



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PARTICIPACIÓN DE LA CINASA WNK3 EN LA SEÑAL CI/VOLUMEN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

SILVIA CRUZ RANGEL

TUTOR

DRA. HERMINIA PASANTES ORDÓÑEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. JULIO MORÁN ANDRADE

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. GERARDO GAMBA AYALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. MAYO 2013



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.

Participación de la cinasa WNK3 en la señal Cl^- /Volumen

RECONOCIMIENTOS

Este proyecto de investigación se llevo a cabo bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes Ordóñez, investigadora emérita de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto fue financiado mediante los donativos otorgados al laboratorio de la Dra. Herminia Pasantes por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 98952), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (DGAPA-PAPIIT, IN203410), así como por la beca para la formación a nivel posgrado en la modalidad de doctorado por parte del CONACyT.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este proyecto estuvo conformado por:

Dra. Herminia Pasantes Ordóñez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Gerardo Gamba Ayala	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El jurado designado por el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biomédicas para el examen de grado estuvo integrado por:

Presidente:	Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Secretario:	Dra. Herminia Pasantes Ordóñez
Vocal:	Dr. Jorge Arreola Gómez
Vocal:	Dr. Edmundo Chávez Cossío
Vocal:	Dr. León David Islas Suárez

Se reconoce la colaboración del Dr. Gerardo Gamba y de su grupo de investigación en la Unidad de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de expresión funcional en ovocitos en *Xenopus laevis* y el trabajo de biología molecular.

Se reconoce la asesoría del Dr. Gerardo Ramos y de la QFB. Norma Vázquez en aspectos tanto teóricos como técnicos, así como su colaboración en proyectos de investigación.

A mis padres
Lidia y Germán

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Agradezco a mi tutora, la Dra. Herminia Pasantes por permitirme llevar a cabo este proyecto doctoral bajo su dirección, por su apoyo y confianza en mi trabajo y por saber guiar sabiamente mis ideas, lo cual ha sido un aporte importante no solo para la realización de esta tesis sino para mi formación como investigadora. Dra. Herminia, su compromiso con la ciencia es el mejor ejemplo a seguir.

A los doctores Gerardo Gamba, Julio Morán y Juan Carlos Gómora por sus importantes aportaciones y el tiempo dedicado a mi formación académica.

A los miembros del jurado de examen de grado, los doctores Juan Carlos Gómora, Jorge Arreola, León Islas y Edmundo Chávez, por su revisión crítica y sus valiosos comentarios y sugerencias.

A la Biol. Claudia Peña por su asesoría técnica.

A Rosa Rivera Alvarado por su eficiente asistencia como auxiliar de laboratorio.

A Erika Vázquez, Alejandra López, Martha Pérez, Reyna Hernández, Karla Guzmán, Aarón Cruz, Alejandro Ruiz y Enrique Pacheco por todo su apoyo académico y personal.

A mis amigos del Instituto y a los de toda la vida.

Agradezco especialmente a mi familia por su cariño y comprensión durante mis largas ausencias

INDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
I.1 Transporte a través de la membrana plasmática.....	6
I.2 Regulación del volumen celular.....	7
I.3 Eventos que acompañan al cambio en volumen.....	9
I.4 Los osmolitos en la regulación del volumen.....	10
I.5 <u>D</u> ecremento <u>r</u> egulador del <u>v</u> olumen celular (DRV).....	10
Canales de K ⁺ activados durante hipotonicidad.....	12
Canal de Cl ⁻ activado por el incremento en volumen (Cl ⁻ _{vol}).....	14
Cotransportadores electroneutros KCCs.....	16
Movilización de osmolitos orgánicos activada por estrés hipotónico.....	19
I.6 <u>I</u> ncremento <u>r</u> egulador del <u>v</u> olumen celular (IRV).....	21
Intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ y Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	23
Cotransportador electroneutro NKCC.....	24
Canales catiónicos activados por hipertonicidad.....	24
I.7 Señalización durante el estrés osmótico.....	25
I.8 Cinasas WNK (With No K [K=lisina]).....	27
I.9 Cinasa WNK3.....	30
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
III. HIPÓTESIS	33
IV. OBJETIVOS	
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares.....	34
V. MÉTODOS	
V.1 Ensayos en células HEK293	
Amplificación de WNK3 endógena.....	35
Generación de líneas estables WNK3+ y WNK3-DA.....	35
Cultivo celular.....	36
Ensayos tipo Western blot.....	37
Inmunocitoquímica.....	38
Mediciones de cambios en el volumen.....	38
Ensayos de liberación osmosensible de ³ H-aurina.....	39
Registros electrofisiológicos de la corriente de Cl ⁻ _{vol}	40
Ensayos de la actividad de los cotransportadores NKCC y KCC.....	41
Determinación de la concentración intracelular de Cl ⁻	42
V.2 Ensayos en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	
Obtención de clonas y transcripción in vitro del cRNA.....	44
Extracción e inyección de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	45

Ensayos funcionales de los CEN de la familia SLC12	
Ensayos de captura de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida (NKCC1/2)	47
Ensayos de captura de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a metolazona (NCC)	47
Ensayos de captura de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de Cl^- (KCCs)	48
Análisis estadístico	48

VI. RESULTADOS

SECCIÓN I “Influencia de WNK3 en la concentración intracelular de cloruro y la regulación del volumen en células HEK293”	
Expresión endógena de WNK3	49
Clonación de WNK3 en el vector de expresión en células de mamífero	51
Líneas establemente transfectadas WNK3+ y WNK3-DA	53
Localización subcelular y redistribución de WNK3 por estrés osmótico	54
WNK3 y el decremento regulador del volumen celular	57
Efecto de WNK3 en la vía de liberación de osmolitos orgánicos	59
Modulación de los niveles intracelulares de Cl^- por WNK3	60
WNK3 y el incremento regulador del volumen celular	66
SECCIÓN II “Efecto de las variantes de WNK3 sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a Cl^- ”	
Clonación de las isoformas de WNK3 y generación de las construcciones	70
Efecto de las isoformas de WNK3 sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a Cl^-	72
Efecto de las isoformas de WNK3-DA sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a Cl^-	75
VII. DISCUSIÓN	79
VIII. CONCLUSIONES	94
IX. REFERENCIAS	95
X. APENDICE I	
“Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells”	107
XI. APENDICE II	
“Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters”	121
XII. APENDICE III	
Otros artículos publicados durante el doctorado	130

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

9-AC	<i>9-Acetantraceno</i>
AKT/PKB	<i>(Protein Kinase B)</i> proteína cinasa B
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
ATP	adenosin trifosfato
Best-1	bestrofina 1
BK/Maxi K	canal de potasio de conductancia amplia
cDNA	<i>(complementary desoxiribonucleic acid)</i> ácido desoxiribonucleico complementario
CEN	cotransportadores electroneutros
CFTR	<i>(Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)</i> regulador de la conductancia transmembranal en fibrosis quística
[Cl⁻]_i	concentración intracelular de cloruro
Cl⁻/HCO₃⁻	cotransportador cloruro/bicarbonato
CIC	canales de cloruro activados por voltaje
cRNA	<i>(complementary ribonucleic acid)</i> ácido ribonucleico complementario
DCPIB	ácido 4-[(2-butil-6,7-dicloro-2-ciclopentil-1-oxo-3H-inden-5-il) oxil] butanóico
diBA-5-CA	bis-1.3-ácido dibutilbarbitúrico-5-pentametil oxonol
DIDS	4,4' diisotiocianatoestilbeno-2,2'- ácido disulfónico
DMA	dimetilamilorida
DRV	decremento regulador del volumen
EAT	<i>(Ehrlich-Lette Ascites)</i> células ascíticas de adenocarcinoma Ehrlich-Lette
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGTA	ácido etilenglicol tetracético
EIPA	etilisopropilamilorida
ENaC	<i>(epithelial sodium channel)</i> canal epitelial de sodio
ERK	<i>(extracellular-signal regulated kinase)</i> cinasa regulada por señalización extracelular
EROs	especies reactivas de oxígeno
FAK	<i>(focal adhesion kinase)</i> cinasa de adhesión focal
FITC	<i>(fluorescein isothiocyanate)</i> isotiocianato de fluoresceína
Fyn	miembro de la familia de cinasas de tirosina Src
GABA	ácido gama amino butírico
GFP	<i>(green fluorescent protein)</i> proteína verde fluorescente
GLT-1	transportador de glutamato
GLUT	transportador de glucosa
GPC	glicerofosforilcolina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxi-etil) piperazina-1-etanosulfónico
HRP	<i>(horseradish peroxidase)</i> peroxidasa de rábano
ICl⁻_{vol}	corriente de cloruro activada por volumen
IK	canal de potasio de conductancia media

IRV	incremento regulador del volumen
KCC	cotransportador electroneutro potasio/cloruro (K^+/Cl^-)
Kv	canal de potasio activado por voltaje
MAPK	(<i>mitogen-activated protein kinases</i>) proteína cinasa activada por mitógenos
NaCl	cloruro de sodio
NEM	N-etilmaleimida
NHE1	intercambiador sodio/protón (Na^+/H^+)
NKCC	cotransportador electroneutro sodio/potasio/cloruro ($Na^+/K^+/2Cl^-$)
NPPB	5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) ácido benzoico
OSR1	(<i>oxidative-stress responsive 1 protein</i>) proteína 1 de respuesta a estrés oxidativo
Paracel Cl⁻	flujo paracelular de cloruro
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinasa
Plcn	(<i>chloride conductance regulatory protein</i>) proteína reguladora de la conductancia a cloruro
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	(<i>protein kinase A</i>) proteína cinasa A
PKB	(<i>protein kinase B</i>) proteína cinasa B
PKC	(<i>protein kinase C</i>) proteína cinasa C
PLC	(<i>phospholipase C</i>) fosfolipasa C
PP1/2B	(<i>phosphoprotein phosphatase</i>) proteína fosfatasa 1 y 2B
PVDF	(<i>polyvinylidene difluoride</i>) polivinilidina difluorada
ROMK	(<i>renal outer medullary potassium channel</i>) canal de potasio de la medula renal interna
SNC	sistema nervioso central
SDS-PAGE	(<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
TRK	(<i>tyrosine kinase receptor</i>) receptor a cinasas de tirosina
SGK	(<i>serum-and glucocorticoid-induced protein kinase</i>) proteína cinasa inducida por suero y glucocorticoides
SITS	4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2-ácido disulfónico
SK	canal de potasio de conductancia pequeña
SLC12	(<i>solute carrier family 12</i>) familia de acarreadores de solutos 12
SPAK	(<i>STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase</i>) cinasa rica en prolina/alanina relacionada a STE20/SPS1
TonEBP	(<i>tonicity-responsive enhancer binding protein</i>) proteína de unión al potenciador de respuesta a tonicidad
TRP	(<i>transient receptor potential</i>) receptor de potencial transitorio
WASP	(<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>) proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich
WNK	(<i>With No lysine</i>) cinasa sin lisina

