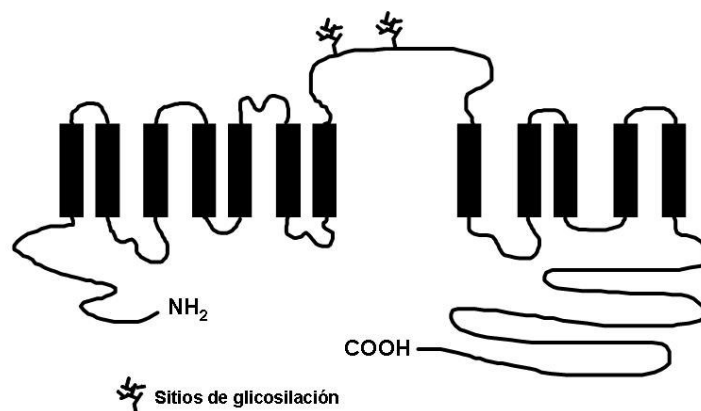


Figura 4. Topología de NCC.

Formación de dímeros. Existen varias evidencias de que los cotransportadores de la familia de NCC tienen la capacidad de formar dímeros (21), (84), (15), (65). Específicamente para NCC, el grupo de Bindels (21) utilizó distintas estrategias para demostrar esto. Se hicieron ensayos de Western blot de extractos totales de proteínas membranales de ovocitos inyectados con cRNA de NCC. Estos extractos fueron o no tratados con un agente químico (DTBP) que favorece la formación de enlaces covalentes entre moléculas, de tal forma que al revelar el Western blot de los extractos tratados con DTBP y los no tratados, se observaron diferencias importantes: en los extractos tratados desaparecieron las bandas de bajo peso molecular correspondientes a la proteína monomérica y aumentó la intensidad de las bandas correspondientes a conformaciones multiméricas. Un análisis cuidadoso del tamaño de las conformaciones multiméricas utilizando la técnica de centrifugación en gradiente de glucosa, reveló que estas formas migraban como un complejo molecular de 310 kDa, lo cual correspondía a una conformación homodimérica (NCC sin glicosilaciones pesa ~110 kDa, pero glicosilado pesa ~140 kDa). Se hicieron ensayos de coimmunoprecipitación a partir de ovocitos coinfectados tanto con NCC fusionado a un epítipo HA, como con NCC fusionado al epítipo FLAG, y se observó que en los extractos obtenidos de la inmunoprecipitación con HA, se podían revelar proteínas marcadas con FLAG y viceversa. Finalmente, se construyeron dímeros concatenados, esto es fusiones de dos moléculas completas de NCC, una después de la otra. Se observó que la inyección en ovocitos de una fusión de dos cotransportadores silvestres generaba una actividad tipo NCC similar a la que se observa cuando se inyecta NCC silvestre. Esto comprobó la capacidad de NCC de *funcionar* como

homodímero. Sin embargo, no se analizó la posibilidad de que los dímeros concatenados llegaran a la membrana y que, ahí, cada una de las moléculas fusionadas funcionaran como entidades diferentes con sus sitios de unión y poro hidrofílico propios, es decir que no se necesitara de ambas moléculas para formar un transportador funcional (21). En relación a esto, es relevante mencionar, que cuando se hicieron experimentos de dímeros concatenados, pero con el transportador NKCC2, en los que se fusionaron un cotransportador silvestre y uno mutante (con una mutación que no afectaba la llegada a la membrana, sino la actividad basal de este) se observó una disminución del 50% en la actividad, en relación al concatenado silvestre/silvestre. Si dos moléculas de NCC se necesitaran para generar la estructura funcional del cotransportador, tal vez se esperaría que si una de estas dos moléculas presenta mutaciones que impiden su función, *todo* el cotransporte se vea afectado, no sólo el 50% (84). Sin embargo, por otra parte, para KCC1, en un trabajo en el que se construyeron mutantes con el extremo amino terminal truncado, las cuales no eran funcionales a pesar de tener una expresión en membrana normal, se observó que éstas mutantes tenían un efecto dominante negativo cuando se coexpresaban en ovocitos junto con el cotransportador silvestre, lo cual parecía indicar alguna especie de interacción funcional. En apoyo a esto se logró además coinmunoprecipitar a las especies mutantes junto con las especies silvestres (15). La discrepancia entre lo observado con NKCC1 y KCC1 podría deberse a que tal vez la mutación hecha en NKCC1 no afecta la interacción entre monómeros, pero aquella en KCC1 si lo hace. Por lo tanto, queda claro que el transportador tiene la capacidad de formar dímeros y que la estructura dimérica es funcional. Sin embargo, aún no se sabe si esta interacción es esencial para la función o si la estructura monomérica también es funcional, así como si la función de una subunidad afecta la función de la otra. También está en duda la naturaleza de la interacción entre subunidades: ya sea que los aminoácidos de ambas moléculas participen en la generación de un sólo poro hidrofílico compartido y de un sitio de unión para los sustratos de transporte, o que cada subunidad del dímero funcione como una entidad de transporte independiente con su poro y sitios de unión propios.

En la literatura se han reportado ya estructuras cristalográficas de varios transportadores membranales que forman homodímeros. En varias de estas estructuras cada unidad monomérica forma una unidad funcional diferente, con sus propios sitios de unión, y estas unidades funcionales se asocian a través de una interfase formada por ciertos segmentos transmembranales y, en algunos casos, por el extremo amino o carboxilo terminal (25), (61), (100). Algunos de estos transportadores tienen una topología similar a la de NCC, como el cotransportador de Na⁺/Leucina de *Aquifex aeolicus*, con 12 dominios TM (100), y el

intercambiador de Na^+ /Galactosa de *Vibrio parahaemolyticus*, con 14 regiones TM (25). Por lo tanto, no sería aventurado proponer que los dímeros de NCC se ensamblen de manera similar. Los datos experimentales sobre los concatenados de NKCC2 (84) apoyan esta hipótesis.

Por otro lado, el un ejemplo en la literatura en que ambas unidades del dímero participan en la formación de sitios de unión comunes y un poro común, es el de un intercambiador de H^+ /multidroga de *E. coli*, llamado EmrE. Sin embargo, la topología de éste es bastante diferente a la de NCC, ya que cada monómero contiene 4 alfa-hélices TM, y por lo tanto, el transportador funciona como una entidad homodimérica con únicamente ocho regiones TM (81).

En cuanto a los dominios dentro de la secuencia necesarios para la formación de dímeros existe únicamente un trabajo realizado en NKCC1 (70). En éste se vio que el segmento 751-998 dentro de la región C-terminal es esencial para que esto ocurra, ya que el intercambio de esta región entre NKCC1 y otros cotransportadores de la familia fue suficiente para cambiar el tipo de cotransportador con el cual se asocia la proteína (únicamente se asocia con otra subunidad que tenga esta región C-terminal idéntica). Por lo tanto, al parecer esta región determina la especificidad de la interacción, pero probablemente otras regiones de la proteína también puedan participar en la interfase entre subunidades.

II.8 Caracterización funcional de NCCr y NCCfl

Los primeros estudios de caracterización funcional de NCC se realizaron, ya sea midiendo el transporte directamente en el epitelio correspondiente, o en preparaciones membranales de éste. Renfro (74) y Velázquez et. al. (94) probaron la interdependencia del transporte de Na^+ y Cl^- en la vejiga urinaria de lenguado y en el túbulo distal de rata, respectivamente, y obtuvieron determinaciones aproximadas de las concentraciones necesarias de iones para alcanzar el 50% de la actividad máxima.

Tran et. al. (90) realizaron mediciones en preparaciones membranales de corteza renal de rata de unión (binding) de [^3H]metolazona, en presencia de diferentes concentraciones de Na^+ o Cl^- , para determinar si la inhibición se podía explicar como una competencia por el sitio de unión. Se observó que la unión de [^3H]metolazona a las membranas se estimulaba en presencia de concentraciones crecientes de Na^+ , mientras que disminuía en presencia de concentraciones crecientes de Cl^- . Además la inhibición de la unión de [^3H]metolazona por

Cl⁻ se exacerbaba en presencia de mayores concentraciones de Na⁺. Por lo tanto, se propuso como modelo un sistema de transporte ordenado, que se muestra en la figura 5, en el cual el Na⁺ se une primero al transportador, y favorece la unión ya sea del Cl⁻ o de la metolazona, los cuales compiten por el segundo sitio de unión.

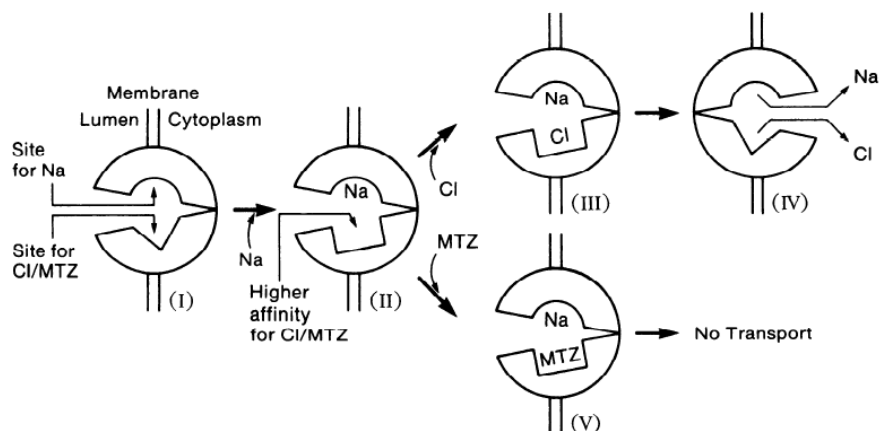


Figura 5. Modelo propuesto por Tran et. al. (90) sobre el mecanismo de transporte de NaCl mediado por NCCr.

La robusta expresión funcional lograda en el sistema de expresión heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis*, posible gracias a la clonación del gen de NCC, permitió, más adelante, una caracterización más completa y acertada. En el 2000, Monroy et. al. (64) determinaron los valores de los parámetros catalíticos del transportador de *rata* (*NCCr*). A través de un ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten ($V = V_m \cdot K_m / (K_m + S)$), asumiendo equilibrio rápido, se obtuvieron valores de K_m para Na⁺ y Cl⁻ de 7.6 ± 1.6 mM y 6.3 ± 1.1 mM respectivamente (Figura 6, Tabla 1). Esto concuerda con los valores aproximados reportados previamente por Velázquez et. al. de las concentraciones de iones necesarias para alcanzar el 50% del transporte máximo en epitelio de túbulo distal de rata, los cuales estaban alrededor de 10 mM (94). La K_m es una constante de equilibrio que refleja la afinidad del sustrato de transporte por el transportador, y de manera matemática se puede demostrar que, en estas condiciones, representa la concentración de sustrato necesaria para alcanzar el 50% de la velocidad máxima (a mayor K_m , menor afinidad). Por lo tanto la comparación con los datos de Velázquez et. al. es válida.

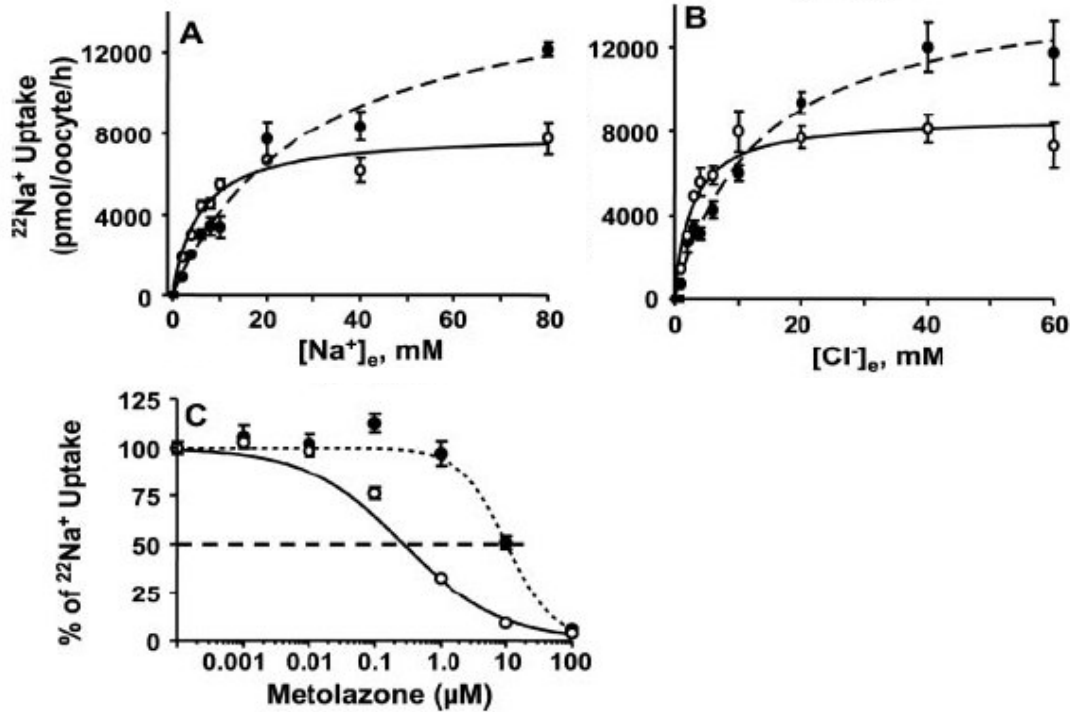


Figura 6. Cinética de transporte de iones y de inhibición por metolazona comparativa entre NCCfl (líneas punteadas) y NCCr (líneas continuas). Se utilizó el sistema de expresión funcional de ovocitos de *X. laevis*. A) Captación de Na^+ dependiente de la $[\text{Na}^+]_e$ extracelular. La $[\text{Cl}^-]$ utilizada fue de 96 mM. B) Captación de Na^+ dependiente de la $[\text{Cl}^-]_e$ extracelular. La $[\text{Na}^+]_e$ utilizada fue de 96 mM (Figuras del artículo original de Moreno et. al., 2006) (66).

	NCCr		NCCfl			NCCm
	Monroy et. al. {Monroy, A, 2000}	Moreno et. al. {Moreno, E, 2006}	Gamba et. al. {Gamba, G, 1993}	Vázquez et. al. {Vázquez, N, 2002}	Moreno et. al. {Moreno, E, 2006}	Sabath et. al. {Sabath, E, 2004}
Km Na^+	7.6 ± 1.6 mM	5.5 ± 1 mM	25 ± 0.4 mM	58.2 ± 7.1 mM	30 ± 6 mM	7.2 ± 0.4 mM
Km Cl^-	6.3 ± 1.1 mM	2.6 ± 0.6 mM	13.6 ± 0.2 mM	22.1 ± 4.2 mM	15 ± 2 mM	5.6 ± 0.6 mM
IC₅₀ Metolazona	5×10^{-7} M	3×10^{-7} M	ND	5×10^{-6} M	4×10^{-6} M	4×10^{-7} mM

Tabla 1. Comparación de los valores obtenidos para distintos parámetros cinéticos del NCC de distintas especies. Se muestran también los valores obtenidos para el transportador de una misma especie en diferentes trabajos. Las discrepancias observadas son producto de pequeñas variaciones en la metodología utilizada, sin embargo, siempre se observa una diferencia entre los transportadores de mamíferos y el transportador de lenguado.

Las determinaciones de Monroy et. al. se realizaron en presencia de concentraciones saturantes del contraion en el medio (es decir, del ion cuya concentración permanece fija cuando se realiza la cinética, midiendo la actividad de transporte en presencia de

concentraciones crecientes del ion variable, cuya K_m se quiere obtener). Posteriormente se hicieron experimentos con la finalidad de conocer si la concentración del contraion presente en el medio podía afectar los valores de K_m obtenidos. Se observó que, en las cinéticas de Na^+ , un aumento en la concentración de Cl^- extracelular aumenta tanto la afinidad por Na^+ (disminuye la K_m), como la velocidad máxima (V_m) del transporte. Cuando el Cl^- es el ion variable en la cinética un aumento en la concentración extracelular de Na^+ tiene el mismo efecto. Por lo tanto, se propuso como modelo para explicar la cinética de transporte un sistema de unión al azar en el cual cualquiera de los dos iones puede unirse primero al transportador, y la unión del primer ion aumenta la afinidad con que se une el segundo. El valor de las constantes que describen como se altera la afinidad no fueron determinadas. Es importante mencionar que este modelo se contrapone a aquel propuesto por Tran et. al. (90) el cual proponía un sistema de unión ordenado en que el Na^+ era el primer ion en unirse y favorecía así la unión del segundo sustrato. Aunque aún no esta claro, la discrepancia probablemente sea producto de las diferencias en la metodología utilizada.

En cuanto a la afinidad por las tiazidas, se determinó la potencia de distintos tipos de éstas realizándose curvas de dosis-respuesta a partir de las cuales se determinaron los IC_{50} para cada una de ellas (concentración de inhibidor con la cual se alcanza el 50% de inhibición). Estos resultados se presentan en la figura 7. El perfil de inhibición observado fue el siguiente: politiazida > metolazona = bendroflumetiazida > triclorometiazida > hidroclorotiazida.