RESUMEN

El mantener fluctuaciones mínimas en el volumen es imperativo para la homeostasis celular. A través de la escala evolutiva, las células han desarrollado mecanismos adaptativos para hacer frente a condiciones como el estrés osmótico, que puedan afectar su volumen. El decremento o el incremento regulador del volumen (DRV o IRV, respectivamente) son procesos reguladores complejos, que involucran una multiplicidad de señales para concretar una respuesta final, consistente en un flujo de osmolitos en la dirección necesaria para contrarrestar el cambio osmótico impuesto. El movimiento de los osmolitos ocurre a través de canales y transportadores, cuya actividad se encuentra finamente regulada por una intrincada red de señalización, hasta el momento poco entendida. Las cinasas WNK se proponen como elementos de esta red de señales por su influencia sobre la actividad de diversas vías de transporte iónico. El caso de WNK3 es particularmente interesante por su capacidad de modular de manera recíproca la actividad de los cotransportadores electroneutros (CEN) de cationes acoplados a cloruro, cuya participación como efectores de la regulación del volumen está documentada. En este trabajo se utilizaron las células HEK293 derivadas de riñón embrionario humano para generar las líneas estables que sobre-expresan de manera constitutiva a WNK3 (WNK3+) y a la mutante sin actividad catalítica WNK3-DA, y a través de esta manipulación evaluar su influencia en la regulación del volumen. Los resultados mostraron que WNK3 contribuye a mantener la concentración intracelular de cloruro ($[Cl^-]_i$) a través de la inhibición de los CEN encargados de liberar K^+ y Cl^- al espacio extracelular (KCCs) en WNK3+ y su activación en WNK3-DA. Esta misma acción influye sobre el DRV, cuya eficiencia se reduce en WNK3+ y se acelera en WNK3-DA. En el caso del estrés hipertónico, WNK3 también contribuye al IRV a través de un efecto sobre la actividad del cotransportador electroneutro que permite la captura de Na^+ , K^+ y Cl^- (NKCC). WNK3+ y WNK3-DA incrementan el funcionamiento de este cotransportador. Dada la existencia de cuatro isoformas de WNK3, se examinó su influencia sobre la actividad de todos los CEN de la familia a la que pertenecen los KCCs y los NKCCs, utilizando como un sistema de expresión funcional a los ovocitos de *Xenopus*. Los resultados mostraron que todas las isoformas presentan efectos similares, activando a los NKCCs, que median la entrada de Cl^- , e inhibiendo

su salida mediante los KCCs, mientras que la variante sin actividad catalítica tiene los efectos opuestos. En conjunto, los resultados de este trabajo postulan a WNK3 como una cinasa que determina la $[Cl^-]_i$, y que contribuye a los procesos de regulación del volumen. Estas conclusiones pueden ser relevantes en procesos como la invasividad celular o la excitabilidad neuronal, en los que participan los cotransportadores modulados por WNK3 y la consecuente afectación de los niveles de Cl^- intracelular.

ABSTRACT

Maintaining a constant cell volume is imperative for cellular homeostasis. This ability is present in most cell types and has been preserved through evolution. Facing a change in external osmolarity cells respond by adaptive mechanisms, i.e. the regulatory volume decrease (RVD) or increase (RVI) which are complex regulatory processes based on increasing osmolyte and water fluxes in the necessary direction to restore the osmotic equilibrium. Transporters or/and ion channels are the effectors responsible for this mobilization, and their activation responds to signaling chains. The proteins serine/treonine kinases WNKs are suggested as elements in this signaling network for their ability to regulate the activity of multiple ion transport pathways. WNK3 is of particular interest because it reciprocally regulates the activity of electroneutral cotransporters NKCCs and KCCs, whose participation in the regulatory volume process is well recognized. The present research in HEK293 cells refers to the influence of WNK3 on the activation/operation of the ionic pathways, ultimately leading to cell volume recovery. For this purpose stable transfected HEK293 cells which overexpress WNK3+ and the catalytically inactive version WNK3-DA were generated. Our results demonstrated a role for WNK3 in maintaining the intracellular chloride balance. We also showed that WNK3 has an influence on RVD via an effect on the KCCs activity, as WNK3+ reduced and WNK3-DA increased, respectively the efficiency of RVD. Under hypertonic condition WNK3 contributes to volume regulation by increasing NKCC activity. Four isoforms of WNK3 have been described, and we aimed to define the effects of all these WNK3 variants on members of the electroneutral chloride/cation cotransporters family. Our study performed an heterologous expression system using *Xenopus laevis* oocytes, indicated that all isoforms have similar effects on the cotransporters activity, since while WNK3 activates NKCC1/2, NCC and inactivates the KCCs, the catalytically inactive version does the opposite, i.e. inhibition of NKCCs, NCC and activation of KCCs.

In summary, the present study documented the implication of WNK3 in two important elements of cell homeostasis, the cell volume control and the regulation of intracellular Cl⁻ levels. Processes like migration, cell adhesion, metastasis and neuronal excitability, which involve the activity of electroneutral cotransporters could be modulated by WNK3.

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Transporte a través de la membrana plasmática

Establecer los límites de la célula mediante una membrana selectivamente permeable y por lo tanto contar con espacios celulares claramente definidos, implicó una respuesta evolutiva de enorme trascendencia. Las diferencias químicas entre el medio interno y externo, permitieron el adecuado funcionamiento de procesos fisiológicos que requerían de un medio ambiente con una composición particular. El siguiente reto para la célula, consistió en el desarrollo de mecanismos de transporte de membrana que le permitieran la comunicación entre los compartimentos intra y extracelular. Estos procesos pueden ser catalogados dentro de los siguientes grandes grupos: difusión simple, osmosis, difusión facilitada, transporte activo primario y transporte activo secundario. El movimiento libre de partículas a través de la membrana plasmática a favor de su gradiente electroquímico es denominado difusión simple, mediante el cual se permite el flujo de moléculas o gases, como urea, glicerol, etanol, benceno, O₂, N₂ o CO₂, sin la intervención de proteínas como mediadoras de su movimiento. Cuando se trata del agua como molécula en movimiento se habla de osmosis, proceso en el cual el agua se mueve a través de una membrana semipermeable de acuerdo a su gradiente electroquímico hacia el compartimento con mayor concentración de solutos; la fuerza requerida para contrarrestar dicho flujo es conocida como presión osmótica. Una variante de los procesos difusionales es la difusión facilitada, en la que el movimiento de partículas se lleva a cabo a favor del gradiente electroquímico, pero requiere de proteínas plasmáticas especializadas (canales o uniportadores); ejemplos clásicos de este tipo de transporte son la movilización de glucosa por el transportador GLUT o de agua mediante las acuaporinas. Por el contrario, el tipo de transporte que ocurre en contra del gradiente de concentración e implica un gasto energético para la célula, se denomina transporte activo. Cuando la movilización de la molécula requiere de la energía liberada por la hidrólisis de ATP como en el caso de la bomba de Na⁺/K⁺, el transporte se denomina transporte activo primario. Si la energía acoplada proviene del movimiento de otra molécula a favor de su gradiente electroquímico, el proceso se denomina

transporte activo secundario, tal es el caso de cotransportadores e intercambiadores (Lang *et al.* 1998; Lang 2007). Todos estos mecanismos presentan una gran dinámica, capacitando a la célula para mantener su estado de homeostasis y responder a eventuales alteraciones en la concentración de partículas solubles. Toda modificación en la concentración de solutos resultará en un movimiento neto de agua en la dirección requerida para restablecer la presión osmótica y mantener su equilibrio termodinámico, alterando en consecuencia el volumen de la célula.

1.2 Regulación del volumen celular

La relación entre la concentración de solutos del interior celular y el ambiente externo es descrita mediante los términos osmolaridad y tonicidad. La osmolaridad es un término absoluto, definido como la cantidad de osmoles por litro de disolución (mOsmol/l), donde un osmol es una unidad de medida que permite determinar el número total de partículas de soluto en una solución con una presión osmótica de 22.4 atmósferas a 0°C. Este parámetro puede ser determinado mediante la medición de alguna de las propiedades coligativas de la materia¹, tal como el punto de fusión o el punto de evaporación. Por otra parte, la tonicidad es un término funcional y relativo, que se define por las condiciones osmóticas de los compartimentos intra y extracelular en un momento dado y por lo tanto, por el gradiente osmótico generado a través de la membrana, con la consecuente capacidad para generar un cambio en el volumen de la célula. Una solución hipertónica genera encogimiento celular, mientras que una solución hipotónica resulta en hinchamiento de la célula. El término anisotónico es utilizado para describir soluciones que generan un cambio en el volumen celular hacia cualquiera de las direcciones (encogimiento o hinchamiento) y engloba a los términos hipertónico e hipotónico (Hoffmann *et al.* 2009).

La capacidad que tienen las células de mantener un volumen constante es una propiedad que se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva, ha sido ampliamente descrito en bacterias, protistas, hongos, plantas y células animales (Pedersen *et al.* 2011). En estas

¹ Una propiedad coligativa es aquella propiedad de la disolución que depende únicamente de la cantidad de partículas de soluto por partículas totales y no de la composición química del soluto. Estas propiedades incluyen el punto de congelación, el punto de ebullición, la presión de vapor y la presión osmótica.

últimas es de particular importancia, ya que no cuentan con paredes rígidas como en el caso de bacterias o células vegetales que las hagan resistentes a las fluctuaciones en la concentración de solutos y a los flujos de agua. Las perturbaciones en la osmolaridad a nivel sistémico y celular, con el consecuente cambio en el volumen, pueden producir graves alteraciones en el funcionamiento de la célula; por lo que el volumen celular debe ser un parámetro finamente regulado. En vertebrados, el sistema renal es el encargado de mantener la homeostasis en términos de volumen, concentración de electrolitos y pH de los fluidos corporales. El riñón mantiene relativamente constantes el volumen y la osmolaridad del fluido extracelular a nivel corporal, mediante la regulación del contenido de agua y cloruro de sodio (NaCl) (Pedersen *et al.* 2011). En el contexto celular, se pueden generar gradientes osmóticos como resultado de procesos metabólicos (crecimiento, diferenciación, proliferación, migración, muerte), que someten a la célula a constantes cambios en la concentración de solutos (Lambert *et al.* 2008; Hoffmann *et al.* 2009). Cualquier situación que produzca una desviación fuera del rango normal de solutos presentes en el medio extracelular, es potencialmente nociva para la célula de no ser corregida a tiempo. En condiciones fisiológicas, las células de la médula renal se encuentran expuestas a altas osmolaridades durante la antidiuresis, mientras que células del epitelio intestinal se enfrentan también a cambios en la osmolaridad generados por la ingesta variable de agua. Algunas condiciones patológicas exacerban estas modificaciones en el volumen, incrementado el riesgo de efectos lesivos en las células. El hinchamiento celular se presenta durante: a) eventos de isquemia, o b) hiponatremia² desarrollada por un exceso en la ingesta de agua, como en el caso de diversos desordenes psiquiátricos, alteraciones en la secreción de la hormona antidiurética, déficit de glucocorticoides, hipotiroidismo, falla renal y/o hepática, síndrome nefrótico, vómito y diarrea. Por el contrario el encogimiento celular resulta de eventos clínicos como a) hipernatremia³ por exceso de NaCl o pérdida importante de agua desarrollada durante sudoración excesiva, secreción reducida de hormona antidiurética o

² Hiponatremia: condición en la que la concentración de sodio en sangre se encuentra por debajo de 135 mmol/l.