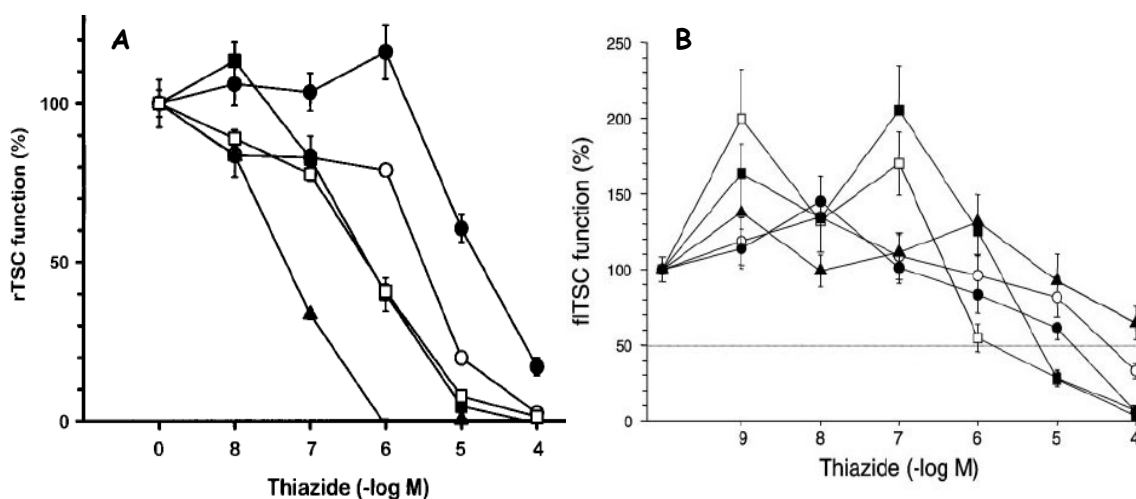


Figura 7. Perfil de inhibición del NCCr (A) y NCCfl (B) por distintos tipos de tiazidas. Los compuestos usados con NCCr fueron: politiazida (▲), metolazona (■), bendroflumetiazida (□), triclorometiazida (○), e hidroclorotiazida (●). Los compuestos usados con NCCfl fueron: metolazona (□), politiazida (■), bendroflumetiazida (●), triclorometiazida (○) y clortalidona (▲) (64),(91).

Además se exploró la capacidad de las concentraciones extracelulares de Na^+ y Cl^- de afectar la afinidad (medida como el IC_{50}) del transportador por los inhibidores, y se observó que tanto el Na^+ como el Cl^- disminuían la afinidad (figura 8). Esto último también se contrapone, hasta cierto punto al modelo propuesto por Tran et. al., el cual se basaba en la observación de que el Na^+ aumentaba la afinidad por metolazona, contrario a lo observado en este caso. Por lo tanto, los autores propusieron a partir de este trabajo, un nuevo modelo de unión al azar de los iones en el que las tiazidas compiten por el sitio de unión de ambos sustratos de transporte.

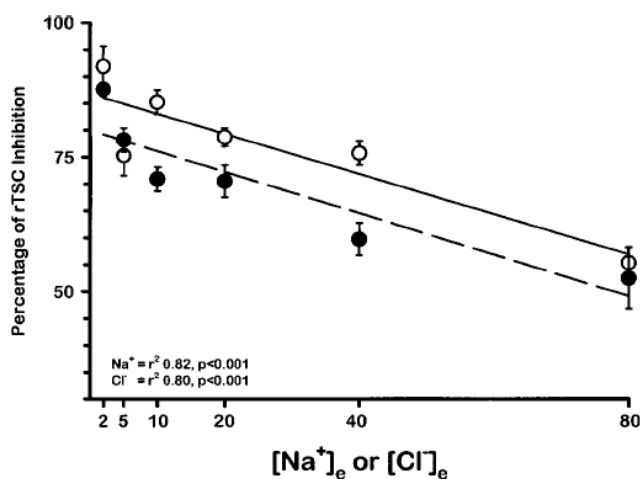


Figura 8. Figura original del artículo en donde se demuestra que la concentración extracelular de Na^+ y Cl^- afecta la afinidad por metolazona en NCCr. La concentración de metolazona utilizada fue de 5×10^{-7} M (equivalente al IC_{50} para este inhibidor) (64).

En un trabajo posterior, Vázquez et. al. caracterizaron al cotransportador de lenguado (NCCfl) y realizaron una comparación con el cotransportador de rata (NCCr) (91). Se observó que el NCCfl exhibe una menor afinidad por ambos sustratos de transporte con valores de K_m para Na^+ y Cl^- de 58.2 ± 7.1 mM y 22.1 ± 4.2 mM respectivamente (Figura 6, Tabla 1). Al igual que en NCCr las afinidades por ambos iones disminuyen al disminuir la concentración del contraion en el medio. Las diferencias en afinidad por los iones probablemente representan una adaptación evolutiva que permiten al transportador de mamífero una mayor actividad en presencia de concentraciones menores de sustratos, ya que las células de TCD se exponen a menores concentraciones de iones que el epitelio de la vejiga de lenguado. Esto se ve apoyado por los valores de K_m del cotransportador de ratón (NCCm) (el único transportador de otra especie caracterizado funcionalmente) que son similares a los de NCCr (76) (ver tabla 1). La afinidad por tiazidas también es al menos un orden de magnitud menor que la del NCCr, con un IC_{50} para metolazona de $\sim 5 \times 10^{-6}$ M. El perfil de inhibición es similar, ya que todos

los diuréticos tipo tiazida evaluados presentaban una menor afinidad pero una potencia relativa similar a la observada en NCCr (figura 7): metolazona > politiazida > bendroflumetiazida > triclorometiazida > clortalidona.

II.9 Diuréticos tipo tiazida

Importancia clínica. Los diuréticos tipo tiazida se utilizan desde 1957 para el tratamiento de hipertensión, y de estados edematosos como en insuficiencia cardiaca crónica, insuficiencia renal crónica, insuficiencia hepática crónica y síndrome nefrótico. La clorotiazida fue la primer tiazida utilizada, además de haber sido el primer agente antihipertensivo efectivo disponible para uso clínico (78), (96). Este tipo de compuestos se generaron de manera empírica sin conocimiento previo de su mecanismo de acción, y fue hasta 1993, con la clonación de NCC, en que se demostró, sin lugar a dudas, que este cotransportador es blanco de este tipo de diuréticos (30). La inhibición de la actividad de NCC afecta la reabsorción de NaCl a nivel de TCD, que no puede ser compensada por los segmentos más distales y se produce así un efecto diurético. Por lo tanto, se cree que el aumento en la excreción urinaria de NaCl se traduce en una disminución del volumen circulante, disminuyendo el retorno venoso, el gasto cardiaco y finalmente la presión arterial (PA) (43).

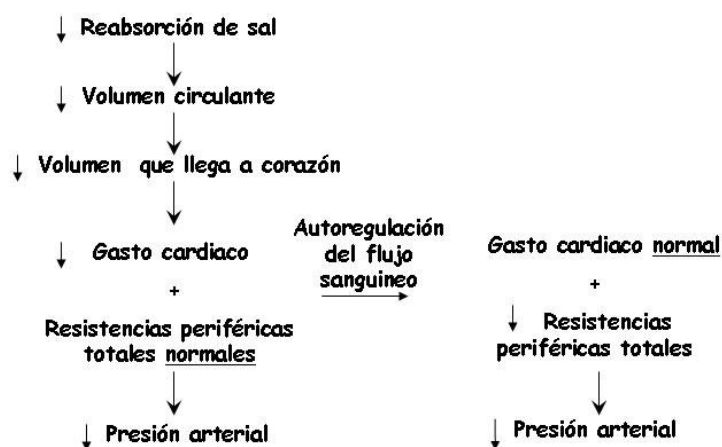


Figura 9. Mecanismo mediante el cual las tiazidas reducen la presión arterial al disminuir la reabsorción renal de Na⁺. La disminución en el volumen circulante y en el volumen sanguíneo que llega al corazón disminuye el gasto cardiaco y, por lo tanto, la presión arterial. La perfusión de tejidos resultante no satisface la demanda metabólica, lo que desencadena un fenómeno de autorregulación mediado por vasodilatación que resulta en una disminución en la presión arterial acompañada de una resistencia periférica disminuida y un gasto cardiaco normal. Adaptado de Lifton, R., 2001 (58).

La hipertensión es el factor de riesgo cardiovascular más importante a nivel mundial, contribuyendo a la mitad de los casos de enfermedad coronaria y a dos tercios de los casos de evento vascular cerebral (19).

Los resultados de un estudio clínico recientemente publicado, denominado “*Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial*” (ALLHAT), demostraron que el uso de diuréticos tipo tiazida constituye el tratamiento antihipertensivo más eficiente para la prevención de enfermedades cardiovasculares y complicaciones renales (14), (4). Debido a esto, a la falta de evidencias que demuestren un riesgo real por efectos secundarios y a la buena relación costo-beneficio, las tiazidas han sido recomendadas como *tratamiento de primera línea para el manejo de la hipertensión arterial* en el “*Seventh Report of the Joint National Committee (JNC) on High Blood Pressure*” realizado por institutos nacionales de salud (NIH) de Estados Unidos (16) y por los lineamientos del Instituto Nacional para la Salud y Excelencia Clínica y de la Sociedad Británica de Hipertensión en Gran Bretaña (80).

La hipertensión es un problema de salud de alta prevalencia en la actualidad. Los sondeos más recientes hechos a gran escala en Estados Unidos revelaron que la prevalencia de hipertensión (definida como presión sistólica >140 mm Hg y/o presión diastólica >90 mm Hg y/o estar bajo tratamiento hipertensivo), estandarizada por edad, es de 28.9%, con un estimado de 50 millones de personas hipertensas en este país, y revelaron también un aumento en la prevalencia con respecto a los resultados de sondeos anteriores (19). Esto resalta la relevancia de las tiazidas que son, por lo tanto, uno de los fármacos más prescritos a nivel mundial.

Las tiazidas tienen dos usos alternativos, no relacionados con el efecto de éstas sobre el volumen circulante, sino con su efecto sobre la concentración plasmática y urinaria de calcio. Como se vio en la sección II.2, el tratamiento con tiazidas aumenta la reabsorción renal de Ca^{2+} , y por lo tanto aumenta la concentración plasmática y disminuye la concentración urinaria de este catión. Por esta razón, las tiazidas también son utilizadas para el tratamiento de osteoporosis y de litiasis renal, padecimientos en los cuales un aumento en el Ca^{2+} plasmático y una disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]$ tubular, respectivamente, son favorables.

Mecanismo de acción. A pesar de que se sabe que NCC es blanco de los diuréticos tipo tiazida existe controversia respecto al mecanismo de acción mediante el cuál estos fármacos funcionan como antihipertensivos. El efecto de la administración aguda del fármaco sobre la presión arterial es claramente debido a la disminución en el volumen circulante de la que ya se habló, ya que esta disminución es observable, además de que, si se reexpande el volumen mediante la administración de dextrán, se reestablecen los niveles de presión arterial previos

al tratamiento. Sin embargo, las causas de la disminución en la PA como resultado de la administración crónica de tiazidas son más controversiales. Hay quienes piensan que este efecto no se debe a la disminución en la reabsorción de NaCl a través de NCC, sino a un efecto vascular directo en que disminuyen las resistencias periféricas totales. Esta hipótesis se basa en diversas evidencias experimentales. Por ejemplo, existe un bajo grado de correlación observado entre la potencia diurética y la potencia antihipertensiva. Además, a largo plazo, los efectos en la PA se mantienen a pesar de que el volumen circulante y el volumen de fluido extracelular regresan a los niveles pre-tratamiento (43).

Por otro lado, la hipótesis a favor del mecanismo vía NCC, se ve apoyada por la existencia de enfermedades genéticas mendelianas, ocasionadas por defectos en la función de NCC. Los pacientes con *síndrome de Gitelman*, un enfermedad autosómica recesiva ocasionada por mutaciones inactivantes del NCC (por defectos en el procesamiento de la proteína) (76), (55), desarrollan hipotensión a partir de la segunda década de la vida. Además presentan hipokalemia, hipocalciuria, alcalosis metabólica, hipomagnesemia, poliuria, polidipsia y niveles plasmáticos de renina elevados. Todos estos efectos también se observan en pacientes en tratamiento con tiazidas. La hipotensión se desarrolla de manera tardía ya que el exceso en la excreción urinaria de sal es inicialmente compensado por un aumento en la ingesta y a la estimulación del eje renina-angiotensina-aldosterona que reestablecen el volumen circulante (18). Esto demuestra que la inhibición sostenida del transportador sí ejerce un efecto sobre la PA que no puede ser completamente compensado por otros mecanismos fisiológicos.

Un dato importante es que el uso de tiazidas no disminuye la presión arterial en pacientes normotensos, en contraste con lo observado en los hipertensos. Esto podría explicarse por una deficiencia en algún mecanismo compensatorio en los pacientes hipertensos, que no son capaces de contrarrestar la deficiencia en la reabsorción al contrario de lo que ocurre en los normotensos.

Los ratones knockout para NCC, que imitan la deficiencia de los pacientes con síndrome de Gitelman, no tienen alteraciones en la PA en condiciones normales, pero si se les administra una dieta baja en Na⁺ desarrollan hipotensión. Por lo tanto, al parecer el defecto funcional de NCC puede ser compensado en condiciones basales, pero no en su participación en la regulación de la cantidad de Na⁺ corporal (79), (43).

Un estudio recientemente publicado demostró que mutaciones espontáneas en el gen de NCC, o sea, variantes alélicas de baja frecuencia, que tienen un efecto negativo sobre la función del cotransportador, previenen el desarrollo de hipertensión (49). Esto representa otra evidencia de que la inhibición sostenida de NCC puede afectar de forma continua la PA.

Otra enfermedad genética ilustrativa es el *síndrome de Gordon*, que es una imagen en espejo del síndrome de Gitelman, es decir, todos los elementos alterados en Gitelman están alterados en sentido contrario en los pacientes con Gordon. Se trata de un padecimiento autosómico dominante en que se encuentra mutado alguno de dos genes que codifican para cinasas llamadas WNK1 o WNK4 (*With No Lysine*). Éstas participan, entre otras cosas, en la regulación de la actividad de NCC y el efecto de las mutaciones, al menos parte de éste, es el de aumentar la actividad del cotransportador. Esto se sabe gracias a experimentos *in vitro* e *in vivo* que han demostrado los efectos que pueden tener estas cinasas sobre la actividad de NCC, y porque los pacientes con síndrome de Gordon presentan hipersensibilidad al tratamiento con tiazidas para corregir la PA, lo cual podría indicar que la hipertensión es efectivamente causada por un incremento en la actividad de NCC. Esto es otra prueba más de que el efecto antihipertensivo de las tiazidas se relacionan con el efecto de éstas sobre este cotransportador.

Efectos secundarios. Como ya se dijo, la intoxicación durante el tratamiento con tiazidas provoca efectos similares a lo observado en pacientes con síndrome de Gitelman: hipokalemia, hipocalciuria, alcalosis metabólica e hipomagnesemia. De estos efectos la hipokalemia es la complicación más temida, sin embargo, puede ser fácilmente manejada mediante la utilización de suplementos de cloruro de potasio, la co-administración de diuréticos ahorradores de potasio como amilorida, o de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs). Estos fármacos bloquean la secreción de K^+ en túbulos colectores que es precisamente la vía mediante la cual se pierde este catión por la acción de las tiazidas. A pesar de ser recomendadas por varios lineamientos internacionales para el manejo de la hipertensión (16), (80), los diuréticos tipo tiazida son menos utilizados de lo esperado. Esto se debe, al menos en parte, a la observación hecha en algunos estudios clínicos de que las tiazidas pueden provocar un pequeño aumento en los niveles de glucosa sérica, lo que ha provocado preocupación respecto a un potencial efecto adverso a largo plazo, renal y cardiovascular. Sin embargo, no hay datos que claramente comprueben este efecto. Los estudios más extensos hechos hasta ahora, como el ALLHAT y el SHEP (*Systolic Hypertension in the Elderly Program*), no han observado una correlación entre la administración de diurético y un aumento en el desarrollo de diabetes espontánea, al compararse con el grupo placebo. Además los efectos cardiovasculares benéficos siguen existiendo en los pacientes diabéticos de ambos estudios. Sin embargo, algunos piensan, que

los efectos adversos no han podido ser notados en los ensayos clínicos realizados hasta el momento por no ser éstos lo suficientemente prolongados.

El mecanismo mediante el cual se generan los aumentos en la glucosa sérica secundarios al tratamiento con tiazidas se desconocen hasta el momento. Se ha propuesto que esto podría ser un efecto secundario a la hipokalemia, y que por lo tanto la observación constante de los niveles séricos de K^+ y el mantenimiento de estos prevendrían los efectos sobre la glicemia. Sin embargo, de ser así, cualquier manipulación que pudiera alterar la concentración sérica de K^+ , como el uso de diuréticos de asa, debería tener el mismo efecto, y este no es el caso (14).

Es interesante notar que los pacientes con Gitelman no presentan hiperglicemia. Además el estudio de los niveles de glucosa sérica en personas con mutaciones en NCC que previenen el desarrollo de hipertensión, hecho recientemente en integrantes de la población del *Framingham Heart Study (FHS)*, demostró que la actividad disminuida de NCC no se relaciona con alteraciones en el metabolismo de glucosa, ni con la prevalencia de diabetes (49). Esto sugiere que si la relación observada entre uso de tiazidas y disglucemia es real, el mecanismo podría ser independiente del efecto de las tiazidas sobre NCC. En relación a esto, existen varios datos experimentales que sugieren la existencia de un segundo sitio de unión para las tiazidas en el organismo. Algunos ejemplos son la detección de un sitio de unión inespecífico y ubicuo de baja afinidad para [3H]Metolazona (8) y la detección de un transporte de Na^+Cl^- sensible a tiazidas en túbulo colector de rata (88), en donde no se ha podido detectar la presencia de NCC. Si fuera el caso de que los efectos hiperglicemiantes de las tiazidas se debieran a un mecanismo independiente de NCC, entonces el desarrollo de compuestos más específicos y más potentes, que se pudieran administrar a menores dosis, sería una posibilidad para evitar este tipo de efectos secundarios.