³ Hipernatremia: alteración hidroelectrolítica en la que hay un incremento en la concentración de sodio en sangre, generalmente se considera desde 158 mmol/l.

ingesta de agua de mar; o bien, durante b) hiperglicemia⁴ y alcalosis⁵ (Orlov y Novikov 1996; Waldegger *et al.* 1998; Lang 2007; Lambert *et al.* 2008).

Una gran variedad de parámetros se ven modificados por el cambio en volumen, desde la clara alteración en la estructura celular, hasta el ensamble de macromoléculas y la concentración de segundos mensajeros, indispensables para que se lleve a cabo de manera correcta la transducción de señales (Pasantes-Morales *et al.* 2006). Para hacer frente a estas situaciones, se ponen en marcha complejos mecanismos celulares con la finalidad de mantener un volumen celular casi constante. Dependiendo de la dirección del cambio en el volumen se activan procesos denominados Decremento Regulador del Volumen (DRV, en respuesta al hinchamiento) o Incremento Regulador del Volumen (IRV, en respuesta al encogimiento); ambos, encaminados a la movilización de solutos y agua en la dirección requerida para que se recupere la presión osmótica (Hoffmann y Dunham 1995; Pasantes-Morales *et al.* 2006). Estos procesos serán detallados más adelante.

1.3 Eventos que acompañan al cambio en volumen

Inmediatamente después del cambio en la osmolaridad y la consecuente alteración del volumen de la célula, se activan los mecanismos de regulación del volumen que incluyen un serie de eventos divididos en tres etapas principales: 1) la activación de un sensor de volumen constituido por una molécula o bien un conjunto de moléculas que le permiten a la célula distinguir la alteración efectuada en su volumen por la pérdida o ganancia intracelular de agua, 2) la activación de una cadena de transducción de señales que se encargará de llevar y amplificar la información proveniente del sensor hacia los mecanismos a cargo de la movilización de solutos con actividad osmótica; y por último 3) la activación de mecanismos efectores: canales y transportadores responsables del movimiento de solutos hacia el espacio celular determinado por el gradiente osmótico. Adicionalmente, el mecanismo sensor debe

⁴ Hiperglicemia: incremento en la concentración sanguínea de glucosa por arriba de 110 mg/dl en ayunas.

⁵ Alcalosis: término clínico que indica alcalinidad en los fluidos del cuerpo, generalmente por un aumento en la concentración de CO₂ en sangre

funcionar como memoria celular, permitiéndole percibir que se ha recuperado el volumen celular original y por lo tanto inactivar la movilización de solutos (Pasantes-Morales *et al.* 2006).

1.4 Los osmolitos en la regulación del volumen

Los solutos que contribuyen al establecimiento de la osmolaridad son denominados osmolitos; moléculas de bajo peso molecular que se encuentran en concentraciones suficientemente altas para contribuir de manera importante al mantenimiento del volumen celular. Su naturaleza química puede ser orgánica, como los polialcoholes (sorbitol, inositol), metilaminas (betaína, creatina, glicerofosforilcolina), urea y aminoácidos libres y sus derivados (glutamina, glutámico, glicina, prolina, serina, treonina, β -alanina, GABA y taurina); o bien, de origen inorgánico, como Na^+ , K^+ y Cl^- (Junankar y Kirk 2000; Hoffmann y Pedersen 2011).

Independientemente del proceso que se active, DRV o IRV, para que la célula regrese a su volumen inicial, se requiere la rápida movilización de osmolitos orgánicos e inorgánicos, así como procesos a largo plazo que incluyen la sobre-expresión de proteínas implicadas en transporte osmótico, así como la modificación en la tasa de síntesis y degradación de macromoléculas. Es importante considerar que la respuesta rápida y transitoria frente a cambios en el volumen de la célula es la movilización de iones Na^+ , K^+ y Cl^- , cuya contribución es de casi dos tercios de la recuperación del volumen celular; sin embargo, dada la importancia de sus concentraciones en el mantenimiento del potencial de membrana y en la excitabilidad celular (en el caso de células nerviosas), su participación debe ser limitada y reemplazada por el transporte sostenido de osmolitos orgánicos (Pasantes-Morales *et al.* 2006).

1.5 Decremento regulador del volumen celular (DRV)

Como se ha descrito anteriormente, para hacer frente a cambios en la osmolaridad del medio circundante, la célula inicialmente responde dirigiendo el flujo de agua hacia el espacio celular necesario para alcanzar el equilibrio osmótico. Frente a estrés hipotónico, el contenido de agua dentro de la célula se incrementa de manera proporcional a la magnitud de la reducción en la

concentración de osmolitos. Un evento temprano en la transducción de señales osmóticas es la activación del mecanismo sensor de volumen; sin embargo; a pesar de su relevancia dentro del proceso, su identidad molecular aún resulta desconocida. Diversas moléculas cuya activación es inducida por hipotonicidad han sido sugeridas como sensor. Algunas proteínas integrales de membrana que permiten la comunicación de eventos extracelulares hacia el interior celular han recibido particular atención; tal es el caso de integrinas, receptores a cinasas de tirosina (RTK del inglés receptor tyrosine kinase) o canales-receptor a potenciales transitorios (TRP del inglés transient receptor potential), ya que la activación y reclutamiento de estas proteínas hacia la membrana plasmática es una de las señales iniciales durante el proceso de DRV. Otros factores que se han considerado para esta función son: la tensión de la membrana plasmática, la reducción en la fuerza iónica, la concentración de segundos mensajeros (Ca^{2+} , AMPc), así como el papel de las interacciones moleculares; parámetros que son drásticamente alterados ante la dilución del medio intracelular (Hoffmann y Dunham 1995; Papakonstanti *et al.* 2000; Sabirov *et al.* 2000; Pedersen *et al.* 2011). Finalmente, ante un fenómeno tan complejo como lo es el DRV, es muy probable que el sensor del cambio en el volumen no sea una molécula única, sino que dependa de la actividad coordinada de distintas proteínas; e incluso, que su identidad sea particular de cada tipo celular, lo cual hace complicado generalizar sobre su naturaleza y mecanismo de acción (Hoffmann *et al.* 2009).

Temporalmente el DRV ocurre en dos fases, una fase rápida que inicia a partir del pico de hinchamiento máximo, en la cual se liberan osmolitos orgánicos y se incrementa la conductancia de K^+ y Cl^- hacia el espacio extracelular (Fig. I.1) y una fase tardía, caracterizada por la reducción en la velocidad de los procesos de síntesis (anabolismo, transcripción génica, síntesis de proteínas) y el incremento en los niveles de degradación de moléculas orgánicas; este proceso requiere de horas e incluso días (Verbalis y Gullans 1991). La respuesta aguda de liberación de osmolitos se lleva a cabo mediante canales de Cl^- y K^+ , cotransportadores, así como vías de liberación de osmolitos orgánicos, cuya participación se detalla a continuación (Fig. I.1).

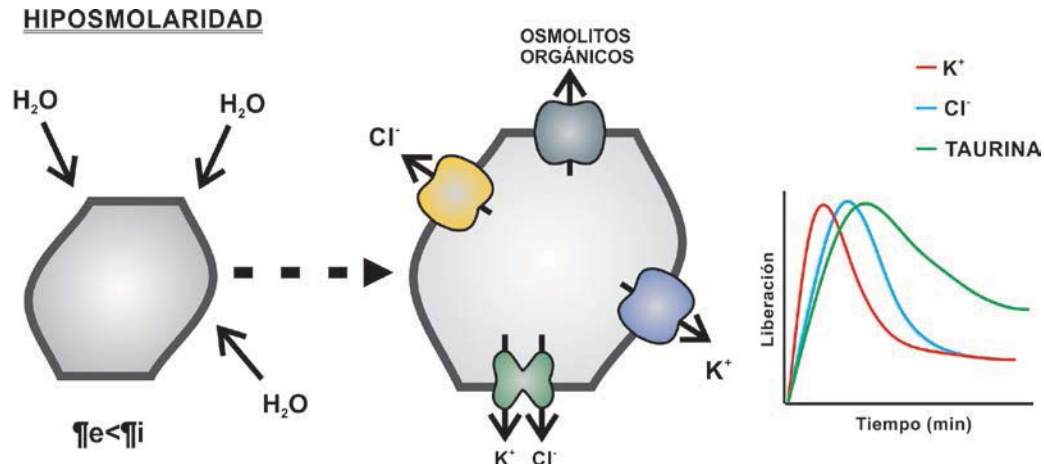


Fig. 1.1 Decremento Regulator del Volumen. El estrés hipotónico reduce la presión osmótica extracelular con respecto al interior de la célula (π_e , presión osmótica extracelular, π_i , presión osmótica intracelular), produciendo la entrada de agua y el aumento del volumen de la célula. El DRV consiste en la activación de vías de liberación de osmolitos orgánicos e inorgánicos, entre los que destacan la vía de liberación hipotónica de taurina, distintos canales de K^+ , el canal de Cl^-_{vol} y los cotransportadores electroneutros KCCs. La gráfica muestra el curso temporal de la liberación de osmolitos; la fase inicial de la regulación del volumen se lleva a cabo mediante el movimiento rápido y transitorio de iones K^+ y Cl^- , seguido de la liberación sostenida de osmolitos orgánicos compatibles.

Canales de K^+ activados durante hipotonicidad

Una amplia variedad de canales de K^+ han sido descritos como elementos efectores de la regulación del volumen celular frente a estrés hipotónico, estos son: los canales de K^+ activados por voltaje (K_v), los activados por Ca^{2+} de conductancia grande BKa, de conductancia intermedia IK, o de conductancia pequeña SK, los activados por hinchamiento y los activados por estímulos mecánicos. Su participación es resultado de fenómenos que acompañan al incremento en el volumen celular, es decir, cambios en el potencial de membrana, incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} o estiramiento de la membrana plasmática (Pasantes-Morales y Morales Mulia 2000; Pasantes-Morales *et al.* 2006; Wehner 2006).

En células epiteliales el incremento del Ca^{2+} intracelular en concentraciones micromolares, ya sea por activación de una corriente entrante o por liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares (mitocondria y retículo endoplásmico), induce la liberación de K^+ mediante canales BKa (100-200 pS). La participación de este tipo de canales puede identificarse

farmacológicamente de forma relativamente específica a partir del uso de bloqueadores como caribdotoxina, iberiotoxina y paxilina (Dube *et al.* 1990; MacLeod y Hamilton 1999; Pasantés-Morales y Morales Mulia 2000; Fernández-Fernández *et al.* 2002). En otros casos, la activación inicial de la corriente de Cl^- genera un cambio en el potencial de membrana hacia potenciales menos negativos y esta despolarización activa a los canales de K^+ dependientes de voltaje Kv. De los 12 miembros de la familia de canales Kv se ha descrito la participación de Kv1.5, Kv1.3, Kv4.2 y Kv4.3 (Felipe *et al.* 1993; Wang *et al.* 2005). El uso de bloqueadores como noxiustoxina, argiotoxina y dendrotoxina constituye una herramienta importante para definir su contribución al proceso de DRV (Grissmer *et al.* 1994). Los canales KCNQ1, 4 y 5 que también generan corrientes de K^+ dependientes de voltaje, muestran una importante actividad durante hipotonicidad (Grunnet *et al.* 2003; Hougaard *et al.* 2004; Jensen *et al.* 2005).

La participación de varios miembros de la familia de canales de K^+ de dos poros ha sido referida en distintos tipos celulares como resultado de su activación por hinchamiento. Tales son los canales TASK-2, TREK-1 y TRAAK (Maingret *et al.* 1999; Maingret *et al.* 2000; Niemeyer *et al.* 2001). Inicialmente descrita en células tumorales ascíticas de Ehrlich (EAT), una corriente de K^+ cuya activación es independiente de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y de cambios en el voltaje transmembranal, fue atribuida de manera directa al hinchamiento celular; esta corriente es sensible a clofilio y sus particularidades electrofisiológicas lo relacionan con miembros de la familia de canales TASK, en particular TASK-2 (Riquelme *et al.* 1998).

La activación por hinchamiento de los canales IK ha sido reportada en células intestinales 407 y en células renales A6, en donde la liberación de ATP inducida por hinchamiento con la consecuente estimulación de su receptor purinérgico parece ser el proceso responsable de dicha activación (Urbach *et al.* 1999; Okada *et al.* 2001; Wang *et al.* 2003). Por último, los canales SK de conductancia entre 4 y 8 pS participan en el DRV en células humanas de pulmón; sin embargo, su mecanismo directo de activación durante este proceso aún no se ha estudiado a detalle (Roman *et al.* 2002).

La diversidad de canales de K^+ que cuentan con la capacidad de responder ante el cambio en volumen, su expresión simultánea en ciertos tipos celulares y la diferencia en sensibilidad (magnitud y duración del estímulo) demanda el uso de estrategias particulares para el estudio de la corriente de K^+ y muestran una vez más la complicada maquinaria celular que se echa a andar frente a cambios osmóticos en el entorno celular.

Canal de Cl^- activado por el incremento en volumen (Cl^-_{vol})

Alcanzando concentraciones de hasta 135 mM, el Cl^- es el principal anión en el espacio extracelular, mientras que las concentraciones citoplásmicas varían de acuerdo al tipo de célula entre 10-40 mM; las cargas negativas en el interior celular están representadas por el Cl^- , el bicarbonato y las proteínas. El Cl^- es un anión implicado en un amplio rango de procesos celulares como son, modulación de la respuesta sináptica a GABA, transporte epitelial de Cl^- , contracción-relajación muscular y regulación del volumen celular. En esencialmente todos los tipos celulares en los que se ha investigado, el hinchamiento hipotónico induce un incremento en la permeabilidad del Cl^- . Esto ocurre debido a la activación de canales aniónicos como el canal Maxi (canal de Cl^- de conductancia grande), el CIC-2 y Best-1; sin embargo, la corriente de mayor amplitud y participación en el proceso de DRV corresponde al canal de cloruro activado por volumen (Cl^-_{vol}). Sus características electrofisiológicas la hacen distinta a otras corrientes de Cl^- descritas. Presenta alta sensibilidad al cambio en volumen, moderada rectificación saliente, inhibición a potenciales positivos (por arriba de los 60 mV) y recuperación de la inhibición a potenciales negativos, aunque el grado de inhibición varía dependiendo el tipo celular, siendo por ejemplo, muy marcada en células de glioma de rata (Jackson y Strange 1995) pero menos drástica en células EAT (Pedersen *et al.* 1998). La conductancia unitaria del canal es de 50-90 pS a voltajes despolarizantes mientras que a potenciales hiperpolarizantes baja hasta 10 pS. Es un canal con baja selectividad a aniones monovalentes, su permeabilidad se ajusta a la secuencia I de Eisenman $SCN^- < I^- < NO_3^- < Br^- < Cl^- < F^- < gluconato$, aunque también es capaz de permear lactato, bicarbonato, benzoato y glutamato (Arreola *et al.* 1995; Strange *et al.* 1996; Nilius *et al.*

1997; Okada 1997). Basados en el modelo de exclusión de volumen, las dimensiones del radio del poro han sido estimadas en 0.63 nm (Ternovsky *et al.* 2004).

Una de las principales limitantes en el estudio de la ICl_{vol}^- , es la baja afinidad y especificidad de los bloqueadores del canal. A bajas concentraciones (micromolar) es inhibido por clomifen, nafoxidina, tamoxifen, mefloquina, gossypol, ácido araquidónico, quinina, quinidina, 9-AC, NDGA, 1,9-dideoxiforscolina, diBA-5-CA, ácido niflúmico, mibefradil y NPPB (Nilius *et al.* 1997; Okada 1997; Okada 2006). DIDS, SITS y ATP bloquean la corriente de forma dependiente del voltaje a potenciales positivos (Kubo y Okada 1992; Okada 1997). Fármacos como DCPIB (Decher *et al.* 2001) y NS3728 (Helix *et al.* 2003) son considerados más específicos; sin embargo, su efecto aún es poco conocido; investigaciones recientes muestran que el DCPIB inhibe la liberación de glutamato vía hemicanales de conexina, así como la captura de este aminoácido por el transportador GLT-1 (Bowens *et al.* 2012).

Aunque la identidad molecular del canal de Cl_{vol}^- se desconoce y por lo tanto se sabe muy poco de su mecanismo de activación, es claro que su funcionamiento depende de la presencia de ATP intracelular, pero no es un requisito que la molécula sea hidrolizada (Okada 1997). Del lado extracelular, el ATP es capaz de bloquear al canal una vez que se encuentra abierto (Jackson y Strange 1995; Tsumura *et al.* 1996); sugiriendo su papel como molécula moduladora de unión al canal. Otros parámetros que funcionan como importantes moduladores de la vía son a) fuerza iónica b) Mg^{+} intracelular y protones (Oiki *et al.* 1994; Sabirov *et al.* 2000; Hernandez-Carballo *et al.* 2010) c) niveles de colesterol como componente de membrana d) mediadores lipídicos como ácido araquidónico y leucotrienos (Okada 2006) e) citoesqueleto y polimerización de F-actina f) activación de receptores acoplados a proteínas G g) fosforilación y defosforilación de proteínas, en particular cinasas y fosfatasas de residuos de tirosina y h) niveles citoplásmicos de especies reactivas de oxígeno (Hoffmann *et al.* 2009).

Entre los candidatos propuestos como mediadores moleculares de la ICl_{vol}^- se encuentran la glicoproteína G (transportador ABC de resistencia a multidrogas), la proteína Plcn

y ClC-3 (Paulmichl *et al.* 1992; Valverde *et al.* 1992; Krapivinsky *et al.* 1994). Aunque la corriente generada a través de estas proteínas comparte características electrofisiológicas, permeabilidad y/o farmacología con la ICl_{vol}^- , estudios más detallados en distintos tipos celulares, fueron mostrando que a pesar de su gran similitud no son del todo idénticas. Ahora se sabe que se trata de entidades totalmente independientes que funcionan como proteínas moduladoras de la Cl_{vol}^- (Okada 2006).

Cotransportadores electroneutros KCCs

Además de los canales iónicos, el movimiento de K^+ y Cl^- durante una condición de hipotonicidad puede estar mediado por los cotransportadores de K^+Cl^- , contribuyendo de manera importante a la regulación del volumen celular. Estos cotransportadores, denominados también KCCs, pertenecen a la familia de cotransportadores electroneutros (CEN) de cationes acoplados a cloro, conocida como SLC12. La familia SLC12 está integrada por siete miembros divididos en dos grandes grupos, el primero se encarga de mover el Cl^- acoplándolo al gradiente de Na^+ y lo conforman el NKCC1, NKCC2 y NCC, mientras que el otro grupo lo integran cuatro proteínas que movilizan Cl^- aprovechando el gradiente de K^+ (KCC1-4). Estructuralmente los CEN presentan 12 dominios transmembranales (TM) flanqueados por extremos NH_2 y $COOH$ intracelulares, así como sitios de glucosilación en el asa extracelular y sitios de fosforilación encargados de determinar la actividad de la proteína (Fig. 1.2). Se trata de vías de transporte secundario ya que la energía requerida para su funcionamiento es obtenida del gradiente iónico generado por la ATPasa Na^+/K^+ .

Los KCCs regulan el movimiento acoplado de Cl^- al gradiente favorable del K^+ hacia el exterior celular, el K^+ que es liberado regresa al espacio intracelular a través de la ATPasa Na^+-K^+ , modulando finamente la $[Cl^-]_i$. Este movimiento de K^+ y Cl^- a través de los KCC es interdependiente y presenta una estequiometría 1:1, por lo cual no generan cambios en el potencial de membrana. A pesar de que los principales iones transportados son el K^+ y el Cl^- , los KCCs también son capaces de movilizar Rb^+ y NH_4^+ (Lauf 1983; Bergeron *et al.* 2003).