Estructura química de las tiazidas. Estrictamente el término “tiazida” se usa para nombrar a aquellos compuestos que son derivados de benzotiazidina. Tal es el caso de diuréticos como la clorotiazida, hidroclorotiazida, bendroflumetiazida, politiazida, etc. Estas fueron desarrolladas hace ya más de 50 años a partir de inhibidores de la anhidrasa carbónica y por lo tanto poseen un grupo sulfonamida que les confiere la capacidad de actuar como inhibidores de esta enzima, además de la actividad inhibidora específica que ejercen sobre NCC (78), (96). Posteriormente se desarrollaron otros compuestos que también son inhibidores específicos de NCC, cuya estructura base no era la benzotiazidina, y que por lo tanto no eran estrictamente tiazidas. Por esta razón a estos compuestos se les denominó *diuréticos tipo*

tiazida. Algunos ejemplos son las quinazolinonas como metolazona, las benzofenonas sustituidas como la clortalidona y las indolinas como la indapamida.

En la figura 10 se puede ver la estructura química de estos compuestos y también se presenta la estructura de la benzotiadiazina base, así como aquellas de otros compuestos útiles para una comparación, por ejemplo la estructura de acetazolamida (inhibidor de la AC que no tiene efecto sobre NCC), de una tiazida no diurética (diazóxido), y de los diuréticos de asa, bumetanida y furosemida. Es fácil notar que la constante presente en todos los inhibidores de NCC es un anillo bencénico con dos grupos químicos contiguos: una sulfonamida y un grupo electronegativo, cloro en la mayoría de los casos, aunque en la bezoflumetiazida encontramos flúor. La incapacidad del diazoxido de actuar como diurético revela la relevancia del grupo sulfonamida para conservar esta actividad. Por otro lado, la acetazolamida carece del grupo electronegativo, además de que el grupo sulfonamida no está sobre un anillo bencénico sino sobre un anillo pentamérico. Finalmente, los diuréticos de asa, poseen también un grupo sulfonamida, pero no requieren de la presencia de un grupo electronegativo contiguo y además se caracterizan también por la presencia de un grupo carboxilo ausente en los diuréticos tipo tiazida.

En conclusión, la presencia de un grupo sulfonamida y un grupo electronegativo contiguo parece ser necesaria para la interacción específica fármaco-NCC. Probablemente estos grupos establezcan interacciones químicas específicas con las cadenas laterales de ciertos aminoácidos de NCC, y por lo tanto, en cualquier estudio sobre el sitio de unión de las tiazidas al cotransportador se debe considerar esta información.

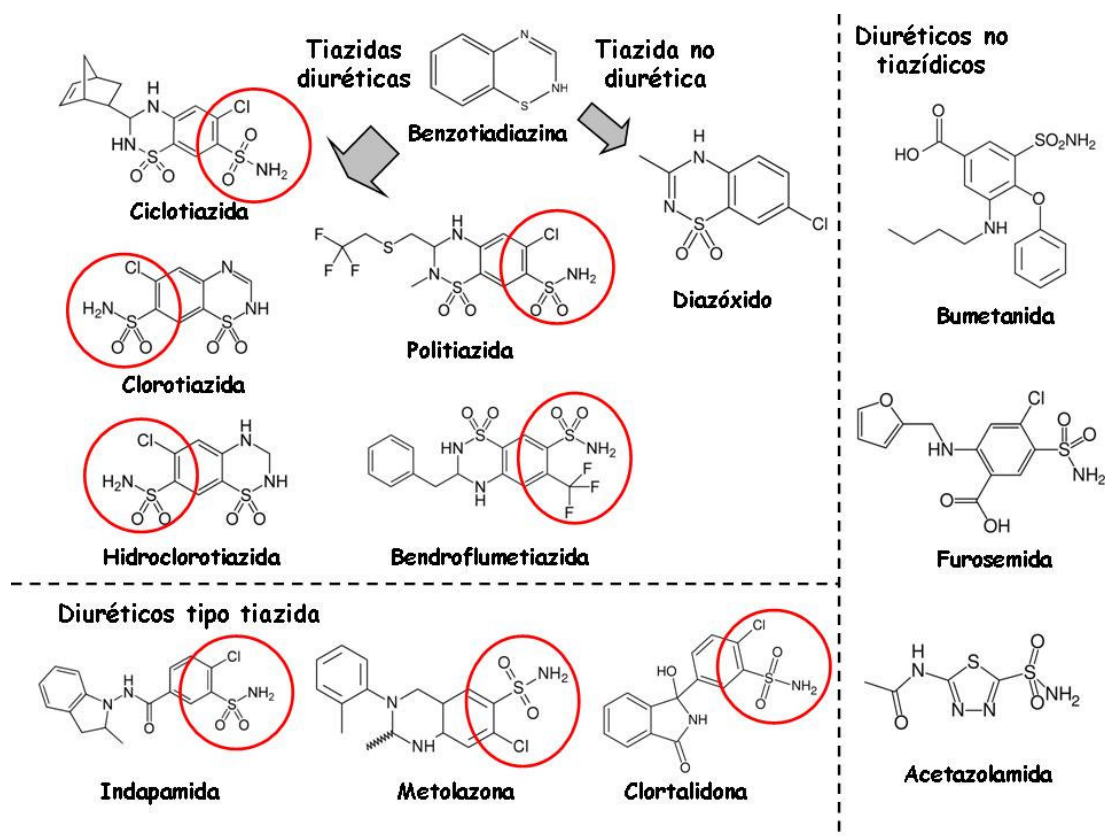


Figura 10. Estructura química de las tiazidas, de diuréticos tipo tiazida y de compuestos no tiazídicos que también tienen actividad diurética. En rojo se señala los elementos que son una constante a lo largo de todos los compuestos que tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de NCC.

II.10 Trabajos previos de estructura-función en NCC.

Debido a la dificultad que representa la cristalización de proteínas de membrana, hasta el momento no se conoce la estructura cristalográfica de ninguno de los miembros de la familia SLC12. Por lo tanto, se han realizado diversos trabajos de estructura-función con el objetivo de obtener información sobre esta estructura de manera indirecta. Este tipo de trabajos consisten en la identificación de elementos estructurales a través de modificaciones cuantificables en la función del transportador.

El primer trabajo de este tipo realizado en relación a NCC consistió en la construcción de quimeras entre los cotransportadores apicales NCC y NKCC2. Esto se hizo con el fin de identificar los dominios involucrados en definir la especificidad por los distintos tipos de inhibidores: diuréticos tipo tiazida vs. diuréticos de asa, y el tipo de catión transportado: K^+ y

Na⁺ vs. sólo Na⁺. Las quimeras generadas intercambiaban el dominio amino terminal, el dominio carboxilo terminal, o ambos. Los resultados revelaron que el dominio central hidrofóbico define el tipo de actividad que tiene el transportador: si transporta o no potasio, así como el tipo de diurético que inhibe su actividad. Esto además probó que, de acuerdo a lo esperado, en esta región se localizan los sitios de unión tanto de los iones como de los inhibidores (89).

En otro trabajo, Hoover et. al. estudiaron los efectos de mutaciones introducidas en los dos posibles sitios de glicosilación de la proteína de rata, localizados en el asa extracelular entre TM7 y TM8, de acuerdo a las predicciones hechas por hidropatía. Se demostró la existencia de glicosilación *in vivo* al observar una disminución en el peso de la proteína tras el tratamiento con N-glicosidasa F, a partir de proteínas extraídas de riñón de rata. Después se realizaron ensayos de captación en ovocitos de *Xenopus laevis* con las clonas mutantes, y se observó una disminución en la actividad del 50% en las clonas con un solo sólo sitio mutado, y del 90% con los dos sitios mutados. Se comprobó que esta disminución se debía a una alteración en el procesamiento de la proteína que impedía la llegada de ésta a la membrana celular. Finalmente, se observó que el prevenir la glicosilación aumentaba la afinidad del transportador tanto por Cl⁻ como por metolazona, y se propuso que esto se debía a un impedimento estérico para la unión del Cl⁻ o del diurético ejercido por los carbohidratos que desaparecía al prevenirse la glicosilación (42).

Con estos antecedentes, en 2006 Moreno et. al. publicaron un trabajo del cual una parte estaba enfocado en conocer si este efecto de las glicosilaciones también podía ser observado en NCCfl, pero se observó que en el NCCfl la eliminación de los tres sitios de glicosilación de este transportador no tiene efecto ni en la afinidad por Cl⁻, ni en la afinidad por metolazona. Además se construyeron quimeras entre NCCfl y NCCr que intercambiaban exclusivamente el asa extracelular entre las regiones TM 7 y 8 (asa 7-8) y mutantes en que se eliminaron los sitios de glicosilación correspondientes a ese transportador y se introdujeron los de la otra especie. Esto se hizo con el fin de determinar si las diferencias en afinidad observada entre cotransportadores (ver sección II.7) podía atribuirse a elementos estructurales en esta región, dada la evidencia previa de la posibilidad de alterar valores cinéticos al modificar la glicosilación. Sin embargo, los resultados fueron negativos ya que todos los cotransportadores en los que se insertaron elementos de su contraparte mostraron afinidades similares a la del cotransportador original, demostrando que los elementos estructurales que determinan las diferencias en afinidad no se encuentran en esta zona (66).

En un trabajo en que se analizó el efecto de diversos polimorfismos sobre la actividad del cotransportador se identificó uno de ellos, el G264A, que disminuye la actividad al 50% sin afectar la síntesis, glicosilación o tráfico de la proteína, y que tiene una mayor afinidad por Cl^- y metolazona. Éste trabajo, junto con el de Hoover et. al. ya mencionado, presentaron evidencia apoyando una antigua noción de que el Cl^- y las tiazidas compiten por el mismo sitio de unión en el cotransportador, lo cual fue inicialmente propuesto por Tran et. al. (90) desde antes de la clonación de éste.

El análisis químérico realizado en el trabajo de Moreno et. al. de 2006 (66) no sólo se limitó al asa 7-8, sino que se analizaron varios dominios que en su conjunto abarcaban la secuencia completa de la proteína.

Se generaron una gran cantidad de quimeras entre NCCfl y NCCr que intercambiaban ya sea el extremo amino, el carboxilo, la región que comprende desde el segmento TM1 al segmento TM 7 (región TM 1-7), la región que comprende desde el segmento TM8 al 12 (región TM8-12) o dos de estas regiones al mismo tiempo. Para cada una de éstas se realizaron las cinéticas necesarias para conocer las afinidades por ambos iones y por metolazona con el fin de determinar las regiones involucradas en conferir la diferencia de afinidad entre cotransportadores. Los resultados obtenidos demostraron que el introducir el extremo amino o el extremo carboxilo de un cotransportador en el otro, no producía cambios en la afinidad de éste ni por los iones ni por la metolazona, al igual que lo observado con las quimeras del asa 7-8 (figura 11).

Por el contrario, con el intercambio de las regiones TM sí se observó alteración en las afinidades. Es interesante señalar que la región TM central es la zona más conservada de la proteína, de acuerdo al esquema con los porcentajes de identidad de cada región mostrado en la figura 12, y que a pesar de esto, las diferencias cinéticas entre especies están determinadas por esta parte del transportador.

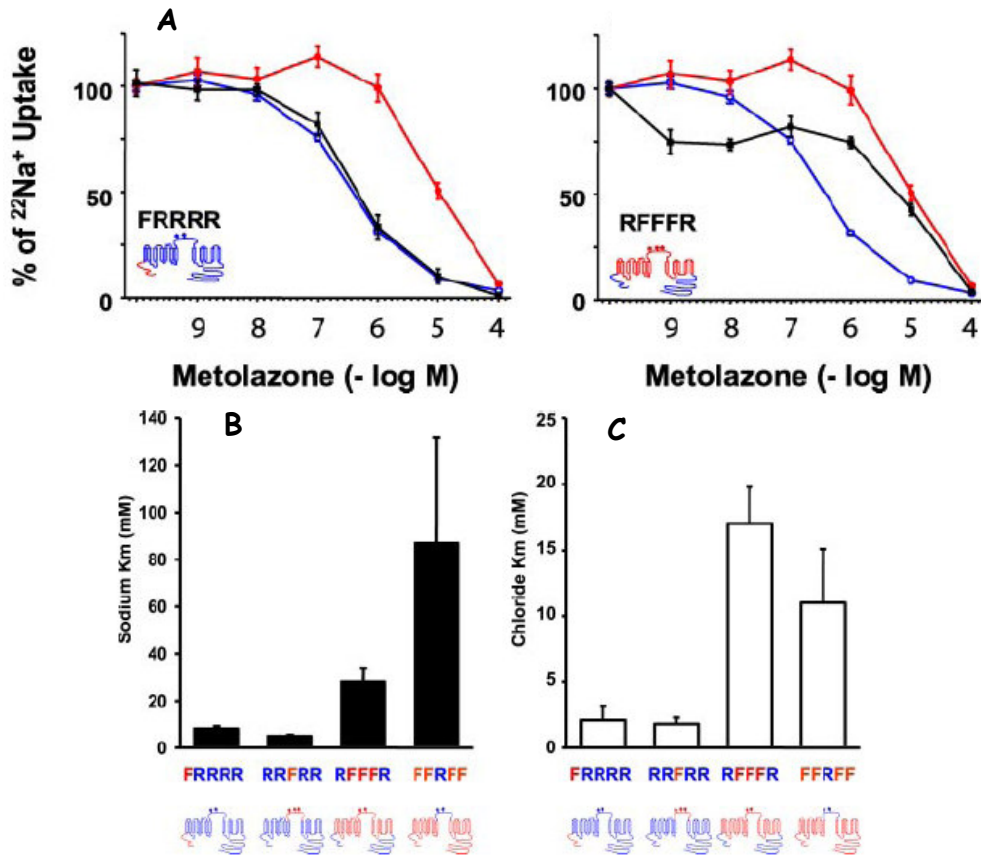


Figura 11. Resultados experimentales que comprueban que en el dominio transmembranal central del cotransportador se localizan los elementos de secuencia que determinan la diferencia en afinidad por metolazona (A), Na^+ (B) y Cl^- (C) entre NCCr y NCCfl. En el panel A la curva dosis-respuesta mostrada en negro corresponde a la de la quimera, la roja corresponde a NCCfl y la azul a NCCr. Tomado de Moreno et. al., 2006 (66).

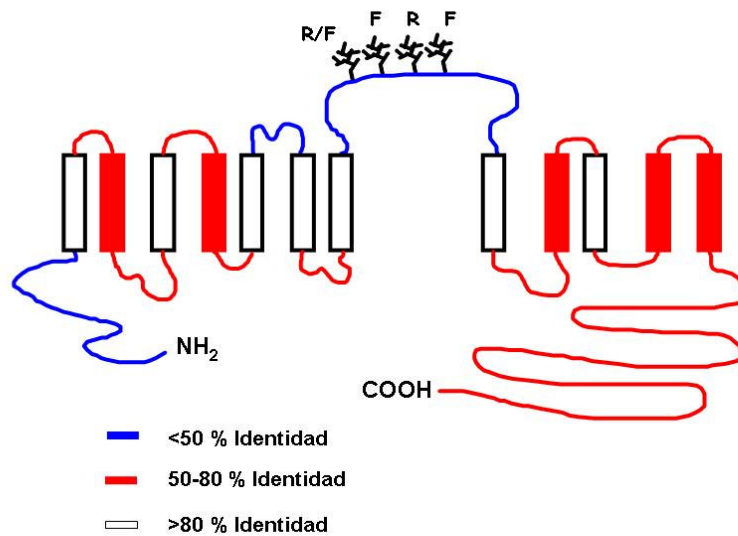


Figura 12. Porcentaje de identidad entre NCCr y NCCfl a lo largo de la secuencia de la proteína. El NCCr tiene dos sitios de glicosilación en el asa 7-8, mientras que el NCCfl tiene tres sitios, de los cuales sólo uno es el mismo que encontramos en NCCr y los otros dos son sitios completamente distintos.

Como se puede ver en la figura 13, en el panel B, las dos quimeras que tienen la región TM 8-12 de NCCr tienen afinidad por metolazona similar a éste, mientras que la quimera que consiste en NCCr con región TM 8-12 de NCCfl se comporta como NCCfl. Esto sugiere que los componentes de secuencia que definen las diferencias en afinidad por tiazidas entre NCCr y NCCfl se localizan en esta región. Para los sustratos de transporte se hicieron observaciones similares. Como se muestra en la figura 13D, la afinidad por Cl⁻ se mantiene mientras esté presente la región TM 1-7, o sea que la región que define las diferencias en la Km para este ion es diferente a aquella que define las diferencias por metolazona.

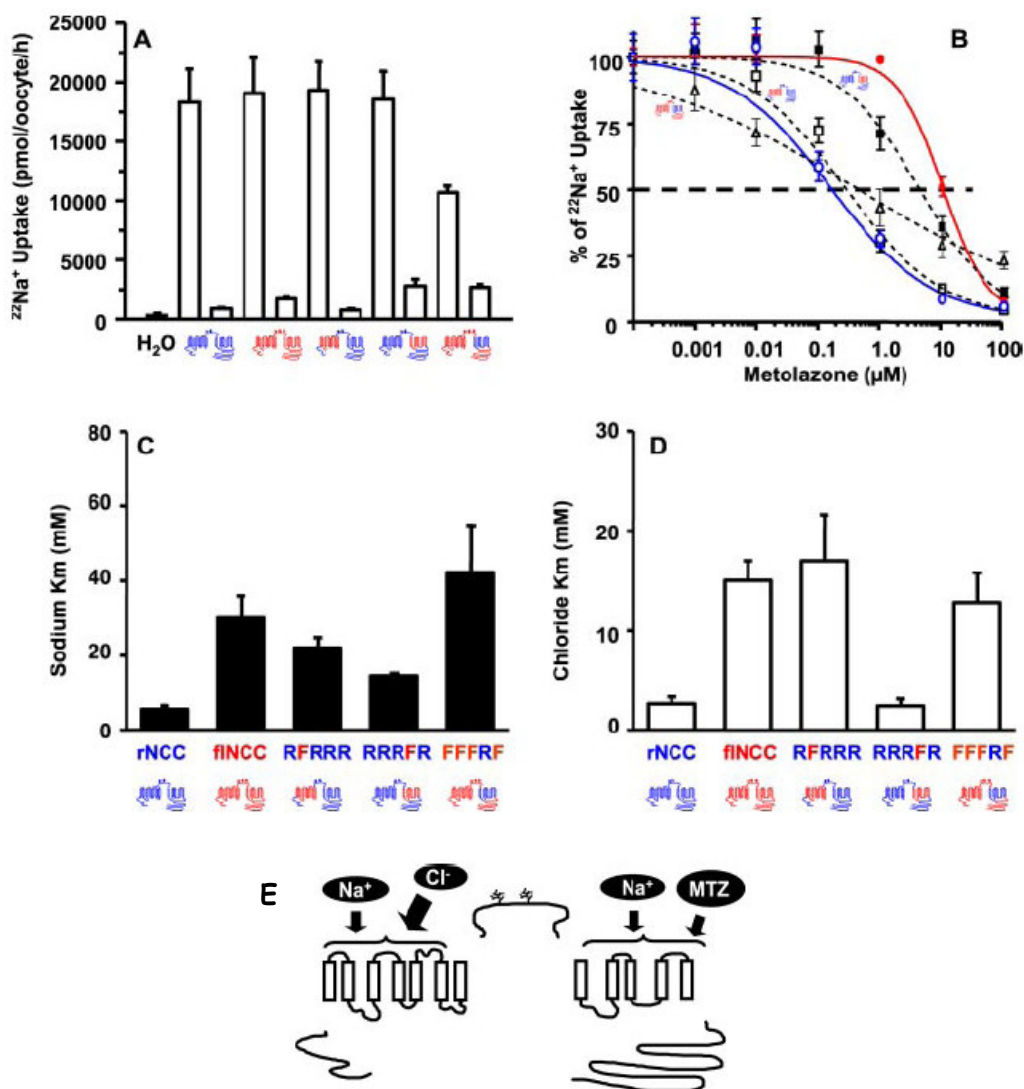


Figura 13. Caracterización cinética de quimeras entre NCCfl y NCCr que intercambian los segmentos TM 1-7 u 8-11. La región TM 8-12 determina la afinidad por metolazona de las quimeras (B), mientras que la región TM 1-7 determina el tipo de afinidad por Cl⁻ (D). Tanto TM 1-7, como TM 8-12 contienen elementos responsables de las diferencias en afinidad por Na⁺ (C). En el panel B se muestra en rojo la curva de dosis-respuesta de metolazona de NCCfl y en azul la de NCCr. E, dominios que definen las diferencias de afinidad entre NCCr y NCCfl (66).

A primera vista, esto parece oponerse a la hipótesis de que el sitio de unión para Cl⁻ y tiazidas en NCC es el mismo, sin embargo, otra posibilidad es que estos dos ligandos efectivamente compartan ciertas interacciones con la proteína, pero que además existan otras interacciones exclusivas tanto para las tiazidas, como para el Cl⁻ y que éstas sean las que varían entre NCCfl y NCCr. De esta forma las diferencias en afinidad para cada uno de estos ligandos podría deberse a cambios en regiones diferentes de la proteína. En el modelo de la figura 14, se explica una situación de este tipo, que conserva la característica de competencia por el sitio de unión. Sin embargo, es importante resaltar que la controversia no está resuelta.

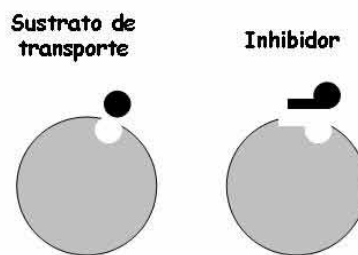


Figura 14. Modelo que explica la posibilidad de que una modificación en la secuencia altere la afinidad por un inhibidor competitivo sin afectar la afinidad por el sustrato con el cual compete.

Por último, en la figura 13c se observa que, en el caso del Na⁺, ambas regiones TM tienen cierta relevancia en definir las diferencias en afinidad, ya que el intercambio de estos dominos no genera cambios completos en la afinidad, sino que se obtienen transportadores con Km intermedias entre la Km de NCCfl y NCCr. En otras palabras, la introducción de la región TM1-7 o TM 8-12 de NCCr en NCCfl no genera un transportador con una afinidad similar a la de NCCr, pero sí aumenta un poco la afinidad de éste en comparación con la afinidad original de NCCfl. Lo mismo ocurre en las quimeras construidas sobre NCCr. Esta corresponsabilidad de las dos regiones, sugiere que en ambas existen sitios importantes para la unión de Na⁺ y que, por lo tanto, estas regiones interactúan entre sí cuando la proteína está plegada correctamente en la membrana celular.

Tomando en cuenta los experimentos discutidos en los párrafos anteriores, Moreno et al. Propusieron el modelo que se muestra en la figura 13e, en el que se señalan las regiones responsables de las diferencias en afinidad entre NCCfl y NCCr por cada uno de los ligandos.

II.11 Trabajos de estructura función en otros cotransportadores de la familia

Previo al trabajo de las quimeras entre NCCfl y NCCr, Isenring y Forbush realizaron un trabajo similar utilizando los cotransportadores NKCC1 de tiburón (NKCC1s) y de humano (NKCC1h). Éstos cumplen también con la característica de tener afinidades diferentes para todos los ligandos. De manera muy breve, los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Se demostró primero que la región transmembranal central contiene los elementos responsables de las diferencias en afinidad, y luego se realizaron quimeras que intercambiaban subdominios de la región TM central y se utilizó también mutagénesis puntual con el fin de delimitar los aminoácidos específicos responsables de estas diferencias. Así se demostró que el intercambio de la región TM2 genera cambios en la afinidad por Na^+ y K^+ , el de la región TM4 por K^+ y Cl^- y el de la región TM7 por los tres iones. Todo esto se resume en la figura 15A. En la figura 15B se muestra la probable localización de estos residuos dentro de la alfa hélice que forma cada región TM. Cabe señalar que no todos los residuos involucrados en los cambios de afinidad se encuentran en la cara hidrofílica de la hélice, que es a la cual, supuestamente, podrían tener accesibilidad los iones. Por lo tanto, probablemente algunos de estos residuos puedan estar participando en la formación del sitio de unión, pero también es probable que los cambios en afinidad se den, en otros casos, de manera secundaria a una modificación en la estructura de la proteína.

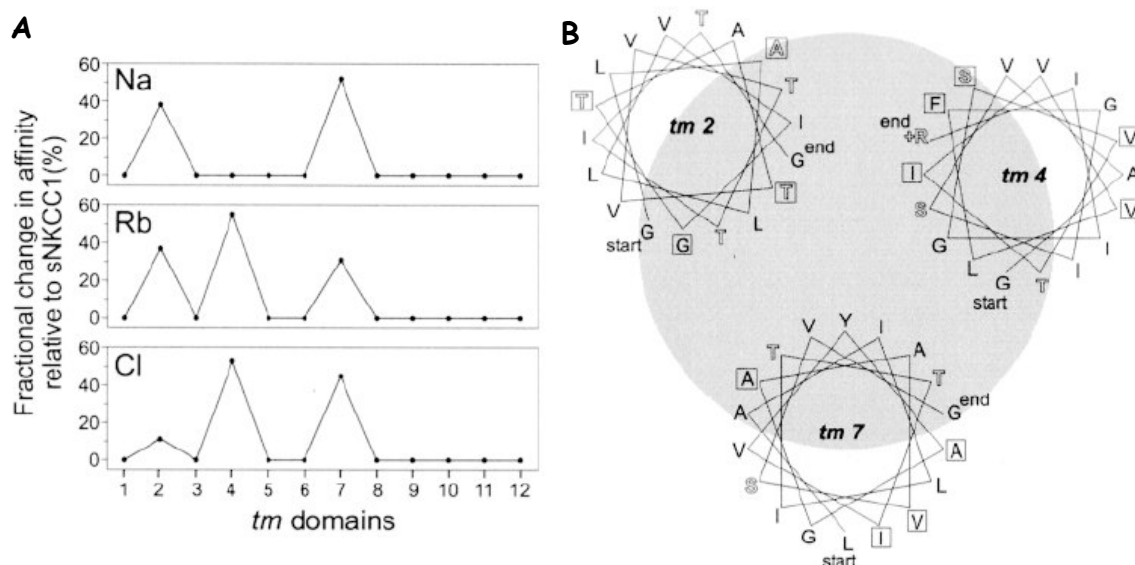


Figura 15. A, segmentos TM involucrados en las diferencias en afinidad por los iones entre NKCC1s y NKCC1h. B, modelo sobre la posible configuración de las α -hélices formadas por la región TM 2, 4 y 7. La posible cara hidrofílica, identificada por la presencia principal de aminoácidos polares se dibuja dentro del círculo gris. Los residuos asociados a las diferencias en afinidad según los trabajos de Isenring y Forbush se muestran encerrados por un cuadrado. Figura tomada de Isenring, P, et. al., 1999 (45), (46), (47), (48).

En cuanto a la bumetanida, no se pudo construir un modelo para explicar los resultados debido a que las quimeras complementarias no mostraban un comportamiento de imagen en espejo, es decir, el introducir un dominio de NKCC1s en NKCC1h no generaba el cambio opuesto al observado al introducir un dominio de NKCC1h en NKCC1s (45), (47), (46), (48). Respecto a NKCC2, un análisis funcional de tres distintas isoformas, A, B y F, del transportador, que difieren en una región que comprende a la región TM2 y al segmento que conecta a TM2 con TM3, reveló que estas variantes tienen afinidades diferentes por los iones y por bumetanida (71), (35). Quimeras realizadas entre las isoformas A y F del transportador de tiburón sugirieron que, tanto la región TM2, como el asa entre TM2 y TM3 son importantes para definir la afinidad por cationes, mientras que sólo la región interconectara es responsable de la diferencia en afinidad por Cl⁻. Algo inesperado fue que, para la bumetanida, la región que produjo cambios en la afinidad al ser intercambiada fue la TM2, y esto fue sorprendente ya que previamente se había propuesto un sitio de unión compartido para la bumetanida y el Cl⁻ en NKCC1 y NKCC2 en base a los resultados de un análisis de unión de [³H]Bumetanida a membranas de médula renal de perro y a un análisis cinético en glóbulos rojos (26), (38).

El objetivo final de este tipo de análisis es el de obtener información sobre los elementos de secuencia importantes para la función de la proteína. Dado que la mayoría de los análisis hechos se han basado en la comparación de cotransportadores del mismo tipo (que realizan la misma función en distintas especies), no se ha ahondado en las diferencias estructurales que determinan la capacidad de realizar funciones diferentes, por ejemplo, de transportar K⁺ y Na⁺ en vez de sólo transportar Na⁺, o bien de tener sensibilidad a diuréticos de asa (como la bumetanida o furosemide) o a diuréticos tipo tiazida. Solo existen dos trabajos a este respecto. Uno ya fue discutido y es de Tovar-Palacio et. al. sobre las quimeras entre NCC y NKCC, en las que se demostró que los residuos de amino ácidos y dominios que determinan la especificidad para la translocación de iones o inhibición por cierto diurético residen en las regiones transmembranales. En el otro estudio se llevó a cabo la caracterización funcional de una isoforma de NKCC2 que se comporta como cotransportador de Na⁺:Cl⁻, es decir, con actividad independiente de K⁺, pero conservando la sensibilidad a bumetanida. Esta isoforma denominada NKCC-S (NKCC-short) consiste en una versión truncada en el extremo carboxilo terminal que sólo contiene 129 aminoácidos, en comparación con la extensión normal de este dominio que es de 457 residuos. Estas observaciones demuestran que, de alguna manera, el extremo C-terminal es capaz de determinar la capacidad de funcionar o no en ausencia de K⁺ y de poder o no transportar a este catión.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

El objetivo en este trabajo fue identificar los residuos o elementos estructurales específicos en la región TM 8 a 12 de NCC que sean responsables de la diferencia en afinidad por tiazidas entre NCCr y NCCfl.

III.2 Objetivos específicos

1. Definir el papel de cada segmento TM dentro de la región TM 8-12 sobre las propiedades funcionales del cotransportador.
 - a. Generar clonas de NCCr en las que una de las regiones TM8 a 12 sea idéntica a la del NCCfl.
 - b. Caracterizar funcionalmente las clonas obtenidas.
2. Una vez identificados los segmentos TM involucrados en las diferencias funcionales delimitar esta responsabilidad a aminoácidos específicos.
 - a. Generar mutantes con una o una combinación de las sustituciones hechas en la mutante de la región TM completa.
 - b. Caracterizarlas funcionalmente.
3. Determinar si los efectos observados en las mutantes construidas sobre NCCr se comportan de manera opuesta en NCCfl.
4. Evaluar el efecto de compuestos modificadores de cisteínas, como los metanotiosulfonatos, sobre la actividad basal del cotransportador silvestre con el fin de sentar las bases para el uso de estos compuestos en estudios de estructura-función.

IV. HIPÓTESIS

El o los residuos de aminoácidos responsables de la diferencia en afinidad por tiazidas entre NCCr y NCCfl se localizan en las regiones TM 8 a 12 y la sustitución de residuos dentro de estas regiones permitirá su identificación.

V. METODOLOGÍA

V.1 Identificación de residuos potenciales y construcción de mutantes

Debido a que los valores de los parámetros cinéticos para inhibición por tiazidas de los NCC de mamíferos son similares entre ellos, pero distintos a los de NCCfl, generamos la hipótesis de que una o más posiciones en la secuencia de las regiones TM pueden explicar esta diferencia. El universo de búsqueda fue restringido por Moreno et al. (66) a las regiones TM 8-12. Por lo tanto, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias en el cual se comparó la estructura primaria de las regiones TM 8 a 12 de varios NCC de mamífero (rata (29) , ratón (31), conejo (55) y humano (35) y del NCC de lenguado (28). De esta manera, se identificaron posiciones dentro de la secuencia en las cuales el aminoácido presente está conservado en todas las especies, menos en la secuencia de NCCfl. Solamente se tomaron en cuenta los cambios no conservados.

Una vez identificados estos aminoácidos, se diseñaron mutantes en las que se insertaran los aminoácidos presentes en NCCfl en el cotransportador de rata con el fin de generar clonas de éste último que tuvieran, cada una, una región TM de NCCfl. Posteriormente se diseñaron también mutantes con una o una combinación de las sustituciones hechas en la mutante de la región TM completa, con el fin de estudiar el papel de estas mutaciones por separado. Finalmente, en base a los resultados obtenidos con las mutantes de NCCr, se construyeron mutantes sobre NCCfl para complementar los resultados.

Las mutantes se construyeron mediante mutagénesis puntual utilizando el kit “*QuickChange*” de Stratagene, el cual se basa en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó como templado el DNAC de NCCr (29) insertado en el vector de expresión pSPORT1. Para asegurar la presencia de las mutaciones deseadas, y la ausencia de mutaciones no deseadas que se pudieran haber generado durante la PCR, el fragmento de DNAC que debía contener la o las mutaciones (contenido entre dos sitios de restricción únicos) fue secuenciado en su totalidad y subclonado en un plásmido idéntico al utilizado como templado para la PCR. Esto se hizo mediante digestión en sitios de restricción insertados previamente, mediante mutaciones silenciosas (Sac II y Hpa I, ver referencia (66)), en puntos estratégicos de la secuencia de NCC que nos permitieron “cortar y pegar” justamente la región TM 8-12 (66). Los fragmentos obtenidos se ligaron a un plásmido con NCC cortado con las mismas enzimas, y únicamente la secuencia de la región subclonada se confirmó mediante secuenciación automática.

V.2 Experimentos de expresión funcional

Para estos experimentos se utilizó el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. En las siguientes secciones se describe paso a paso esta técnica.

a. Síntesis in vitro de RNAc

Para preparar el RNAc necesario para la microinyección de ovocitos, las clonas mutantes y silvestres necesarias fueron digeridas, en todos los casos, en el extremo 3' con la enzima de restricción NotI (New England Biolabs, Carlsbad, CA) y el RNAc se sintetizó *in vitro* utilizando el sistema de transcripción mMMESSAGE mMACHINE™ de Ambion, el cual funciona a base de una polimerasa de RNA T7. El vector en el cual se manejaron las clonas (pSPORT1) es un vector de expresión que contiene un promotor T7 en la región 5' por lo que funciona bien con este sistema.

La integridad del RNAc obtenido se confirmó en geles de agarosa y su concentración se determinó leyendo la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta ser utilizadas.

b. Extracción, preparación e inyección de ovocitos.