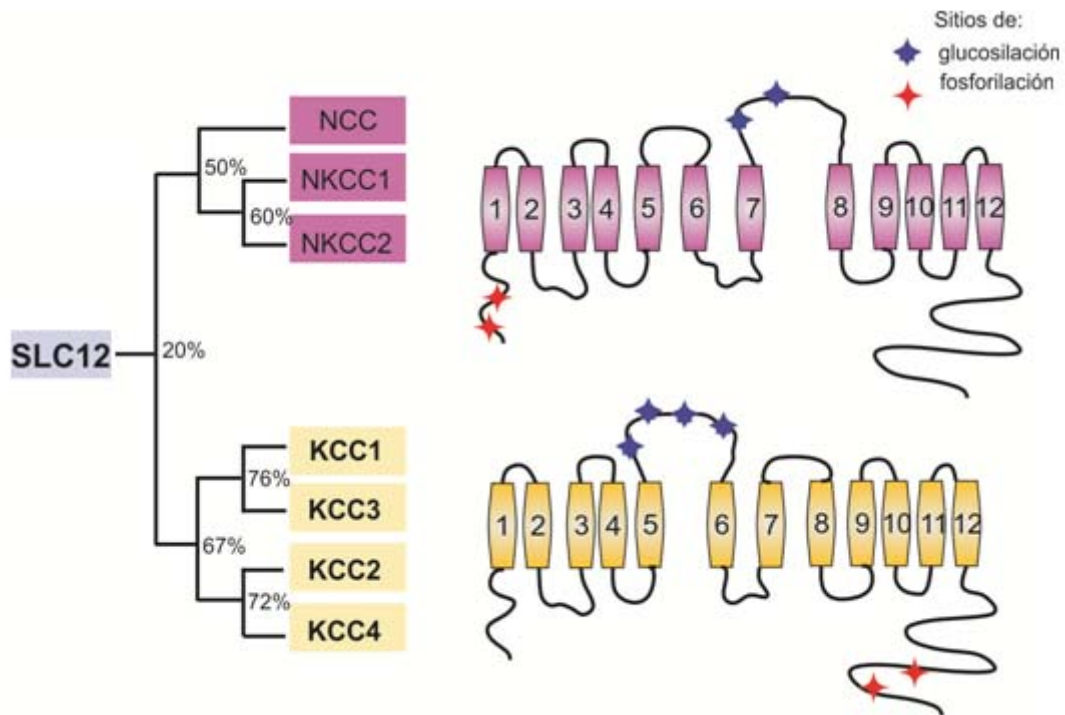


Figura I.2 Filogenia y topología básica de los CEN. Los porcentajes indican el grado de identidad entre los miembros de la familia SLC12. Mediante análisis de hidropatía se predicen 12 TM con regiones NH₂ y COOH intracelulares. NKCC 1/2 y NCC presentan sitios de glucosilación entre TM7 y TM8 y acoplan el transporte de Cl⁻ al gradiente químico favorable para el Na⁺. La fosforilación de dos residuos de treonina altamente conservados (T100 y T105 en humano) en la región amino terminal de NKCC2 es indispensable para la activación del cotransportador bajo diferentes estímulos. En los KCCs los sitios de glucosilación se encuentran entre TM5 y TM6 y la defosforilación de dos residuos de treonina (en humano T991 y T1048) en la región COOH terminal de KCC3 son críticos para la activación del cotransportador.

El patrón de expresión de estos cotransportadores, así como los mecanismos de modulación de su actividad se muestran en Fig. I.3. Entre los principales activadores de los KCCs se encuentran el hinchamiento celular, la reducción en el pH, altas concentraciones de urea y el uso de compuestos como la N-etilmaleimida (NEM); este efecto es contrarrestado por inhibidores de proteínas fosfatasa, mientras que por el contrario el uso de inhibidores de cinasa de serina-treonina activa a todos los KCCs (Rinehart *et al.* 2009), resaltando la importancia de los niveles netos de fosforilación de la proteína en la activación de los KCCs. Aunque el mecanismo molecular de activación/inactivación aún no ha sido bien detallado, se ha destacado la participación de las cinasas SPAK (Ste20-related proline alanine-rich kinase), OSR1 (oxidative stress response kinase) y las cinasas WNK (with no lysine kinase), así como de las proteínas fosfatasa (PP1 y PP2B) en la modulación de la actividad de estos cotransportadores (Kahle *et al.* 2010).

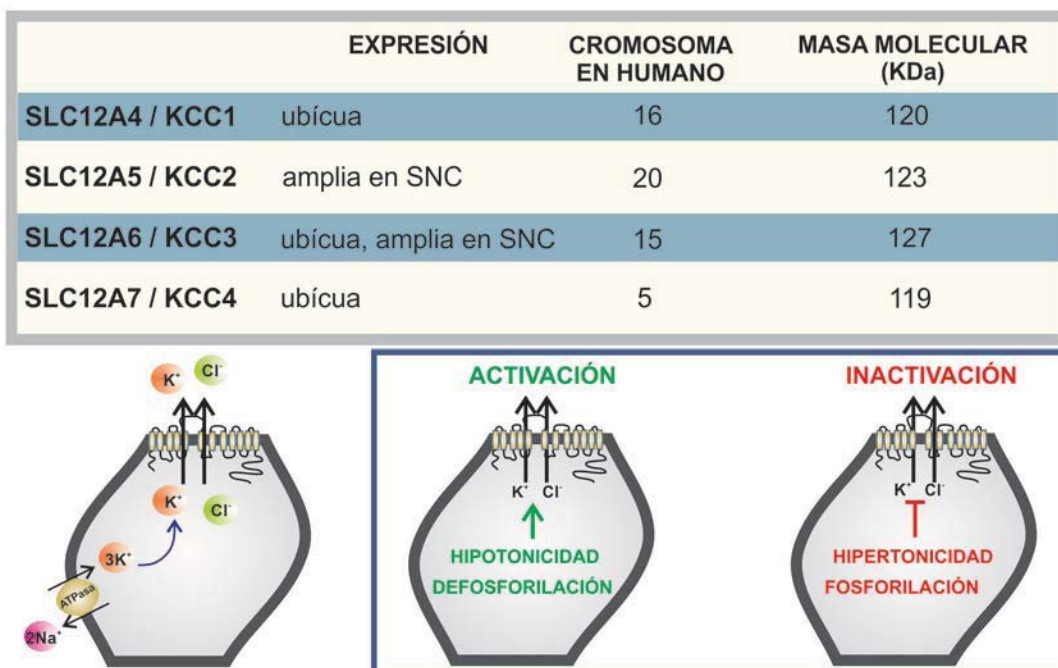


Fig I.3 Cotransportadores electroneutros de K^+ acoplados a Cl^- . Los KCCs son proteínas con peso molecular de 119-127 KDa. Como sistemas de transporte secundario acoplan el movimiento de Cl^- a la liberación de K^+ a favor del gradiente de concentración generado por la ATPasa Na^+/K^+ . El estrés hipotónico y la defosforilación de la molécula son señales para su activación; por el contrario, el aumento en la osmolaridad extracelular y la defosforilación de los mismos sitios, inactivan a estos cotransportadores.

La participación de los KCCs en múltiples procesos celulares resalta su importancia fisiológica, claro ejemplo de ello es el mantenimiento de los niveles intracelulares de Cl^- (y por lo tanto la modulación de la respuesta neuronal a GABA), la regulación del pH intracelular, amortiguamiento del K^+ extracelular en el cerebro o su participación en la regulación del volumen celular, siendo esta última probablemente la más conocida de sus funciones (Hebert *et al.* 2004; Gamba 2005). Los primeros estudios del cotransportador fueron realizados en eritrocitos bajo condiciones de hinchamiento o activación por N-etilmaleimida (NEM) (Kregenow 1971; Lauf 1981). Este modelo de estudio permitió su caracterización funcional: sensibilidad al cambio en volumen, cinética, inhibidores y mecanismos de modulación. Su activación durante hinchamiento celular también ha sido descrita en células EAT (Thornhill y Laris 1984). Ahora es claro que todas las isoformas de KCC son sensibles al hinchamiento celular, aunque KCC1 y KCC3, son las dos isoformas de amplia distribución que han sido preferentemente asociadas a procesos de regulación del volumen celular (Hebert *et al.* 2004).

Movilización de osmolitos orgánicos activada por estrés hipotónico

Los osmolitos orgánicos también son denominados compatibles o citoprotectores ya que a diferencia de los inorgánicos, estos no alteran la estructura de las macromoléculas, aunque algunos de ellos como en el caso del GABA, la glicina o el glutamato si desempeñan un papel importante en la neurotransmisión del sistema nervioso. Las vías de movilización que utilizan, así como el tipo de osmolito que participa en el proceso de recuperación del volumen, dependerá del tipo celular, de su ambiente y de la disponibilidad del propio osmolito; sin embargo, esta clase de osmolitos de naturaleza orgánica, encuentran en la taurina a su representante por excelencia.

La taurina o ácido 2-aminoetansulfónico es el producto final de la vía metabólica de los aminoácidos azufrados cisteína y metionina (Stipanuk 1986). Su nombre deriva del latín *taurus*, ya que fue aislada por primera vez de la bilis del toro (*Bos taurus*) en 1827 y a diferencia de los demás aminoácidos, la taurina es un aminoácido neutro que no forma parte estructural de las proteínas, se encuentra en forma soluble y abundante en el citoplasma, alcanzando concentraciones de hasta 40 mM en células con un consumo energético alto como músculo, corazón, retina y cerebro. A pesar de su abundancia no participa en ninguna vía metabólica a excepción de su acoplamiento a sales biliares para la formación del ácido taurocólico. Adicionalmente, presenta una alta sensibilidad a perturbaciones osmóticas, su liberación hacia el espacio extracelular se incrementa particularmente en respuesta a un aumento en el volumen de la célula. Estas características la vuelven el osmolito ideal, permitiendo su acumulación en altos niveles sin producir efectos lesivos en la función y estructura celular, generando parte del movimiento osmóticamente obligado del agua necesario para que se lleve a cabo la regulación del volumen celular (Pasantés-Morales *et al.* 2006).