Los ovocitos se extrajeron mediante cirugía de ranas hembras adultas anestesiadas con triclaína (0.17 %). Se incubaron durante 3 horas en colegenasa tipo II a 3 mg/ml disuelta en la solución ND96 sin calcio (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl, 5 mM Hepes, pH 7.4, ~204 mOsm). Finalizado este periodo, se lavaron con ND96 (las mismas concentraciones de los compuestos ya mencionados más 1.8 mM de CaCl₂) y se desfolicularon manualmente. Posteriormente se inyectaron con ayuda de un micromanipulador y un microinyector, con 50 nL de RNAc cada uno, a una concentración de 0.4 µg/µl (20 ng de RNAc/ovocito), y se incubaron en ND96 (que es una solución isotónica) con gentamicina (5mg/100ml) durante 48-72 horas. Aproximadamente 2 horas antes de los ensayos de captación los ovocitos se incubaron en ND96 libre de Cl⁻ (96 mM isetonato de Na⁺, 2 mM gluconato de K⁺, 1.8 mM gluconato de Ca²⁺, 1 mM gluconato de Mg⁺, 5 mM Hepes, pH 7.4). Esto con la

finalidad de disminuir la concentración de Cl⁻ intracelular para favorecer el transporte durante el periodo de captación (69).

c. Ensayos de captación

La actividad de cada clona de NCC se determinó midiendo la captación de ²²Na⁺ en grupos de 10 ovocitos para cada una de las condiciones experimentales. Esto se hizo de la siguiente manera. Los ovocitos se expusieron a una solución de precaptación durante 30 min, que consistió en ND96 sin Cl⁻ (ver arriba) con ouabaína 1 mM, amilorida 0.1 mM, bumetanida 0.1 mM y, para los grupos que fungieron como control, para verificar que la captación observada era sensible a tiazidas, se utilizó metolazona 0.1 mM. Posteriormente se pasaron a una solución de captación (40 mM NaCl, 56mM NMDG Cl-, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl, 5 mM Hepes, pH 7.4) con las mismas concentraciones de drogas que en la precaptación y con 1 µCi de ²²Na⁺/ml, durante 60 min, a 32 °C. Al final de este periodo los ovocitos se lavaron 5 veces en una solución de captación idéntica (sin ²²Na⁺ o fármacos) a 4°C para detener el transporte y remover el isótopo no captado. Cada ovocito se colocó en un tubo especial para medir β-centelleo en el cual se lisó con SDS al 10% y se agregó líquido de centelleo para después medir la emisión de radiación β en un contador. Los fármacos usados en el experimento tienen la finalidad de bloquear cualquier vía endógena ajena a NCC por la cual se pueda captar Na⁺ y que por lo tanto pueda alterar los resultados de los experimentos cuyo objetivo es medir exclusivamente la captación mediada por NCC. La ouabaína inhibe la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺, la amilorida inhibe a los canales de Na⁺ del ovocito y la bumetanida inhibe a un NKCC1 endógeno, cuya existencia se ha comprobado previamente (82), (13), (29). Además, en todos los experimentos se incluyó un grupo de ovocitos inyectados con agua, el cual se sometió a las mismas condiciones que los demás grupos, con la finalidad de verificar que en ausencia de transportador inyectado no se observara captación de Na⁺.

Para determinar la afinidad por metolazona se realizaron curvas de dosis-respuesta. Esto se hizo exponiendo diferentes grupos de ovocitos inyectados a concentraciones crecientes de metolazona, desde 10⁻⁸ M a 10⁻⁴ M, tanto en la precaptación como en la captación. Se realizaron al menos dos curvas de este tipo para cada clona.

Para estudiar la cinética del transporte de iones de las clonas mutantes y silvestres se midieron las captaciones en grupos de ovocitos inyectados con la misma clona en presencia de concentraciones crecientes de Na^+ o Cl^- en el medio. Para mantener la osmolaridad y fuerza iónica, se utilizaron sales de isetionato para sustituir el Cl^- y sales de N-metil-D-glucamina para sustituir el Na^+ . La concentración de Na^+ se varió desde 2 a 80 mM, y la de Cl^- desde 0 a 60 mM. Se realizaron al menos dos experimentos de este tipo para cada clona de interés.

V.3 Ensayos de Western blot

Para cuantificar la cantidad total de NCC expresado y poder evaluar si las mutaciones generaban alguna alteración a este nivel se realizaron ensayos de Western blot. La clona silvestre utilizada fue previamente fusionada a un epítoto FLAG que se colocó después de la primer metionina (66). Todas las mutantes se construyeron sobre ésta, con el fin de poder utilizar anticuerpos anti-FLAG para poder detectar a la proteína. El protocolo seguido fue el siguiente.

Grupos de 40 ovocitos, cada uno inyectado con una clona de interés diferente, se lisaron en 5 μL /ovocito de solución de homogenización (CellLytic, M Cell lysis reagent, Sigma). Los lisados se centrifugaron 4000 rpm, durante 5 min y se recuperó el sobrenadante. La cantidad total de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford (11). Se corrieron 50 μg de proteína de cada muestra en geles de poliacrilamida-SDS al 8%. Posteriormente, las proteínas fueron trasferidas a membranas de nitrocelulosa y éstas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en agente bloqueador (Biorad) al 0.4% en TBS-Tween. La incubación con el anticuerpo anti-FLAG (1:1000, monoclonal, acoplado a peroxidasa, Sigma-Aldrich) se realizó durante una hora a temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL de Amersham. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría con el programa "Kodak 1D, Scientific Imaging Systems". Los valores de la densitometría se normalizaron con respecto a los valores obtenidos en el inmunoblot contra β -actina, el cual se realizó sobre la misma membrana utilizando como anticuerpo primario un monoclonal anti- β -actina (1:5000, Sta. Cruz Biotechnology) y como secundario un anti-cabra IgG acoplado a peroxidasa (1:10000, Sigma-Aldrich).

VI. RESULTADOS

VI.1 Alineamiento y diseño de mutantes TM

En la figura 16 se muestra el alineamiento realizado de las regiones TM 8 a 12 de acuerdo a lo ya explicado en la sección de metodología. Es notable el alto grado de identidad que existe entre todos los cotransportadores en esta región. Como era de esperarse, al ser la especie más alejada filogenéticamente, la secuencia más divergente es la de NCCfl.

Como se observa, las regiones 8 y 10 están completamente conservadas en todas las especies. Solamente en las regiones TM 9, 11 y 12, se encontraron posiciones dentro de la secuencia en las cuales el aminoácido presente está conservado en todas las especies menos en la secuencia de NCCfl. En la TM 9 se encontró una alanina presente en todos los mamíferos, pero sustituida por treonina en lenguado, y otra alanina sustituida por cisteína. En la TM 11 encontramos tres residuos en situación similar: una alanina sustituida por serina, una isoleucina sustituida por cisteína y una serina sustituida por cisteína. En la TM 12 solo encontramos una valina sustituida por treonina. Con la finalidad de estudiar la posibilidad de que estos cambios en la secuencia pudieran explicar las diferencias cinéticas entre los cotransportadores de mamífero y el cotransportador de lenguado, se diseñaron tres mutantes que se construyeron sobre el NCC de rata a las cuales les dimos el nombre de TM9, TM11 y TM12. La mutante TM9 comprendía las mutaciones A510T y A516C, la mutante TM11 con las mutaciones A568S, I574C y S575C, y la mutante TM12 con únicamente la mutación V601T.

Dado que todos los demás aminoácidos de las regiones TM están conservados, se puede postular que, mediante esta estrategia, se generaron clonas de NCCr con segmentos transmembranales de NCCfl, lo cual nos fue útil para estudiar si alguno de estos segmentos es importante para definir las diferencias en afinidad.

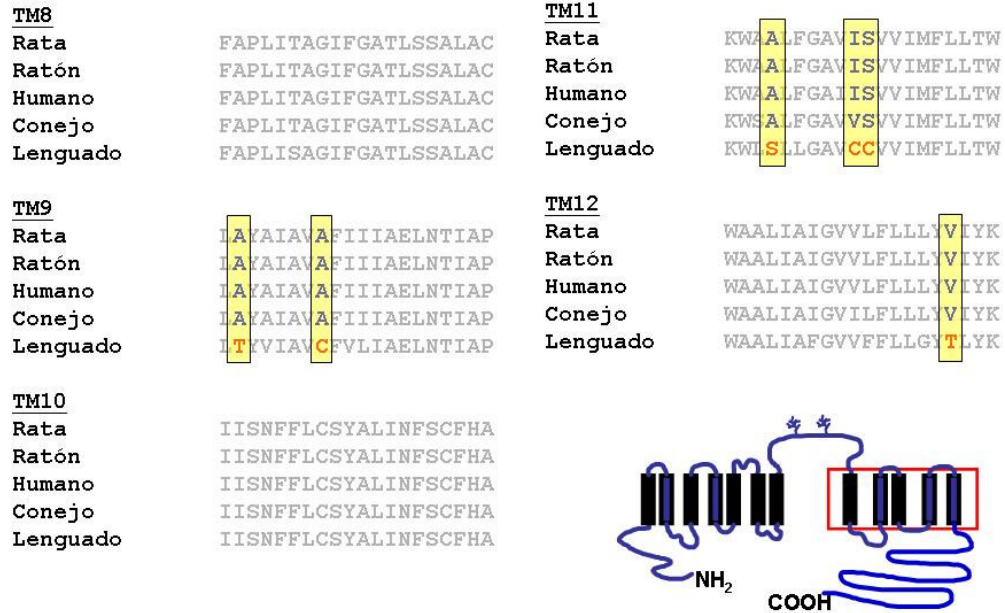


Figura 16. Alineamiento de secuencias de las regiones TM 8 a 12 de todos los NCCs clonados hasta el momento. Resaltados en amarillo se pueden ver los aminoácidos que solamente cambian en NCCfl, los cuales se mutaron para el fin de este trabajo.

VI.2 Caracterización funcional

Una vez construidas las primeras mutantes, realizamos la caracterización funcional de éstas, previa subclonación y comprobación mediante secuenciación automatizada de DNA. Se determinó primero la captación mediada por cada una de las clonas en ausencia y presencia de tiazidas para verificar que los cotransportadores generados fueran funcionales. Para fines de comparación, la captación observada en NCCr silvestre fue tomada como 100% y el valor obtenido con las mutantes fue normalizado. Como se muestra en la figura 17, observamos que las mutantes TM9 y TM12 tienen un nivel de actividad similar al NCCr nativo, mientras que la mutante TM11 presenta un nivel de actividad basal alrededor de un 20% mayor y esta diferencia es estadísticamente significativa (figura 17).

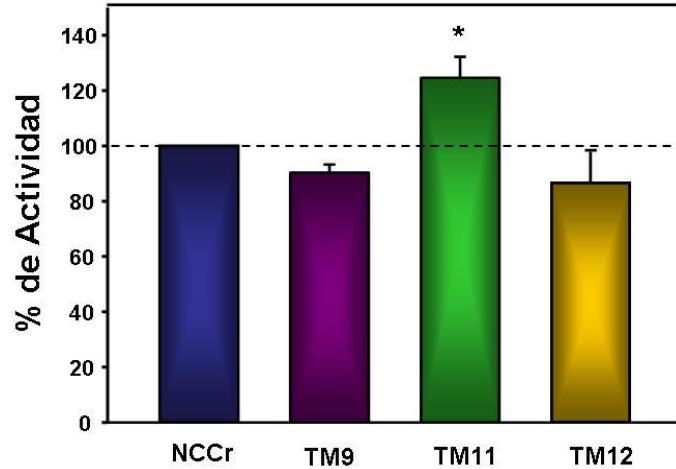


Figura 17. Actividad basal de las mutantes TM 9, TM11 y Tm12 respecto al NCCr silvestre. Las mutaciones no afectan la actividad del cotransportador en los casos de las mutantes TM9 y Tm12, y en el caso de la TM11 producen un aumento en la actividad basal.

Gracias a que las mutaciones no abatieron la función del cotransportador, se pudo proceder a la caracterización cinética. Se midió la actividad de los distintos transportadores en presencia de concentraciones crecientes de Na^+ o Cl^- y se calcularon los valores de K_m para cada uno de los iones. En la tabla 2 se presentan los valores exactos calculados y en la figura 18 se muestran los ajustes a partir de los cuales se obtuvieron estos valores. Como era de esperarse en base a las observaciones de Moreno, et al. (66) (ver sección II.8), las mutaciones TM9, TM11 o TM12 no generaron ningún cambio en la afinidad por los sustratos de transporte ya que las K_m de las mutantes son muy similares a la K_m del NCCr silvestre.

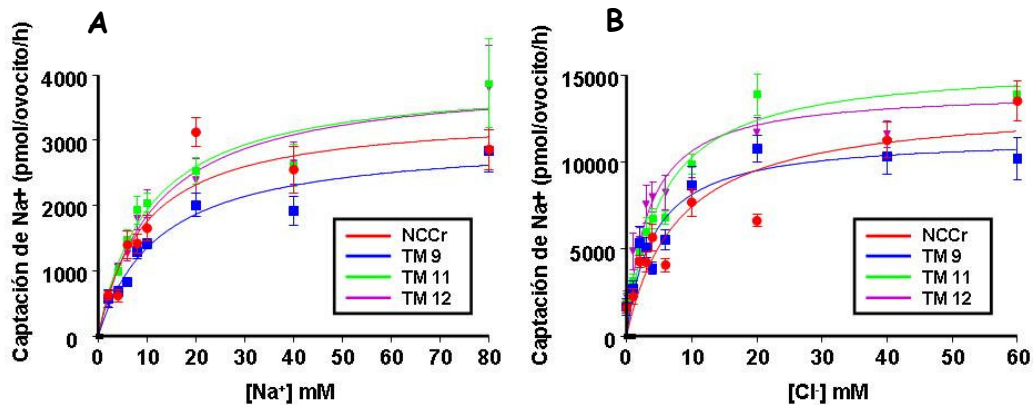


Figura 18. Captación de Na^+ dependiente de la $[\text{Na}^+]$ extracelular (A) y captación de Na^+ dependiente de la $[\text{Cl}^-]$ extracelular (B) de las clonas mutantes y del NCC silvestre. Para los ajustes mostrados se utilizó la ecuación clásica de Michaelis-Menten. Los valores de K_m obtenidos no fueron saignificativamente diferentes a los del NCC silvestre

	NCCr	TM9	TM11	TM12	NCCfl
Km (Na⁺)	6.95 ± 1.8 mM	9.2 ± 1.5 mM	7.7 ± 1.3 mM	8.6 ± 1.3 mM	30 ± mM
Km (Cl⁻)	5.25 ± 2 mM	4.1 ± 1.3 mM	4.8 ± 1 mM	3.3 ± 1.2 mM	15 ± 2 mM

Tabla 2. Valores de Km para Na⁺ y Cl⁻ obtenidos a partir del ajuste mostrado en la figura 18 para las mutantes TM9, Tm11 y Tm12.

Además se realizaron curvas de dosis-respuesta en las que se determinó la actividad del cotransportador en presencia de distintas concentraciones de tiazida (figura 19). Las curvas de todos los cotransportadores a comparar se generaron siempre de manera simultánea en grupos de ovocitos inyectados con cada una de las clonas. En todos los experimentos realizados la tiazida utilizada fue metolazona dado que la mayor parte de los experimentos de caracterización funcional previos fueron hechos con este compuesto. Con la mutante TM9 se observó una curva similar a la del NCCr ya que la concentración de inhibidor necesaria para reducir la actividad al 50% (IC₅₀) fue de 1×10^{-6} M, al igual que con la mutante TM12 cuyo IC₅₀ fue de 5×10^{-7} . En este mismo experimento el IC₅₀ del NCCr silvestre fue también de 5×10^{-7} . Sin embargo, el IC₅₀ de la mutante TM11 fue de 1×10^{-5} al igual que el del NCCfl. Por lo tanto, la introducción de tres mutaciones en la región TM 11 del NCCr fue suficiente para conferirle afinidad por metolazona muy similar a la de NCCfl, lo cual sugiere que alguno o algunos de estos tres residuos son responsables de toda la diferencia en afinidad observada entre cotransportadores. Los valores de IC₅₀ para NCCfl y NCCr silvestres reportados aquí son un poco distintos a los reportados en otros trabajos (ver tabla 1). Estas variaciones son normales de un experimento a otro debido a ligeros cambios en las condiciones experimentales (el lote de fármaco utilizado, las diluciones, etc.). Por esta razón, en todos los casos en los que se determinaron los valores de IC₅₀ de las mutantes se incluyeron como controles a los cotransportadores silvestres, y siempre, sin excepción alguna, se observó la diferencia en afinidad entre NCCr y la mutante TM11.

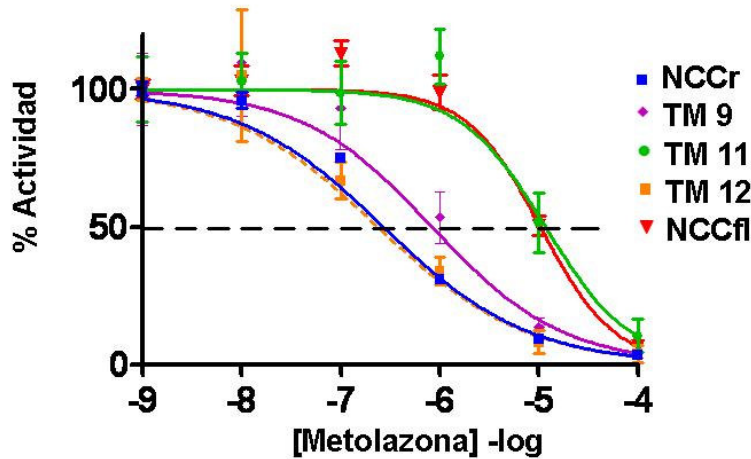


Figura 19. Experimento representativo del efecto de dosis crecientes de metolazona sobre la actividad del NCC silvestre y de las clonas mutantes. La actividad se grafica en valores porcentuales, tomando como el 100% de cada curva la actividad de la clona respectiva en ausencia de metolazona. Las barras en cada punto de la curva representan el error estandar de la captación observada en 10 ovocitos.