Molecularmente no se ha identificado la vía a través de la cual la taurina se moviliza en respuesta a hipotonicidad; sin embargo sus propiedades fundamentales incluyen: 1) es una vía de movilización inactiva bajo condiciones en donde no hay cambio en el volumen celular

(Galiotta *et al.* 1996; Grant *et al.* 2000; Franco *et al.* 2001; Culliford *et al.* 2004; Shennan *et al.* 2006), 2) la magnitud de la liberación de taurina es proporcional a la magnitud en el cambio osmótico 3) la movilización presenta características difusionales, dirigiendo el flujo a favor del gradiente de concentración, 4) su cinética no muestra saturación, sugiriendo un mecanismo de transporte facilitado independiente del cotransportador de Na^+ -taurina, TauT, 5) es sensible a reducciones en la temperatura, probablemente debido al efecto térmico sobre las vías de transducción de señales 6) es de activación rápida, en el orden de segundos (Jackson y Strange 1993; Lambert y Hoffmann 1994; Shennan *et al.* 1994), 7) la apertura de la vía depende de la presencia de ATP intracelular y 8) es inhibida por bloqueadores generales de canales de Cl^- . Esta última característica ha abierto camino a un gran debate acerca de la relación entre la vía osmosensible de taurina y el canal de Cl^-_{vol} . En diversos tipos celulares comparten curso temporal y perfil farmacológico. Una amplia lista de bloqueadores de canales de cloro (NPPB, ácido niflúmico, ácido fluofenámico, tamoxifen) muestran un claro efecto inhibitorio sobre la liberación de taurina (Boese *et al.* 1996; Hall *et al.* 1996), fortaleciendo la idea de una vía de movilización común; sin embargo, estos fármacos presentan una baja selectividad por los canales de Cl^- (Cabantchik y Greger 1992; Greger *et al.* 1999), siendo capaces de inhibir la actividad de distintas vías de transporte aniónico y por lo tanto pudiendo tener un efecto indirecto sobre la liberación de taurina. Adicionalmente, su efecto es dependiente del tipo celular ya que algunos bloqueadores inhiben la $\text{ICl}^-_{\text{vol}}$ sin presentar efecto significativo sobre la liberación osmosensible de taurina y viceversa. Los experimentos electrofisiológicos muestran que el canal de Cl^-_{vol} es capaz de permear taurina con carga negativa (Banderali y Roy 1992; Jackson y Strange 1993; Boese *et al.* 1996; Galiotta *et al.* 1997), aunque es importante considerar que fisiológicamente la mayor parte de la taurina se encuentra en forma de zwitterion (eléctricamente neutra), por lo que su movimiento a través del canal es difícil o incluso nulo bajo estas condiciones. La información obtenida de estos experimentos indica simplemente que el tamaño del poro del canal tiene las dimensiones necesarias para permitir el paso de la taurina. Se ha reportado que el radio del poro (0.63 nm) es lo suficientemente grande como para transportar aminoácidos cargados negativamente como glutamato, aspartato o gluconato y bajo ciertas condiciones experimentales también taurina (Ternovsky *et al.* 2004).

Consistentemente, la evidencia apunta a que $\text{ICl}^-_{\text{vol}}$ y liberación osmosensible de taurina utilizan dos mecanismos de movilización independientes pero relacionados de manera estrecha, de tal modo que la actividad del canal Cl^-_{vol} y probablemente los niveles de Cl^- intracelular son importantes moduladores de la vía de liberación osmosensible de taurina. Para una excelente discusión ver Shennan, 2008.

1.6 Incremento regulador del volumen celular (IRV)

El estrés hipertónico por definición, es entendido como un aumento en la concentración de osmolitos extracelulares, favoreciendo la movilización de agua hacia afuera de la célula y generando encogimiento celular. En la médula renal, las células se encuentran particularmente expuestas a altas osmolaridades ya que esta región del riñón es la encargada de llevar a cabo la concentración de la orina (Yang *et al.* 2010). Los efectos inmediatos de un estímulo hipertónico son el incremento en las interacciones intermoleculares debidas a la reducción del espacio físico, el aumento en la fuerza iónica y cambios en la estructura del citoesqueleto. A partir de dichas alteraciones tempranas se desencadenan algunos efectos secundarios como por ejemplo, se ha reportado que el estrés hipertónico por incremento de NaCl produce el arresto del ciclo celular acompañado en algunos casos de daño al DNA, despolarización mitocondrial o incluso apoptosis tanto por la vía intrínseca o mitocondrial, como extrínseca ⁶. Con un umbral mucho menor, el estrés hipertónico genera un aumento en los niveles de radicales libres, especialmente de especies reactivas de oxígeno (EROs), que a su vez exacerbaban alteraciones sobre el DNA; sin embargo, también se ha reportado que concentraciones permisivas de EROs presentan un efecto osmoprotector, activando vías de sobrevivencia y estrés. Adicionalmente, durante estrés hipertónico se ve afectada la expresión de un amplio número de proteínas que participan en vías de transporte iónico como canales y cotransportadores, así como proteínas de estrés, proteínas asociadas al citoesqueleto, factores de transcripción, cinasas, fosfatasa y segundos mensajeros, entre otras (Burg *et al.* 2007).

⁶ La vía intrínseca está mediada por estrés celular o lesión al DNA, requiere de la disrupción de la membrana mitocondrial y liberación de proteínas mitocondriales tales como citocromo c y smac/diablo. La vía extrínseca requiere de ligandos que se unen a receptores transmembranales de muerte; estos receptores pertenecen a la familia de receptores al factor de necrosis tumoral TNF.

El mecanismo celular que permite hacer frente a esta alteración osmótica es el IRV, durante el cual, los osmolitos son capturados de manera rápida en el interior de la célula dirigiendo el movimiento de agua hacia el citosol y permitiendo la recuperación del volumen celular. En etapas iniciales del IRV (minutos), se acumulan iones dentro de la célula, principalmente Na^+ y Cl^- , para posteriormente (en cuestión de horas) dar paso a la acumulación de osmolitos orgánicos compatibles, que compensaran las alteraciones en los parámetros celulares generados por los osmolitos inorgánicos (Khan *et al.* 2010). Entre los principales osmolitos orgánicos se encuentran sorbitol, betaina, inositol, glicofosforilcolina y taurina. Al igual que en el DRV, el osmolito orgánico que participa en la recuperación del volumen dependerá del tipo celular y la condición particular de estrés hipertónico, por ejemplo, ante un incremento en la osmolaridad por NaCl, se inhibe la fosfodiesterasa, permitiendo la acumulación en el interior celular de glicerofosforilcolina (GPC) (Ullrich 1976). O el caso del sorbitol, que es acumulado en el citosol por estimulación de la aldosa reductasa, encargada de sintetizar sorbitol a partir de glucosa, este efecto es observado ante el incremento en la osmolaridad por NaCl o rafinosa pero no por urea o glicerol (Bagnasco *et al.* 1987; Cowley *et al.* 1990). La respuesta tardía incluye también el aumento en los transportadores de osmolitos orgánicos inducida por hipertonicidad, como el caso del transportador de taurina dependiente de Na^+ Tau T o de acuaporinas. Todas estas acciones están concertadas por la sobreactivación de activadores transcripcionales como TonEBP (Ferraris y Burg 2006).

La fase temprana de la recuperación del volumen celular por estrés hipertónico implica la participación de los intercambiadores Na^+/H^+ en acción conjunta con el $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, los cotransportadores NKCCs, así como diversos canales catiónicos no selectivos (Wehner *et al.* 2003) (Fig. 1.4). La participación de cada uno de ellos en el IRV se detalla a continuación.

HIPEROSMOLARIDAD

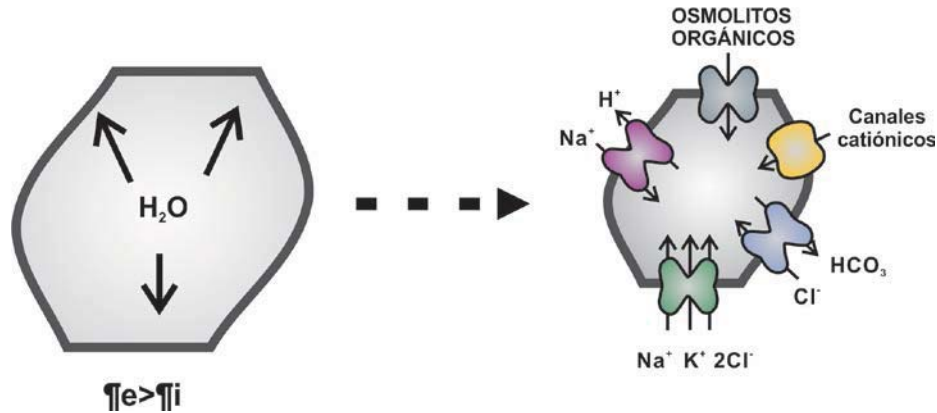


Fig. 1.4 Incremento Regulator del Volumen. El estrés hipertónico produce el incremento en la π_e y el direccionamiento de H_2O hacia el espacio extracelular, generando encogimiento de la célula. El proceso de IRV ocurre rápidamente mediante la activación de vías de internalización de osmolitos principalmente inorgánicos, a través del cotransportador NKCC, canales catiónicos no selectivos y los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- y Na^+/H^+ . La captura de osmolitos orgánicos es una respuesta de la célula a largo plazo que puede requerir horas e incluso días.

Intercambiadores Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^-

Los intercambiadores Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- son intercambiadores ubicuos, presentan una estequiometría 1:1 y entre sus funciones celulares destacan la regulación del volumen, el mantenimiento del pH tanto de organelos como a nivel celular y mecanismos de transporte transepitelial de iones; también participan activamente en procesos de migración, proliferación y supervivencia de las células. De los 10 miembros clonados de los intercambiadores Na^+/H^+ , NHE1 es el que presenta una distribución más amplia y alta sensibilidad a cambios en el volumen de la célula. Los fármacos útiles para inhibir al intercambiador Na^+/H^+ son derivados del diurético amilorida como EIPA y DMA o beozilguanidinas como cariporida y eniporida, mientras que el DIDS es útil para evaluar la participación del intercambiador Cl^-/HCO_3^- , aunque resulta poco selectivo (Hayashi *et al.* 2002; Sterling y Casey 2002).

Durante el estrés hipertónico NHE1 lleva a cabo la internalización de Na^+ y liberación de H^+ al espacio extracelular; el cambio inducido en el pH intracelular genera el aumento de bicarbonato por entrada difusional de CO_2 , activando al intercambiador Cl^-/HCO_3^- , quien se encarga de internalizar Cl^- y liberar HCO_3^- , permitiendo en acción conjunta con el NHE1 la

ganancia neta de NaCl en el citosol. El HCO_3^- y los H^+ liberados producen H_2O y CO_2 que pueden ser recapturados por la célula (Alexander y Grinstein 2006).

Cotransportador electroneutro NKCC

Los cotransportadores $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ o NKCCs, son proteínas que movilizan Na^+ , K^+ y Cl^- hacia el citosol con una estequiometría 1:1:2; acoplado dicho movimiento al gradiente de Na^+ generado por la ATPasa Na^+/K^+ . Se han descrito dos isoformas, NKCC1 codificado por el gene SLC12A2 que se distribuye de manera ubicua en células no epiteliales y a lo largo de la membrana basolateral de epitelios de tipo secretor y NKCC2, codificado por el gene SLC12A1, el cual presenta una distribución restringida al riñón, en la membrana apical del epitelio de la rama ascendente del asa de Henle (Gamba 2005). La amplia distribución de NKCC1 destaca la importancia de esta isoforma en el proceso del IRV. NKCC1 es activado durante estrés hipertónico pero inhibido por hipotonidad, resultado del incremento en el estado de fosforilación de la proteína. La activación del cotransportador requiere la fosforilación de sitios importantes en la región NH_2 terminal, que en el humano corresponden a los residuos T100 y T105. La defosforilación de estos mismos sitios es responsable de la inactivación del cotransportador durante estrés hipotónico (Gimenez y Forbush 2005) (Fig. 1.5). Dos serina treonina cinasas Ste20 SPAK y OSR1 han sido propuestas como proteínas moduladoras de la actividad de los cotransportadores de la familia SLC12 por interacción y fosforilación directa con la región amino terminal (Gimenez 2006). A su vez, miembros de la familia de serina/treonina cinasas WNK han adquirido importancia dentro del escenario de activación de los NKCCs por su interacción con SPAK y OSR1 (Kahle *et al.* 2010).