VI.3 Diseño y construcción de mutantes individuales

Con el fin de estudiar el papel de cada una de las mutaciones realizadas en TM11 en el cambio de afinidad por metolazona, se construyeron tres nuevas mutantes diseñadas de manera tal que con la determinación de la afinidad de éstas pudiéramos contestar cual de las 7 combinaciones posibles era necesaria para conferir a NCCr la afinidad por metolazona tipo NCCfl. Las 7 combinaciones posibles eran las siguientes: A568S, I574C y S575C; A568S y I574C; A568S y S575C; I574C y S575C; o cada una de las mutaciones por sí sola. Se construyeron sólo las mutantes sencillas **I574C** y **S575C**, y la mutante doble **I574C-S575C**. Esto debido a que los cambios de isoleucina o serina por cisteína parecían más importantes que el cambio de alanina por serina, ya que representaban la introducción de un aminoácido con características fisicoquímicas más contrastantes. Por esta razón se quiso analizar el papel de estas dos mutaciones de manera individual y además se generó la doble mutante con una doble intención. Primero, para analizar la posibilidad de que no sólo una de éstas, sino las dos mutaciones fueran necesarias, y segundo, para determinar si la mutación A568S era responsable del efecto del efecto observado en la TM11, o al menos parte de éste, lo cual sería evidente si éste o parte de éste se perdía en la doble mutante.

VI.4 Caracterización funcional

La caracterización funcional de estas nuevas mutantes consistió solamente en generar las curvas de dosis-respuesta de metolazona para cada una de las clonas. No se realizaron curvas de actividad vs. [sustrato de transporte] ya que, dado que la mutante TM11 no presentó ninguna alteración en la cinética del transporte de iones, supusimos que estas tres mutantes tampoco presentarían ningún cambio de este tipo.

Las curvas de dosis-respuesta de metolazona arrojaron los siguientes resultados (figura 20).

El IC_{50} de la mutante I574C (8×10^{-7} M) fue similar al del NCCr silvestre (1×10^{-6} M), mientras que el IC_{50} de la mutante S575C (8×10^{-6} M) y de la doble mutante (DM) (1×10^{-5} M) resultaron ser similares a los de la mutante TM11 (1×10^{-5} M), y casi un orden de magnitud mayores al de NCCr silvestre. Dado que no encontramos una diferencia significativa a lo largo de varios experimentos entre la mutante S575C y la doble mutante, concluimos que únicamente la mutación S575C es necesaria para generar el cambio de afinidad observado en las mutantes TM11, I574C-S575C y S575C, y que, por lo tanto, esta variante en la secuencia entre NCCr y NCCfl es responsable de la diferencia en afinidad por metolazona entre estos cotransportadores.

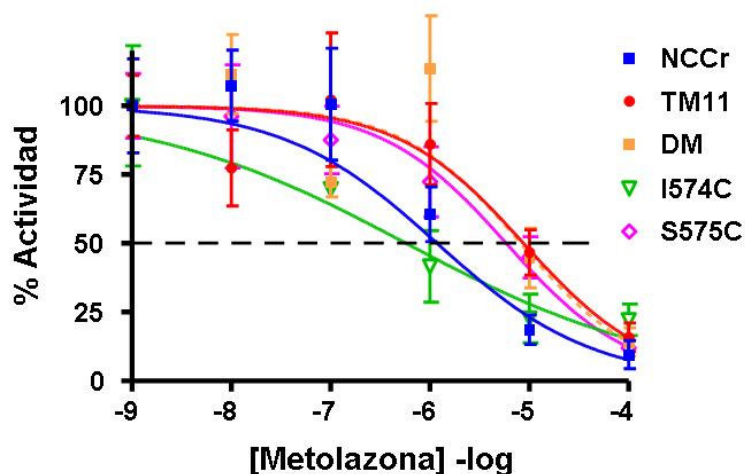


Figura 20. Experimento representativo del efecto de dosis crecientes de metolazona sobre la actividad de las mutantes individuales I574C y S575C, y de la doble mutante I574C-S575C.

VI.5 Construcción y caracterización de la mutante C576S en NCCfl

Para reafirmar la idea de que la diferencia en afinidad por metolazona entre NCCr y NCCfl se debe efectivamente a esta variación específica en la secuencia, se requiere la construcción de la mutante complementaria, o sea, la mutante NCCfl C576S, en la cual se espera encontrar una alteración opuesta a la observada en NCCr, es decir que el IC_{50} disminuya a niveles cercanos a los del IC_{50} del NCCr.

Con esta finalidad, se construyó la mutante individual C576S que, de acuerdo a lo observado en NCCr, debía ser la única sustitución necesaria para producir el cambio en la afinidad por metolazona. Ésta se analizó funcionalmente y se observó que la mutación redujo ligeramente la función del cotransportador, pero no la abatió por completo, lo que permitió la determinación de la afinidad por metolazona. Se observó una reducción en el IC_{50} de casi dos órdenes de magnitud, como muestra la figura 21. Cambios de tal magnitud fueron observados también en algunos experimentos con las mutaciones de NCCr, pero en sentido contrario. De esta manera comprobamos que es exclusivamente esta diferencia en la secuencia entre los cotransportadores de dichas especies la que determina que tengan afinidad diferente por esta tiazida.

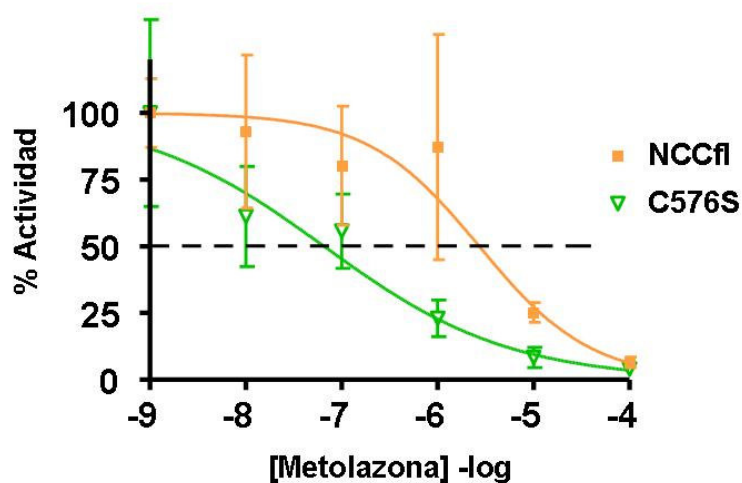


Figura 21. Efecto de dosis crecientes de metolazona sobre NCCfl y sobre la mutante NCCfl C576S. Se observa que la mutación disminuye el IC_{50} para dicha tiazida, es decir, aumenta la afinidad por ésta.

VI.6 Análisis de actividad basal y expresión proteica de las mutantes

A lo largo de los diversos experimentos realizados con las mutantes de NCCr se observó que, en condiciones de ausencia de inhibidor y de presencia de concentraciones saturantes de Na^+ y Cl^- , el nivel de actividad basal de algunas clonas mutantes variaba un poco respecto al del cotransportador silvestre. Se decidió estudiar este fenómeno, y con este fin se inyectaron de manera simultánea todas las clonas de interés en diferentes grupos de ovocitos, teniendo especial cuidado en que la cantidad de RNAc inyectada de cada clona fuera la misma (figura 22A). Con estos ovocitos se realizaron ensayos de captación y además se cuantificó mediante Western blot la cantidad de NCC expresado a nivel de proteína. En la figura 22B se observa el resultado de los ensayos de captación. Tanto la mutante TM11 como la mutante S575C presentaron un nivel de actividad basal mayor al de NCCr silvestre, mientras que la actividad de la mutante I574C fue similar. En este experimento en particular, que se muestra en la figura, no se incluyó a la doble mutante (DM), sin embargo, se realizaron otros ensayos de captación en los cuales se observó también mayor actividad en la DM en comparación con el NCCr silvestre. Dado que estos experimentos no se realizaron en conjunto con ensayos de Western blot, se eligió el experimento mostrado como representativo de los demás.

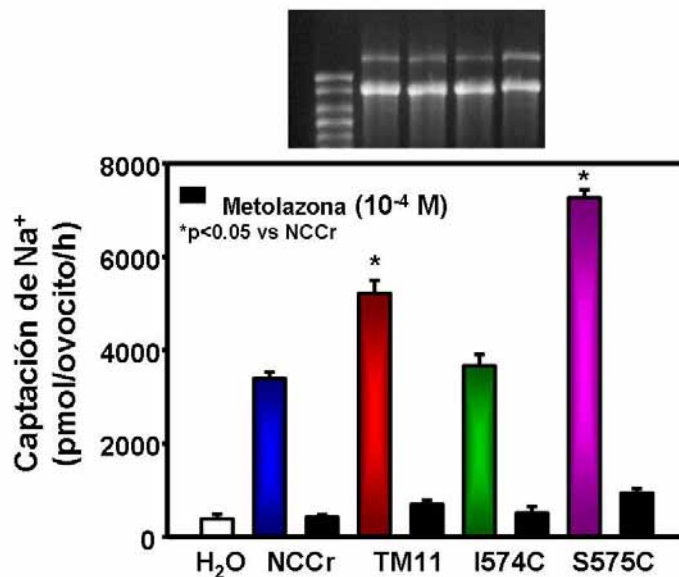


Figura 22. El análisis de los niveles de actividad basal de las mutantes demostró que todas las clonas con la mutación S575C presentan mayores niveles de actividad que el NCCr silvestre (B). Esta diferencia en la actividad no se debe a que se haya inyectado una mayor cantidad de cRNA ya que las diluciones preparadas a partir de la cuantificación en espectrofotómetro se verificaron en un gel de agarosa (A).

Los resultados sugieren que la mutación S575C es la responsable de los mayores niveles de actividad en las tres mutantes mencionadas ya que, en todas ellas, es ésta la mutación que existe en común y además de que no se observa un efecto aditivo conforme se presentan otras mutaciones además de la S575C, sino que la mutante sencilla tiene niveles de velocidad de transporte iguales o mayores que las otras mutantes.

Existen diversas razones que podrían explicar este efecto. La mutación podría estar ocasionando, por ejemplo, un aumento en la cantidad de proteína total en la célula debido a un efecto en el plegamiento que desacelere el proceso de degradación de ésta. Otra posibilidad es, que lo que esté aumentando, sea la llegada del cotransportador a la membrana debido a una alteración en algún proceso de tráfico vesicular. La última posibilidad es que la expresión total y la expresión en superficie sean normales, pero que la mutación genere un cambio estructural en la proteína que afecte las propiedades cinéticas intrínsecas de la molécula, por ejemplo, que la mutación introduzca un residuo que facilite algún cambio conformacional que se lleva a cabo normalmente en el proceso de transporte.

El Western blot de la figura 23A muestra que las diferencias observadas a nivel funcional no se pueden explicar por diferencias en la cantidad de NCCr total en la célula, es decir que la mayor actividad observada en las clonas con la mutación S575C no se podría explicar por un fenómeno de protección frente a la degradación que les confiera esta sustitución. En la figura 23B se grafican los valores de densidad óptica de las bandas correspondientes a NCC (135-150 kDa para la proteína glicosilada) normalizados con los valores de las bandas de β -actina. Según esta gráfica, la cantidad de proteína de la mutante TM11 fue menor que la de NCCr y, a pesar de esto, a nivel funcional se observó un aumento en la actividad de TM11 de más del 50%. Por su parte, la mutante S575C se expresó en niveles similares a los de NCCr silvestre y su nivel de actividad en este mismo experimento fue prácticamente del doble que el de la mutante.

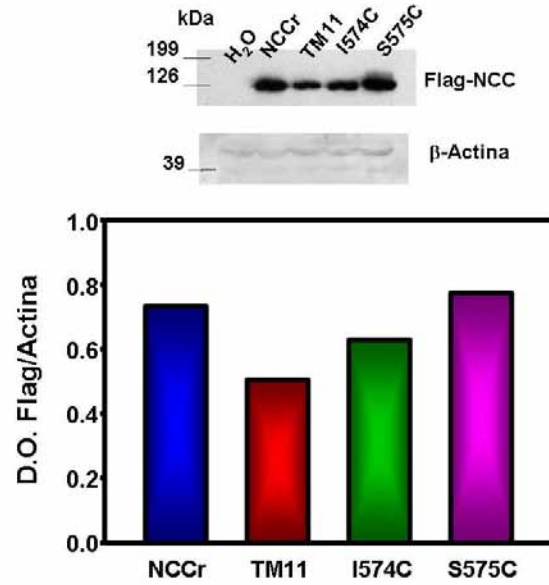


Figura 23. Western blot realizado con extractos de los ovocitos inyectados para el experimento de captación de la figura 21 (A). En el panel B se grafican los valores de densidad óptica de las bandas correspondientes a NCCr-Flag (135-150 kDa para la proteína glicosilada) normalizados con los valores obtenidos para β-actina. Se observa que la diferencia en actividad observada en la figura 21 no se debe a una mayor expresión a nivel de proteína total.

VII. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue determinar el papel de cada uno de los segmentos TM, dentro de la región TM 8-12, sobre las características funcionales del NCC.

Este análisis se facilitó gracias al alto grado de conservación que existe en los segmentos TM entre todos los cotransportadores incluidos en el análisis de alineamiento, que redujo la zona de estudio a únicamente tres regiones transmembranales, para cada una de las cuales se generó una mutante y se estudió su cinética de transporte.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con el trabajo previo de Moreno et. al. (66) (sección II.9), en que se delimitaron las zonas involucradas en las diferencias de afinidad por iones y tiazidas entre NCCr y NCCfl a la región hidrofóbica central. Ninguna de las tres mutantes TM generadas en este trabajo, TM9, TM11 o TM12, presentó cambios en afinidad por Na^+ o Cl^- . En el caso del Cl^- , esta observación coincide completamente con los resultados de Moreno et. al. quienes observaron que las diferencias en afinidad por este anión están exclusivamente definidas por la región TM 1-7. Sin embargo, para el Na^+ , el trabajo de Moreno reveló que, tanto en la región TM 1-7 como en la región TM 8-12, existen elementos estructurales que definen la diferencia de afinidad por éste. El que ninguna de las mutantes TM estudiadas aquí haya mostrado alteración en la afinidad por este catión no implica, a nuestro parecer, inconsistencia alguna con los resultados previos, sino que esto probablemente significa que estos residuos en particular no tienen ninguna relevancia en determinar la afinidad por el Na^+ .

Estos resultados además concuerdan con los dominios señalados por Isenring y Forbush como responsables de especificar las diferencias cinéticas entre formas homólogas NKCC1, ya que el análisis quimérico realizado por estos autores entre la proteína de humano y de tiburón demostró que únicamente las regiones TM 2, 4 y 7 juegan un papel en determinar las diferencias cinéticas para el transporte de iones en NKCC1 (sección II.10) (45), (46), (47), (48). La única diferencia en este caso es que, en NCC, al parecer si hay cierta participación de la región TM 8-12 en la afinidad por Na^+ , esto de acuerdo al trabajo de Moreno et. al. (66). Sin embargo, en los parámetros cinéticos de las mutantes TM individuales de este trabajo, pertenecientes a la región 8-12 no se ve una alteración para ninguno de los iones.

La finalidad principal de la construcción de las mutantes TM fue la de estudiar la afinidad por tiazidas debido a que éste era el parámetro cinético en el que más se esperaba encontrar cambios, dada la evidencia previa de que en la región TM8-12 se encuentran los residuos que determinan la diferente afinidad por tiazidas entre el NCC de mamífero y el de lenguado (66). Los resultados confirmaron lo esperado. Se logró delimitar la responsabilidad de las diferencias en afinidad por tiazidas entre NCCfl y NCCr a un solo aminoácido en la región TM 11. La sola introducción de una mutación en el segmento TM 11 del NCC de rata, la mutación S575C, fue capaz de generar un cotransportador con afinidad por metolazona similar a la del NCC de lenguado, de acuerdo al valor de IC_{50} observado, y en todas las mutantes probadas en las que esta mutación se encontraba presente también se observó este cambio en la afinidad. Esto además fue confirmado con la observación de que la mutación complementaria en NCCfl, la C576S, produjo el efecto opuesto al observado en rata, es decir el IC_{50} disminuyó a niveles cercanos a los del IC_{50} del NCCr, lo que significa que su afinidad por metolazona aumentó.

La disminución en la afinidad por metolazona observada en respuesta a la introducción de la mutación S575C en NCCr puede tener una de dos explicaciones. La primera es que este residuo forme parte del sitio de unión de las tiazidas al cotransportador, y la segunda es que la mutación esté modificando la configuración de la proteína y que esto altere, de forma alostérica, el sitio de unión de las tiazidas.

La primera posibilidad implicaría que el compuesto es capaz de acceder hasta esta región insertada en la membrana, ya que la serina 575 se localiza exactamente en la mitad de la región TM predicha. Un modelo generado sobre la posible configuración de la α -hélice formada por el segmento TM11 construido con el programa Lasergene DNASTar Versión 7.0 muestra que esta serina se localiza en la cara hidrofílica de la hélice (figura 24). En diversas estructuras cristalográficas de cotransportadores membranales se ha observado que las α -hélices TM pueden interactuar entre sí para formar una especie de poro hidrofílico que atraviesa la membrana celular a través del cual pueden atravesar los sustratos de transporte con carácter polar en respuesta a un cambio conformacional que alterna entre una configuración con el sitio de unión del sustrato en contacto directo con el medio acuoso extracelular y otra configuración en contacto con el medio intracelular. Este tipo de plegamientos se ven favorecidos porque las hélices que los forman se caracterizan por presentar cadenas laterales hidrofóbicas en una cara de la hélice, la cual queda en contacto con la membrana celular, y cadenas

laterales hidrofílicas en la otra cara que queda en contacto con el medio acuoso extracelular e intracelular. Además las cadenas laterales de estas α -hélices también interactúan entre sí. Dado que las tiazidas son compuestos bastante hidrofóbicos que atraviesan la membrana celular podríamos esperar que estas sean capaces de interactuar con el transportador prácticamente en cualquier sitio de su secuencia: tanto en las regiones TM en contacto con la membrana como en las regiones en contacto con el medio acuoso, ya sea intracelulares, extracelulares o transmembranales. El que la serina 575, determinante, como ya vimos, en la afinidad por tiazidas, pudiera formar parte directamente del sitio de unión de las tiazidas al NCC implicaría entonces que este sitio se encuentra probablemente en el poro a través del cual pasan los iones. Sin embargo, es necesario preguntarse que tan factible sería que una molécula del tamaño de las tiazidas sea capaz de acceder a un espacio al que sólo se requiere la llegada de iones para el funcionamiento adecuado del transportador. En este sentido, los experimentos que sugieren que existe competencia por el sitio de unión entre iones y tiazidas (90), (64) dan un indicio de que los diuréticos podrían ser capaces de acceder al sitio de unión de los iones.