Canales catiónicos activados por hipertonicidad

En una variedad de tipos celulares se ha observado la activación de corrientes catiónicas no selectivas como una respuesta primaria ante incrementos en la osmolaridad extracelular. Mediante estrategias farmacológicas se ha descrito la participación en el IRV de al menos tres

diferentes tipos de canales catiónicos no selectivos, estos son: a) canales sensibles a amilorida, cuya relación con el canal epitelial de sodio ENaC se investigado en hepatocitos b) canales insensibles a amilorida pero bloqueados por fluofenamato y Gd^{3+} , posiblemente canales TRP y c) canales sensibles a amilorida y Gd^{3+} (Wehner 2006). Estos canales se tratan de los mecanismos efectores menos estudiados debido a su heterogeneidad de acuerdo al tipo celular.

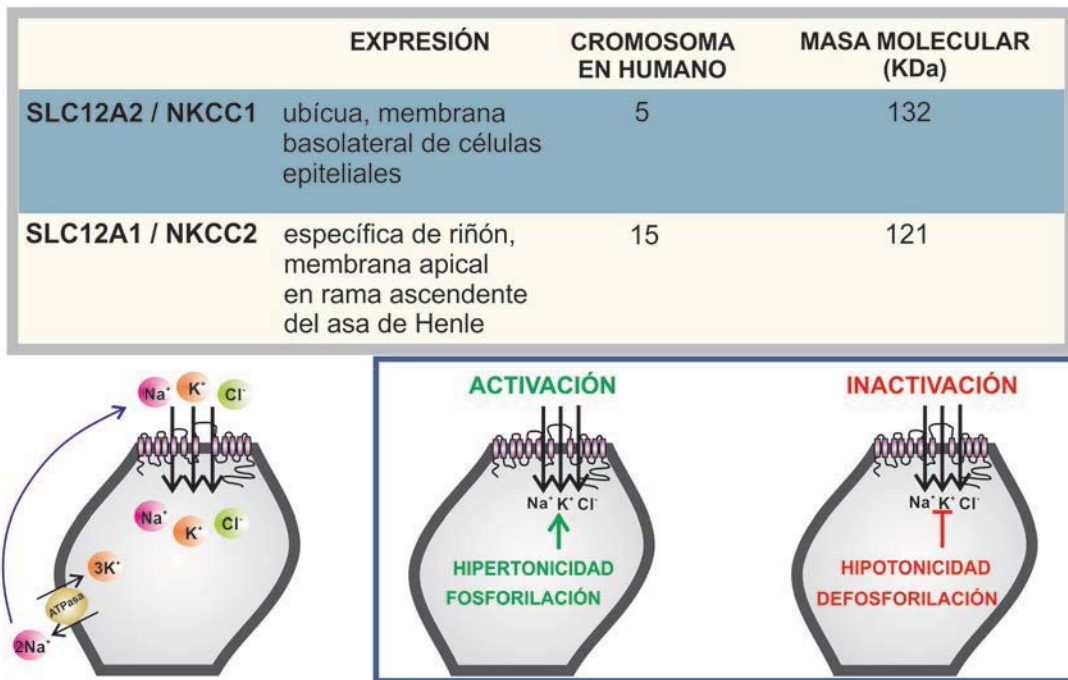


Fig. 1.5 Cotransportadores electroneutros de Na^+ y K^+ acoplados a Cl^- . Acoplan el transporte de Cl^- al gradiente químico favorable para el Na^+ . El estrés hipertónico y la fosforilación de residuos de treonina en el extremo NH_2 terminal de la molécula son señales para la activación de estos cotransportadores; por el contrario, un estímulo hipotónico o la defosforilación de los mismos residuos de treonina son suficientes para la que la actividad del cotransportador sea inhibida.

1.7 Señalización durante el estrés osmótico

La señal detectada por el mecanismo sensor, se amplifica a través de la activación de múltiples vías de señalización que le permiten a la célula enfrentar y adaptarse a las alteraciones generadas por el cambio en volumen. Estas cadenas de señalización en ambos procesos (DRV e IRV) aún resultan poco claras.

Ante el estrés hipotónico, una de las respuestas mejor conservadas entre los distintos tipos celulares que resultan del incremento en el volumen celular, es el aumento en las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} , independientemente de si la actividad de los mecanismos efectores dependen o no del incremento en su concentración (Pasantes-Morales y Morales Mulia 2000; Wehner *et al.* 2003). Como toda situación que implique un riesgo para la célula, el hinchamiento activa las vías clásicas de supervivencia y estrés, PI3K/AKT y p38 respectivamente; además de las señales asociadas al drástico reacomodo del citoesqueleto tanto en el proceso de cambio en volumen como durante la fase de recuperación del mismo.

El citoesqueleto de actina es una estructura dinámica regulada por la actividad de las proteínas pequeñas Rho GTPasas (Rho A, Rac y Cdc42), que sufre una reestructuración importante durante el estrés hipotónico, el cual genera la despolimerización de los filamentos de actina en la región cortical, así como la formación de proyecciones de la membrana vía la activación de Rac y Cdc42. Otro elemento clave durante el cambio en volumen es la cinasa FAK, implicada en el ensamble de complejos de adhesión focal a matriz extracelular, importantes para minimizar las deformaciones inducidas por la entrada de agua a la célula. La participación de fosfolipasas (PLC), fosfatasa (PP1, PP2) y múltiples cinasas de residuos de tirosina (Src, Lck), serina/treonina cinasas (SGK, PKC, PKA, PKB, WNKs), cinasas de la familia MAPK (JNK, ERK-1, ERK-2) ha sido ampliamente documentada en distintos tipos celulares (Pasantes-Morales *et al.* 2000; de La Paz *et al.* 2002; Pasantes-Morales *et al.* 2004; Lezama *et al.* 2005).

De igual forma, el encogimiento celular generado por el aumento en la osmolaridad del medio circundante, se traduce directamente en alteraciones en el citoesqueleto, mostrando un marcado incremento de actina en su forma polimerizada y la reducción en el contenido de fibras de estrés y formación de proyecciones de la membrana. De igual forma, se ha reportado consistentemente un incremento en los niveles de PIP2 y la activación de proteínas como Rho, PAK, LIMK, WASP, complejo Arp 2/3, cofilina, FER, Fyn, Src, FAK y WNKs. El estrés hipertónico también induce cambios en la actividad de proteínas de estrés como p38, JNK, ERK1/2, ERK5, modulándolas a la baja o sobreactivándolas de acuerdo al tipo celular en estudio. Entre los

efectos a largo plazo están la activación de la transcripción génica como en el caso de Ton EBP (del inglés tonicity-responsive enhancer binding protein) (Ferraris y Burg 2006).

1.8 Cinasas WNK (With No K [K=lisina])

Hace ya algunos años, las cinasas WNK se propusieron como parte fundamental en el mecanismo de transducción de señales durante la activación de diversas vías de transporte iónico. Estas proteínas citosólicas son cinasas de residuos de serina/treonina descubiertas en el año 2000 mediante una estrategia de tamizaje en busca de nuevos miembros de la familia de cinasas MAP. Deben su nombre “with no lysine” (sin lisina) a un tipo de organización única en su dominio catalítico, el cual carece de un residuo de lisina en el subdominio II, ampliamente conservado a lo largo de la familia de las serina/treonina cinasas y que funciona como importante sitio de unión a ATP; a pesar de ello, las WNKs son proteínas catalíticamente activas, debido a un residuo de lisina localizado en el subdominio I (Xu *et al.* 2000).

En mamíferos se han descrito cuatro miembros de esta familia, WNK1, WNK2, WNK3 y WNK4 cuyo patrón estructural es muy semejante entre ellas. Cuentan con un dominio cinasa en el NH₂ terminal altamente conservado y subdividido en doce subdominios característicos de todas las cinasas de serina/treonina, un dominio autoinhibitorio que interactúa con el sitio activo de la cinasas ejerciendo un efecto negativo, varios motivos de hélice helicoidal que funcionan como sitios de interacción proteína-proteína y una región COOH terminal con función regulatoria poco conservada entre los miembros de esta familia (Fig. 1.6).

Una enfermedad asociada a alteraciones en los genes que codifican para las cinasas WNK1 y WNK4 ha puesto de manifiesto la importancia de estas proteínas en la homeostasis iónica a nivel sistémico. El pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) es una enfermedad autosómica dominante que cursa con hipertensión arterial, alcalosis metabólica, hiperkalemia e hipercalciuria. Esta alteración es causada por mutaciones en dos loci de las cinasas WNK: mutaciones que aumentan la expresión de WNK1 (12p13.3) y mutaciones de ganancia de

función de WNK4 (17q21). El perfil clínico del PHAII debido a la sobre-expresión de WNK1 puede deberse al incremento en la actividad del cotransportador electroneutro NCC encargado de la reabsorción de NaCl en la membrana apical del túbulo contorneado distal. Por otra parte mutaciones puntuales en el gen de WNK4 (cinco mutaciones descritas hasta el momento: P561L, E562E, D564A/H, Q565E y R1185C) que producen PHAII podrían estar afectando las interacciones proteicas necesarias que median la actividad de WNK4 y que impiden su efecto inhibitor sobre la actividad del NCC (Wilson *et al.* 2001).

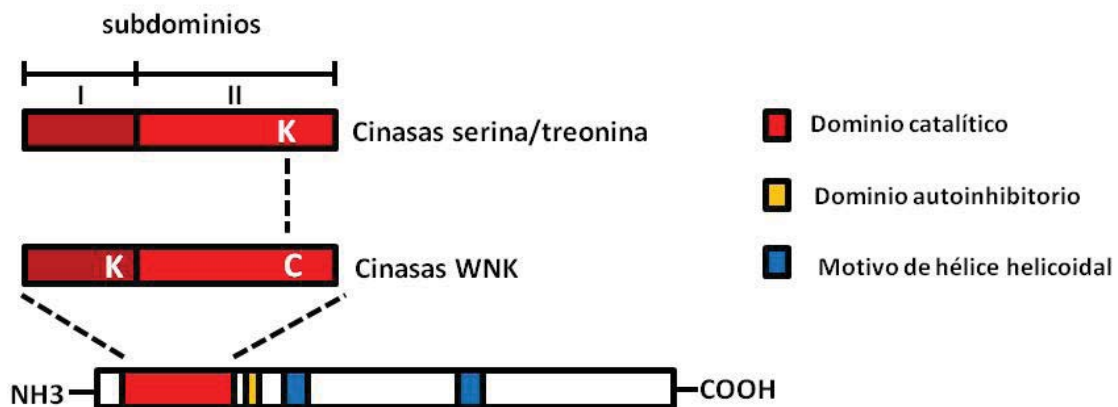


Fig I.6 Estructura de las cinasas WNK. Cuentan con un dominio catalítico en la región amino terminal (de alta identidad entre los miembros de la familia de WNK (85-90%), un dominio autoinhibitorio y una región reguladora en el extremo carboxilo terminal con múltiples sitios de unión a proteínas. En el subdominio II del dominio catalítico, presentan un residuo de cisteína (C) en lugar de la lisina (K) altamente conservada entre los miembros de la superfamilia de serina/treonina cinasas. El residuo de lisina necesario para la actividad de la cinasa se localiza en el subdominio I.