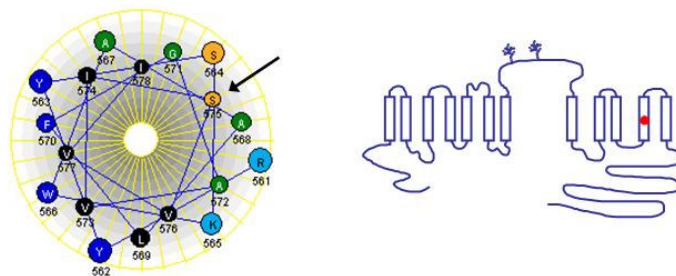


Figura 24. Localización de la serina 575 dentro de la región transmembranal 11 del NCCr. Se muestra un modelo sobre la posible configuración de la α -hélice formada por la secuencia prdicha como la región TM 11.

Otra pregunta que surge es qué grupos químicos de la molécula tiazídica podrían establecer interacciones con la cadena lateral de la serina en cuestión. El tipo de interacción que formaría un aminoácido como éste sería un puente de hidrógeno. La cisteína que sustituye a la serina en nuestra mutante es un aminoácido polar y de tamaño muy similar a la serina, sin embargo es mucho menos propenso a formar puentes de hidrógeno (37). Por lo tanto, una posible explicación para la disminución en la afinidad observada es que el grupo hidroxilo sea importante para formar una interacción de este tipo con los inhibidores, y que la fuerza de esta interacción disminuya al introducir la cisteína.

En la figura 10 se muestra la estructura química de diferentes diuréticos tipo tiazida, y se resalta a los grupos que están presentes en todas estas moléculas, sin excepción alguna (un grupo sulfonamida y un grupo electronegativo adyacente), y que, por lo tanto, probablemente son esenciales para su funcionamiento como inhibidores del transportador. Algún átomo de nitrógeno o de oxígeno de estos grupos podría funcionar entonces como aceptor de hidrógeno para la formación del puente de hidrógeno. Un experimento interesante para distinguir si la interacción se lleva a cabo con alguno de éstos grupos conservados en todas las moléculas sería el evaluar si la afinidad para todos los diuréticos se ve alterada en la mutante. Si para alguno de los compuestos no se observara un cambio en la afinidad, se tendría un indicio de que el grupo relevante para la interacción no es uno de éstos, sino que alguna característica ausente en ese compuesto y presente en todos los demás podría ser importante para la interacción con la proteína. Sin embargo, esto parece improbable ya que, como se vio en la sección II.7, el perfil de potencia de los distintos inhibidores está conservado en NCCr y NCCfl, y el IC_{50} para todas las tiazidas probadas en ambos transportadores está desplazado hacia la derecha en NCCfl (91), (64). Por lo tanto, dado que este residuo es el único responsable de la diferencia en afinidad por metolazona, es probable que también explique las diferencias en afinidad observadas con otros compuestos y que la mutación pueda producir este cambio en la afinidad.

La segunda posibilidad, el que la mutación esté alterando de alguna forma la estructura de la proteína y esto afecte, de manera indirecta, al sitio de unión de las tiazidas, representa una manera de explicar los cambios en la afinidad, aún cuando el compuesto sea incapaz de acceder al sitio de la mutación. Por otro lado, un elemento en contra de esta hipótesis es que una alteración en la estructura de la proteína, que se traduzca en un cambio en la estructura del sitio de unión, probablemente represente una modificación más importante que la que representaría la sustitución de una cadena lateral en el sitio de unión, sobre todo porque en este caso la sustitución es de una serina por una cisteína, ambos aminoácidos polares, capaces de formar puentes de hidrógeno y de tamaño similar (56), (37). Un cambio importante en el sitio de unión representaría un problema si se considera la hipótesis sobre un sitio de unión compartido entre diuréticos y iones transportados, ya que se esperaría entonces que la mutación afectara no sólo la afinidad por metolazona, sino también la afinidad por los iones. Se podría argumentar que una mutación en el sitio de unión de las tiazidas tendría que tener también, bajo esta hipótesis, un efecto sobre la afinidad por los iones. Sin embargo, existen al menos dos

formas de explicar un cambio en la afinidad por un inhibidor competitivo, que no afecte la afinidad por los sustratos de transporte. La primera, es que una parte del sitio de unión para las tiazidas y los iones sea compartido, pero que exista otra parte en el sitio de unión para tiazidas que no sea relevante para la unión de los iones, y que sea precisamente esta región la que se esté afectando con la mutación. La segunda, es que los sitios de unión sean diferentes, pero que la competencia exista debido a que la unión del inhibidor genere un cambio en la conformación del sitio de unión de los iones que afecte la unión de éstos y viceversa. En este caso una mutación en el sitio de las tiazidas probablemente no afecte la afinidad por los iones (figura 25.) (44).

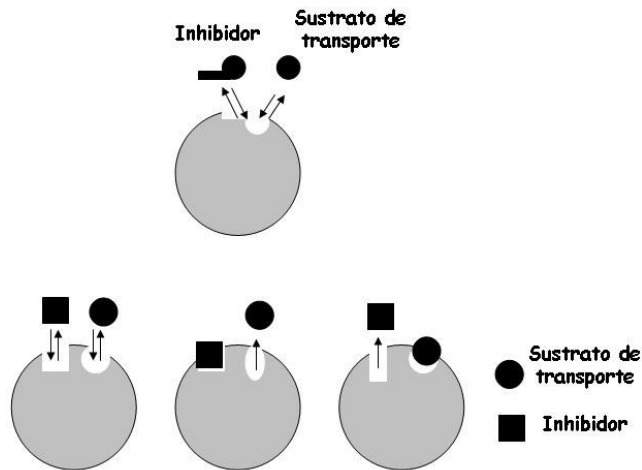


Figura 25. Modelos que explican la manera en que una mutación en el sitio de unión de un inhibidor competitivo puede alterar la afinidad por éste sin alterar la afinidad por el sustrato

Es importante resaltar, sin embargo, que la hipótesis de competencia por el sitio de unión sigue siendo un poco controversial. A favor están los experimentos de unión de [³H]metolazona a membranas de corteza renal de rata en los que se observó una disminución en la unión en presencia de concentraciones crecientes de Cl⁻ en el lumen tubular (90), el hallazgo de que la mutación G264A en el cotransportador humano afecta tanto la afinidad por Cl⁻ como por metolazona (67), y el trabajo de caracterización funcional del NCCr en ovocitos de *Xenopus laevis* en los que se observó un aumento en el IC₅₀ por metolazona al aumentar la concentración de cualquiera de los dos iones (64). Pero la controversia surge debido a que en el cotransportador de lenguado no se logró observar este efecto de las concentraciones de sustratos de transporte sobre la afinidad por metolazona (91), y también porque según las observaciones de Moreno et. al. (66) los dominios que definen las diferencias en afinidad por iones (particularmente el cloro) y tiazidas entre especies son diferentes, lo cual se confirma en el presente trabajo

(aunque esto último, como ya se dijo, no se contrapone completamente a la hipótesis de competencia).

Dada la gran importancia que tienen las cisteínas en la estructura tridimensional (secundaria, terciaria o cuaternaria) de las proteínas, el que la mutación esté afectando a esta estructura no parece improbable. Las cisteínas pueden contribuir en este sentido a través de la formación de puentes de hidrógeno o, más importante aún, de puentes disulfuro. En este caso la cisteína introducida en la mutante se encuentra en una región transmembranal en donde ambos tipos de interacción son posibles. El grupo sulfhidrilo de las cisteínas puede formar puentes de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo de la vuelta anterior de la hélice, y de esta manera estabilizar la hélice y satisfacer el potencial de formación de esta interacción en un ambiente hidrofóbico (37). Sin embargo, la serina presente originalmente en el sitio de la cisteína tiene aún mayor capacidad de formar puentes de hidrógeno, por lo que, si este fuera el caso, la mutación no representaría una alteración muy importante en la estructura; tal vez sólo una ligera modificación en el sitio de unión de las tiazidas que tendría que estar entonces muy cercano a esta ubicación transmembranal. Por otro lado, la formación de puentes disulfuro representa una amenaza más grande de generar una alteración en la estructura de la cadena polipeptídica. Por ejemplo, la formación de enlaces covalentes con residuos de cisteína distantes en la cadena podría incluso conferir una conformación diferente a la región TM11 predicha como α -hélice. La falta de información estructural hace prácticamente imposible determinar con que otra cisteína se podría estar formando un puente como tal. En el cotransportador de lengüado existen 2 cisteínas contiguas en la región TM11. Se podría pensar en la posibilidad de que estas dos cisteínas estén formando un puente que no exista en el cotransportador de rata y que esta modificación estructural sea la razón de la diferencia en afinidad por tiazidas. Sin embargo, esto queda descartado porque se requiere únicamente la introducción de la segunda cisteína en el NCCr para generar el cambio en la afinidad.

Otra manera en que dicha cisteína podría afectar la estructura sería mediante la formación de un puente disulfuro con otra cadena polipeptídica importante para la dimerización del transportador. Como ya se dijo en la sección II.6, la evidencia experimental indica que los transportadores de la familia SLC12 tienen la capacidad de formar homodímeros (70), (21), (84), (15), (65). Además existe evidencia de que la interacción puede afectar la función del transportador (70), lo cual sugiere que una modificación en la secuencia que altere la interacción entre monómeros podría generar

una alteración funcional. Para los cotransportadores de esta familia existe únicamente un trabajo en donde se tratan de determinar los dominios importantes para esta dimerización realizado en NKCC1 (70). En éste se vio que el segmento 751-998 dentro de la región C-terminal es esencial para la formación de dímeros. Sin embargo, esta observación no descarta que otras regiones puedan estar involucradas. La idea de que una región transmembranal participe en la asociación entre monómeros no es improbable ya que existen ejemplos de proteínas cuya estructura cristalográfica se conoce en los que esto sucede. Por ejemplo, en el cotransportador LeuT (Na^+ /Leucina) de *Aquifex aeolicus*, homólogo de los cotransportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+ y Cl^- eucariontes, la interfase entre dímeros está formada por las regiones TM 9 y 12 (25), y existe evidencia experimental independiente en un cotransportador eucarionte de la familia de que las regiones TM11 y 12 participan en la multimerización de la proteína (51). También existen ejemplos de transportadores en los que la formación de puentes disulfuro entre monómeros ocurre y afecta la cinética de transporte. Tal es el caso de Glut1 (40).

En el análisis quimérico de NKCC1 realizado por Isenring y Forbush del que ya se habló, en el cual se identificaron los dominios involucrados en la diferencia de afinidad por iones entre humano (NKCC1h) y tiburón (NKCC1s), también se estudió el comportamiento de las quimeras con el inhibidor específico bumetanida. La información relativa a NKCC1 y bumetanida podría ser relevante para la interpretación de la información obtenida sobre NCC y tiazidas, ya que la estructura de la bumetanida tiene cierto parecido con la de las tiazidas (figura 10) y, dado que los transportadores tienen orígenes evolutivos comunes, no parece improbable que el sitio de unión sobre el cotransportador sea similar, pero con cambios sutiles que hayan producido la diferencia en la especificidad. Sin embargo, en dicho trabajo, a pesar de que se observaron cambios en la afinidad en las quimeras que intercambiaban los segmentos transmembranales 2-7 y 11-12, no se pudo concluir sobre los dominios responsables en la diferencia en afinidad ya que los cambios no siempre se observaron en el sentido esperado o fueron mayores a lo esperado (no limitándose al rango de afinidad entre NKCC1h y NKCC1s) y el efecto del intercambio de un dominio no representaba la suma de los efectos individuales del intercambio de subdominios (47), (46).

Dentro de esta misma línea de investigación se estudió el efecto del mercurio (HgCl_2) sobre la actividad del NKCC1r y NKCC1s y sobre algunas quimeras y mutantes. Se observó una K_i mayor para la inhibición del cotransportador humano, y además se

delimitó la responsabilidad de esta diferencia a un único residuo en la región TM11, precisamente a una cisteína en la posición correspondiente a la de la serina 575 de NCCr. Los resultados experimentales que apoyaron este concepto fueron dos: 1) la observación de que la quimera en la que se introdujo la región TM11-12 de NKCCs en NKCCCh presentó una afinidad por Hg^{2+} similar a la de NKCC1s; y 2) la observación de que la mutación C697L en NKCCs confirió al transportador afinidad por el mercurio similar a la de NKCCCh. La interacción que el Hg^{2+} establece con los grupos sulfhidrilo de las cisteínas es de naturaleza covalente, y se puede establecer tanto con grupos sulfhidrilo libres como con pares de cisteínas que estén formando puentes disulfuro. En este último caso se genera un puente sulfuro-Hg-sulfuro (41), (102). Así que la estructura de la proteína no se ve afectada por el rompimiento de puentes disulfuro. Por otro lado, la modificación de sulfhidrilos libres introduce una carga positiva que podría tener un efecto en la estructura y función. La disminución en la sensibilidad en la mutante C697L indica que la modificación de esa posición es responsable de parte del efecto inhibitorio del Hg^{2+} y este efecto podría deberse a la introducción de una carga positiva en el sitio, lo cual demuestra la importancia de esta posición para la función de la proteína. Además, esta información es relevante porque demuestra la accesibilidad del Hg^{2+} , que por su carga positiva es impermeable a la membrana celular, a la cisteína 697 de NKCC1s que ocupa la posición correspondiente de la serina 575 de NCC. Esto sugiere que este aminoácido se encuentra en una zona de la proteína embebida en la membrana celular, pero que forma un espacio continuo con el medio extracelular, lo cual sería importante para permitir el acceso de las tiazidas a este sitio.

La utilización de compuestos modificadores de cisteínas como el Hg^{2+} o los metanotiosulfonatos ha sido muy popular para el estudio de la estructura de transportadores o canales. Compuestos de este tipo, impermeables en la membrana celular, se han usado para determinar los residuos que están involucrados en la formación del poro hidrofílico de estas proteínas. Regiones transmembranales completas de proteínas se han analizado en base a este principio mediante una técnica que se ha denominado “escaneo por mutagénesis de cisteínas” (*cysteine scanning mutagénesis*), en la cual cada uno de los residuos transmembranales se sustituyen, uno a la vez, por un residuo de cisteína y luego se exponen estos compuestos y se mide su función, ya que se espera que, si la cisteína introducida es capaz de reaccionar, la función de la proteína se ve abatida por la introducción de un grupo químico (muchas veces cargado) en una región importante para el transporte (27), (5), (68), (87), (52). Por

lo tanto, esta estrategia nos podría ser útil para determinar la accesibilidad de la cisteína introducida en nuestra mutante S575C de NCCr. Las bases para realizar estos experimentos ya están sentadas porque ya se ha estudiado en el laboratorio el efecto de ciertos modificadores de cisteínas sobre la actividad basal de NCCr silvestre, y se ha observado que la exposición al compuesto MTSES ((2-sulfonatoetil)metanotiosulfonato de sodio) no afecta la actividad basal del cotransportador. También se ha estudiado el efecto de la exposición a mercurio, y se ha observado que tanto NCCr como NCCfl son sensibles a HgCl₂ (91). En este caso sería interesante estudiar si en la mutante S575C aumenta la sensibilidad al HgCl₂ o si el cambio en la afinidad por tiazidas inducido por la sustitución S575C se afecta en presencia de MTSES.

Por último, otra observación hecha sobre las mutantes de la región transmembranal 11 construidas en este trabajo fue el aumento en la actividad observado en todas las mutantes que contienen la mutación S575C. Se comprobó que este aumento no se debe a un aumento en la expresión total de proteína, y aún queda pendiente definir si la causa es un aumento en la cantidad de proteína presente en la membrana. Esta posibilidad, sin embargo, parece poco probable dado que se trata de una sustitución en medio de una región TM. De cualquier forma, esta es la primera mutación identificada en NCC que genera una ganancia de función. Todas las mutaciones y polimorfismos estudiados a nivel funcional hasta el momento causan una disminución en la actividad por distintas razones, y algunas de estas se han identificado como causa de síndrome de Gitelman (75), (20), (76). La observación de que la sustitución S575C en NCC lo hace más activo al menos abre la posibilidad de que tal efecto pueda ocurrir en la naturaleza. Dada la ya bien identificada relación de la función de este cotransportador con los niveles de presión arterial, se esperaría que un aumento en esta actividad ocasionado por una mutación como la S575C se reflejara en un aumento en la presión arterial. La posibilidad de que un aumento en el transporte mediado por NCC tenga este efecto se hace evidente por la existencia de una enfermedad de origen genético llamada síndrome de Gordon caracterizada por una presión arterial elevada relacionada con un aumento en la función de NCC (36), (97), (57), (32). La sustitución equivalente a la S575C en NCCr (S577C en humano) no se han reportado hasta el momento como un polimorfismo de un solo nucleótido. Sin embargo, una extensión interesante de este trabajo sería buscar la presencia de dicha mutación en el genoma de personas hipertensas vs. aquellas con presión arterial normal en la población mexicana.

VII. CONCLUSIONES

1. Identificamos que la region transmembranal 11 contiene los residuos que determinan las diferencias en afinidad por tiazidas entre NCCr y NCCfl.
2. Posteriormente se demostró que la sustitución de la serina 575 por la cisteína que se encuentra en NCCfl en la posición correspondiente, es suficiente para conferir al cotransportador de rata afinidad por metolazona similar a la del NCC de lenguado.
3. También se demostró que, de acuerdo a lo esperado, el efecto de la mutación opuesta en NCCfl (C576S) es la imagen en espejo de lo observado en NCCr. Esto fue la prueba definitiva de que *la diferencia en afinidad observada entre cotransportadores de estas especies se debe exclusivamente a la variación de éste aminoácido en su secuencia.*
4. La mutación S575C no solo alteró la afinidad por tiazidas sino que también produjo un aumento en la actividad basal del cotransportador. Por lo tanto, se identificó una mutación que genera un NCCr más activo y menos afín a las tiazidas, tal como el NCC de lenguado.
5. Esta es la primera mutación encontrada en NCC capaz de producir ganancia de función, lo cual podría ser relevante dado el papel clave que juega NCC en la regulación de los niveles de presión arterial.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. 2009 Human Genome Database (HUGO), <http://www.hugo-international.org> [Online]. 2009.
2. **Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR and Iwata S.** Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301: 610-615, 2003.
3. **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.
4. **Appel LJ.** The verdict from ALLHAT--thiazide diuretics are the preferred initial therapy for hypertension. *JAMA* 288: 3039-3042, 2002.
5. **Audia JP, Roberts RA and Winkler HH.** Cysteine-scanning mutagenesis and thiol modification of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADP translocase: characterization of TMs IV-VII and IX-XII and their accessibility to the aqueous translocation pathway. *Biochemistry* 45: 2648-2656, 2006.
6. **Bachmann S, Velázquez H, Obermuller N, Reily R F, Moser D and Ellison D H.** Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 96: 2510-2514, 1995.
7. **Bazzini C, Vezzoli V, Sironi C, Dossena S, Ravasio A, Debiassi S, Garavaglia M, Rodighiero S, Meyer G, Fascio U, Furst J, Ritter M, Botta G and Paulmichl M.** Thiazide-sensitive NaCl cotransporter in the intestine: Possible role of HCTZ in the intestinal Ca²⁺ uptake. *J Biol Chem* 280: 19902-19910, 2005.
8. **Beaumont K, Vaughn D A and Fanestil D D.** Thiazide diuretic receptors in rat kidney: Identification with [³H]metolazone. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2311-2314, 1988.
9. **Beaumont K, Vaughn D A and Healy D P.** Thiazide diuretic receptors: Autoradiographic localization in rat kidney with [³H]metolazone. *J Pharmacol Exp Therap* 250: 414-419, 1989.
10. **Bettinelli A, Bianchetti MG, Girardin E, Caringella A, Cecconi M, Appiani AC, Pavanello L, Gastaldi R, Isimbaldi C, Lama G and .** Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *J Pediatr* 120: 38-43, 1992.
11. Bollag, D. M. and Edelstein, S. J. *Protein Methods*. Wiley-Liss. 1991. New York, U.S.A.
12. Boron W F and Boulpaep E L. *Medical Physiology*. Updated edition (first ed.). 2005. USA, Elsevier Saunders.
13. **Burnham C E, Kidd J and Palfrey H C.** Expression of the Na⁺K⁺2Cl⁻ cotransporter in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 259: F383-F388, 1990.
14. **Carter BL, Einhorn PT, Brands M, He J, Cutler JA, Whelton PK, Bakris GL, Brancati FL, Cushman WC, Oparil S and Wright JT, Jr.** Thiazide-induced dysglycemia: call for research from a working group from the national heart, lung, and blood institute. *Hypertension* 52: 30-36, 2008.
15. **Casula S, Shmukler BE, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Su W, Chernova MN, Brugnara C and Alper SL.** A dominant negative mutant of the KCC1 K-Cl cotransporter: both N- and C-terminal cytoplasmic domains are required for K-Cl cotransport activity. *J Biol Chem* 276: 41870-41878, 2001.
16. **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.
17. **Costanzo L S.** Localization of diuretic action in microperfused rat distal tubules: Ca and Na transport. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 248: F527-F535, 1985.

18. **Cruz DN, Shaer AJ, Bia MJ, Lifton RP and Simon DB.** Gitelman's syndrome revisited: An evaluation of symptoms and health-related quality of life. *Kidney Int* 59: 710-717, 2001.
19. **Cutler JA, Sorlie PD, Wolz M, Thom T, Fields LE and Roccella EJ.** Trends in Hypertension Prevalence, Awareness, Treatment, and Control Rates in United States Adults Between 1988-1994 and 1999-2004. *Hypertension* 2008.
20. **De Jong JC, Van Der Vliet WA, van den Heuvel LP, Willems PH, Knoers NV and Bindels RJ.** Functional Expression of Mutations in the Human NaCl Cotransporter: Evidence for Impaired Routing Mechanisms in Gitelman's Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13: 1442-1448, 2002.
21. **De Jong JC, Willems PH, Mooren FJ, van den Heuvel LP, Knoers NV and Bindels RJ.** The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *J Biol Chem* 278: 24302-24307, 2003.
22. **DeFelice LJ.** Transporter structure and mechanism. *Trends Neurosci* 27: 352-359, 2004.
23. **Dvorak MM, De Jossineau C, Carter DH, Pisitkun T, Knepper MA, Gamba G, Kemp PJ and Riccardi D.** Thiazide Diuretics Directly Induce Osteoblast Differentiation and Mineralized Nodule Formation by Interacting with a Sodium Chloride Co-Transporter in Bone. *J Am Soc Nephrol* 18: 2509-2516, 2007.
24. **Ellison D H, Velazquez H and Wright F S.** Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 253: F546-F554, 1987.
25. **Faham S, Watanabe A, Besserer GM, Cascio D, Specht A, Hirayama BA, Wright EM and Abramson J.** The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* 321: 810-814, 2008.
26. **Forbush III B and Palfrey H C.** [³H]Bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system. *J Biol Chem* 258: 11787-11792, 1983.
27. **Frillingos S, Sahin-Toth M, Wu J and Kaback HR.** Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB J* 12: 1281-1299, 1998.
28. **Gamba G.** *Clonación de la proteína Cotransportadora de Na⁺:Cl⁻ de la vejiga urinaria del lenguado de invierno (Pseudopleuronectes americanus).* Ciudad de México.: Tesis Profesional. Doctorado en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina UNAM, 1994.
29. **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.
30. **Gamba G, Saltzberg S N, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger M A, Brenner B M and Hebert S C.** Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2749-2753, 1993.
31. **Gamba G.** Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423-493, 2005.
32. **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.
33. **Gerelsaikhon T and Turner RJ.** Transmembrane topology of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) studied by in vitro translation. *J Biol Chem* 275: 40471-40477, 2000.
34. **Gesek F A and Friedman P A.** Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin invest* 90: 429-438, 1992.
35. **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.

36. **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.
37. **Gray TM and Matthews BW.** Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within alpha-helices and its relevance to membrane-bound proteins. *J Mol Biol* 175: 75-81, 1984.
38. **Haas M and McManus T J.** Bumetanide inhibits (Na+K+Cl) co-transport at a chloride site. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 245: C235-C240, 1983.
39. **Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H and Bruford EA.** The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch* 447: 465-468, 2004.
40. **Henderson PJ.** The 12-transmembrane helix transporters. *Curr Opin Cell Biol* 5: 708-721, 1993.
41. **Hisatome I, Kurata Y, Sasaki N, Morisaki T, Morisaki H, Tanaka Y, Urashima T, Yatsuhashi T, Tsuboi M, Kitamura F, Miake J, Takeda S, Taniguchi S, Ogino K, Igawa O, Yoshida A, Sato R, Makita N and Shigemasa C.** Block of sodium channels by divalent mercury: role of specific cysteinyl residues in the P-loop region. *Biophys J* 79: 1336-1345, 2000.
42. **Hoover RS, Poch E, Monroy A, Vazquez N, Nishio T, Gamba G and Hebert SC.** N-Glycosylation at Two Sites Critically Alters Thiazide Binding and Activity of the Rat Thiazide-sensitive Na(+):Cl(-) Cotransporter. *J Am Soc Nephrol* 14: 271-282, 2003.
43. **Hughes AD.** How do thiazide and thiazide-like diuretics lower blood pressure? *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5: 155-160, 2004.
44. Irwin H.Segel. Enzyme Kinetics. Wiley-Interscience. 1993. USA. Wiley Classics Library.
45. **Isenring P and Forbush III B.** Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporter. Importance of transmembrane domains. *J Biol Chem* 272: 24556-24562, 1997.
46. **Isenring P, Jacoby S C, Chang J and Forbush III B.** Mutagenic mapping of the Na-K-Cl cotransporter for domains involved in ion transport and bumetanide binding. *J Gen Physiol* 112: 549-558, 1998.
47. **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.
48. **Isenring P and Forbush B.** Ion transport and ligand binding by the Na-K-Cl cotransporter, structure-function studies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130: 487-497, 2001.
49. **Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, Newton-Cheh C, State MW, Levy D and Lifton RP.** Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet* 40: 592-599, 2008.
50. **Jones G, Nguyen T, Sambrook P N and Eisman J A.** Thiazide diuretics and fractures: can meta-analysis help? *J Bone Miner Res* 10: 106-111, 1995.
51. **Just H, Sitte HH, Schmid JA, Freissmuth M and Kudlacek O.** Identification of an additional interaction domain in transmembrane domains 11 and 12 that supports oligomer formation in the human serotonin transporter. *J Biol Chem* 279: 6650-6657, 2004.
52. **Kaback HR, Sahin-Toth M and Weinglass AB.** The kamikaze approach to membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 610-620, 2001.
53. **Kunau R T, Weller D R and Webb H L.** Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *J Clin invest* 56: 401-407, 1975.
54. **Kunau RT, Jr., Webb HL and Borman SC.** Characteristics of sodium reabsorption in the loop of Henle and distal tubule. *Am J Physiol* 227: 1181-1191, 1974.
55. **Kunchaparty S, Palcso M, Berkman J, zquez H, Desir GV, Bernstein P, Reilly RF and Ellison DH.** Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol* 277: F643-F649, 1999.
56. **Kyte J and Doolittle R F.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132, 1982.

57. **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.
58. **Lifton RP, Gharavi AG and Geller DS.** Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556, 2001.
59. **Mastroianni N, DeFusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A and Casari G.** Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 35: 486-493, 1996.
60. **Mayan H, Vered I, Mouallem M, Tzadok-Witkon M, Pauzner R and Farfel Z.** Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3248-3254, 2002.
61. **Miller C.** ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* 440: 484-489, 2006.
62. **Monne M, Hermansson M and von Heijne G.** A turn propensity scale for transmembrane helices. *J Mol Biol* 288: 141-145, 1999.
63. **Monne M, Nilsson I, Elofsson A and von Heijne G.** Turns in transmembrane helices: determination of the minimal length of a "helical hairpin" and derivation of a fine-grained turn propensity scale. *J Mol Biol* 293: 807-814, 1999.
64. **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.
65. **Moore-Hoon ML and Turner RJ.** The structural unit of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is a homodimer. *Biochemistry* 39: 3718-3724, 2000.
66. **Moreno E, San Cristobal P, Rivera M, Vazquez N, Bobadilla NA and Gamba G.** Affinity defining domains in the Na-Cl cotransporter: different location for Cl⁻ and thiazide binding. *J Biol Chem* 281: 17266-17275, 2006.
67. **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.
68. **Mueckler M and Makepeace C.** Cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility analysis of transmembrane segment 4 of the Glut1 glucose transporter. *J Biol Chem* 280: 39562-39568, 2005.
69. **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.
70. **Parvin MN, Gerelsaikhan T and Turner RJ.** Regions in the cytosolic C-terminus of the secretory Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC1 are required for its homodimerization. *Biochemistry* 46: 9630-9637, 2007.
71. **Plata C, Meade P, Hall A E, Welch RC, Vazquez N, Hebert SC and Gamba G.** Alternatively spliced isoform of the apical Na-K-Cl cotransporter gene encodes a furosemide sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F574-F582, 2001.
72. **Plotkin M D, Kaplan M R, Verlander J M, Lee W-S, Brown D, Poch E, Gullans S R and Hebert S C.** Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int* 50: 174-183, 1996.
73. **Reilly RF and Ellison DH.** Mammalian Distal Tubule: Physiology, Pathophysiology, and Molecular Anatomy. *Physiol Rev* 80: 277-313, 2000.
74. **Renfro JL.** Interdependence of Active Na⁺ and Cl⁻ transport by the isolated urinary bladder of the teleost, *Pseudopleuronectes americanus*. *J Exp Zool* 199: 383-390, 1977.

75. **Riveira-Munoz E, Chang Q, Godefroid N, Hoenderop JG, Bindels RJ, Dahan K and Devuyt O.** Transcriptional and functional analyses of SLC12A3 mutations: new clues for the pathogenesis of Gitelman syndrome. *J Am Soc Nephrol* 18: 1271-1283, 2007.
76. **Sabath E, Meade P, Berkman J, De Los HP, Moreno E, Bobadilla NA, Vazquez N, Ellison DH and Gamba G.** Pathophysiology of Functional Mutations of the Thiazide-sensitive Na-Cl Cotransporter in Gitelman Disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F195-F203, 2004.
77. **Schoofs MW, van der KM, Hofman A, de Laet CE, Herings RM, Stijnen T, Pols HA and Stricker BH.** Thiazide diuretics and the risk for hip fracture. *Ann Intern Med* 139: 476-482, 2003.
78. **SCHREINER GE and BLOOMER HA.** Effect of chlorothiazide on the edema of cirrhosis, nephrosis, congestive heart failure and chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 257: 1016-1022, 1957.
79. **Schultheis P J, Lorenz J N, Meneton P, Nieman M L, Riddle T M, Flagella M, Duffy J J, Doetschman T, Miller M L and Shull G E.** Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺-Cl⁻ cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biol Chem* 273: 29150-29155, 1998.
80. **Sever P.** New hypertension guidelines from the National Institute for Health and Clinical Excellence and the British Hypertension Society. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7: 61-63, 2006.
81. **Sharoni M, Steiner-Mordoch S and Schuldiner S.** Exploring the binding domain of EmrE, the smallest multidrug transporter. *J Biol Chem* 280: 32849-32855, 2005.
82. **Shetlar R E, Scholermann B, Morrison A I and Kinne R K H.** Characterization of the Na⁺K⁺2Cl⁻ cotransport system in oocytes from *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Acta* 1023: 184-190, 1990.
83. **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.
84. **Starremans PG, Kersten FF, van den Heuvel LP, Knoers NV and Bindels RJ.** Dimeric architecture of the human bumetanide-sensitive Na-K-Cl Co-transporter. *J Am Soc Nephrol* 14: 3039-3046, 2003.
85. **Stokes J B, Blackmore M and Lee I B.** Pathways for passive Na and Cl transport across the urinary bladder of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Bull Mt Desrt Isl Biol Lab* 24: 40-41, 1984.
86. **Stokes J B, Lee I and D'Amico M.** Sodium Chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system. *J Clin invest* 74: 7-16, 1984.
87. **Tamura N, Konishi S, Iwaki S, Kimura-Someya T, Nada S and Yamaguchi A.** Complete cysteine-scanning mutagenesis and site-directed chemical modification of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. *J Biol Chem* 276: 20330-20339, 2001.
88. **Terada Y and Knepper M A.** Thiazide-sensitive NaCl absorption in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 259: F519-F528, 1990.
89. **Tovar-Palacio C, Bobadilla NA, Cortes P, Plata C, De Los HP, Vazquez N and Gamba G.** Ion and Diuretic Specificity of Chimeric Proteins Between Apical Na⁺:K⁺:2Cl⁻ and Na⁺:Cl⁻ Cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F570-F577, 2004.
90. **Tran J M, Farrell M A and Fanestil D D.** Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 258: F908-F915, 1990.
91. **Vazquez N, Monroy A, Dorantes E, Munoz-Clares RA and Gamba G.** Functional differences between flounder and rat thiazide-sensitive Na- Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F599-F607, 2002.

92. **Velazquez H, Good D W and Wright F S.** Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 247: F904-F911, 1984.
93. **Velazquez H and Wright F S.** Effects of diuretic drugs on Na, Cl and K transport by rat renal distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 250: F1013-F1023, 1986.
94. **Velazquez H, Good DW and Wright FS.** Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule. *Am J Physiol* 247: F904-F911, 1984.
95. **Velazquez H, Naray-Fejes-Toth A, Silva T, Andujar E, Reilly RF, Desir GV and Ellison DH.** Rabbit distal convoluted tubule coexpresses NaCl cotransporter and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase II mRNA. *Kidney Int* 54: 464-472, 1998.
96. **WILKINS RW.** New drugs for hypertension, with special reference to chlorothiazide. *N Engl J Med* 257: 1026-1030, 1957.
97. **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.
98. **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.
99. **Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y and Gouaux E.** Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437: 215-223, 2005.
100. **Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y and Gouaux E.** Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437: 215-223, 2005.
101. **Yang T, Huang Y G, Singh I, Schnermann J and Briggs J P.** Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 271: F931-F939, 1996.
102. **Ziegler DM.** Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 54: 305-329, 1985.
103. **Ziyadeh F N, Kelepouris E and Agus Z S.** Thiazides stimulate calcium absorption in urinary bladder of winter flounder. *Biochem Biophys Acta* 897: 52-56, 1987.