Adicionalmente, todos los miembros de la familia de cinasas WNK han mostrado ser importantes moduladores de la actividad de canales, cotransportadores y vías de transporte transepitelial, además de tener otros efectos sobre diversos procesos fisiológicos. Algunos de estos efectos y las características principales de cada una de ellas se especifican en la tabla I.I.

Tabla I.I Características generales y funciones asociadas a cada miembro de la familia de cinasas WNK

	EXPRESIÓN	CROMOSOMA EN HUMANO	MASA MOLECULAR (KDa)
WNK1	riñón, cerebro, músculo	12	251
WNK2	corazón, colon, SNC	9	243
WNK3	riñón, hígado, intestino delgado, SNC	X	192
WNK4	riñón, hígado, colon, pulmón, piel	17	135

	MODULACIÓN DEL TRANSPORTE IÓNICO		OTRAS FUNCIONES
WNK1	NKCC	↑ Anselmo et al. 2006	Fosforilación de sinaptotagmina 2 (Lee et al. 2004) Activación de ERK5 via MEK2/3 (Xu et al. 2004) Proliferación, diferenciación y migración de progenitoras neurales (Sun et al. 2006) Formación del complejo SNARE (Oh et al. 2007) Desarrollo de neuropatía sensorial hereditaria tipo II (Shekarabi et al. 2008)
	ROMK	↓ Lazrak et al. 2006	
	ENaC	↑ Heise et al. 2010	
	CFTR	↓ Yang et al. 2007	
	Paracel Cl-	↑ Ohta et al. 2006	
	CIC	↓ Hisamoto et al. 2008	
WNK2	NKCC1	↑ Rinehart et al. 2011	Inhibición de MEK vía Rho-GTPasa (Hong et al. 2007; Jun et al. 2009) Potencial supresor de crecimiento celular (Moniz et al. 2007)
	KCC2	↓ Rinehart et al. 2011	
WNK3	NCC	↑ Rinehart et al. 2005	Estimula invasión de gliomas por regulación del volumen celular (Hass et al. 2011) Incrementa sobrevivencia celular dependiente de caspasa 3 (Verissimo et al. 2006)
	NKCC1/2	↑ Rinehart et al. 2005 Kahle et al. 2005	
	KCCs	↓ de los Heros et al. 2006	
	ROMK	↓ Leng et al. 2006	
	TRPV5	↑ Zhang et al. 2008	
	TRPV6	↑ Zhang et al. 2008	
WNK4	KCCS	↓ Garzón-Muvdi et al. 2007	Reduce la expresión del receptor muscarínico M3 (Chung et al. 2011) Incrementa activación de ERK1/2 y p38 por hipertoncicidad (Shaharabany et al. 2008)
	NKCC	↓ Kahle et al. 2004	
	ROMK	↓ Kahle et al. 2003	
	ENaC	↓ Ring et al. 2007	
	TRPV5	↓ / ↑ Cha y Huang 2010/ Jiang et al. 2007	
	Maxi K	↓ Zhuang et al. 2011	
	Paracel Cl-	↑ Tatum et al. 2007	
CFTR	↓ Yang et al. 2007		

1.9 Cinasa WNK3

El caso de WNK3 es de particular interés en el contexto de la regulación del volumen celular tal como se explicará más adelante. El gene de WNK3 se localiza en el cromosoma X y está integrado por 24 exones que codifican para varias isoformas generadas por empalme alternativo a nivel de los exones 18 y 22. En el caso del exón 18 se introducen 141 nucleótidos adicionales a los 91 que conforman el exón 18a, por lo que a los 232 nucleótidos resultantes se les denomina exón 18b. El segundo empalme ocurre por la introducción de un exón completo que corresponde al exón 22 formado por 33 nucleótidos. El resultado son cuatro potenciales isoformas: WNK3-18a, WNK3-18b, WNK3-18a+22 y WNK3-18b+22. El exón 18a se expresa profusamente a lo largo de epitelios, mientras que la isoforma WNK3-18b parece ser exclusiva del sistema nervioso central (Holden, Cox et al. 2004).

El análisis de la actividad de la isoforma renal WNK3-18a revela un comportamiento interesante por su capacidad de regular de manera recíproca la actividad de los cotransportadores electroneutros NKCCs y KCCs. Este efecto fue observado en estudios de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*, en donde la coexpresión de WNK3-18a con NKCC1/2 incrementa significativamente su actividad por efecto del aumento en la fosforilación del cotransportador, incluso bajo condiciones hipotónicas en donde el cotransportador se encuentra normalmente inactivo. Por el contrario, coexpresar a la cinasa con los KCCs abate su actividad inducida por hipotonicidad. Esta modulación se vuelve aun más interesante al analizar el efecto de la variante de WNK3-18a sin actividad catalítica, la WNK3-DA, obtenida por la sustitución del aspartato en la posición 294 por una alanina. WNK3-DA, tiene efectos totalmente opuestos a los de WNK3-18a silvestre, inhibiendo la actividad de NKCC1/2 aún cuando ha alcanzado su máxima actividad y activando considerablemente el funcionamiento de los KCCs (Kahle *et al.* 2005; Rinehart *et al.* 2005) (Fig. 1.7). Estos datos sugieren que WNK3 podría ser capaz de modular los niveles intracelulares de Cl⁻ mediante la alteración de la actividad de los CEN encargados de la entrada y salida de dicho anión.

En cuanto a su mecanismo molecular de acción, WNK3 se ha descrito como una señal precedente a la activación de las proteínas SPAK y OSR1, encargadas de fosforilar directamente a NKCC1/2 en sitios importantes para que su activación sea completa (Pacheco-Alvarez *et al.* 2012; Sengupta *et al.* 2012; Thastrup *et al.* 2012). La fosforilación de los sitios correspondientes en los KCCs da como resultado la inhibición de esta rama de cotransportadores. Por el contrario, se ha descrito que la mutante de WNK sin actividad catalítica, ejerce su efecto activador sobre los KCCs vía proteínas fosfatasas de residuos de serina/treonina, particularmente PP1 y PP2B, sugiriendo que WNK3-DA funciona como proteína de andamiaje reclutando fosfatasas y llevándolas hasta la proximidad de los cotransportadores, permitiendo su defosforilación y por lo tanto la activación de KCCs e inactivación de NKCC1/2 (de Los Heros *et al.* 2006).

Estudios recientes sugieren que la isoforma WNK3-18b+22 tiene efectos opuestos a los de WNK3-18a sobre la actividad del cotransportador NCC, encargado de transportar Cl⁻ al interior celular a favor del gradiente de Na⁺ a nivel de la nefrona distal, funcionando de manera análoga a la mutante sin actividad catalítica de WNK3-18a (WNK3-DA)(Glover *et al.* 2009)(Fig. I.8). Ya que NCC se expresa exclusivamente en riñón y el exón 18b de WNK3 es particular del sistema nervioso, es importante evaluar el efecto de todas las isoformas de WNK3 con particular énfasis en aquellas que colocalizan histológicamente con los distintos CEN de la familia SLC12.

En cuanto al volumen celular, la conocida participación de los cotransportadores electroneutros en los procesos de regulación del volumen celular, así como de otras vías de transporte iónico moduladas por WNK3 muestra la relevancia de evaluar la participación de WNK3 en los procesos de DRV e IRV.

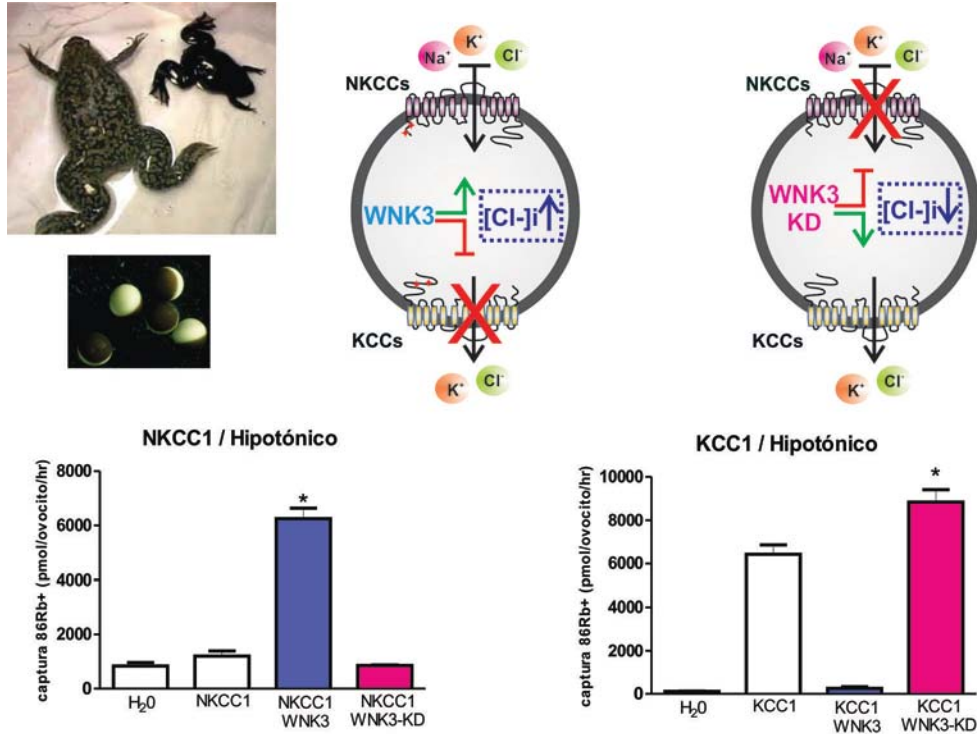


Fig. 1.7 Efecto de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores electroneutros NKCCs y KCCs. Ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*. La cinasa WNK3 regula de manera recíproca la actividad de los cotransportadores electroneutros, sugiriendo un efecto sobre la [Cl⁻]_i. Las gráficas fueron modificadas de Kahle et al. 2005.

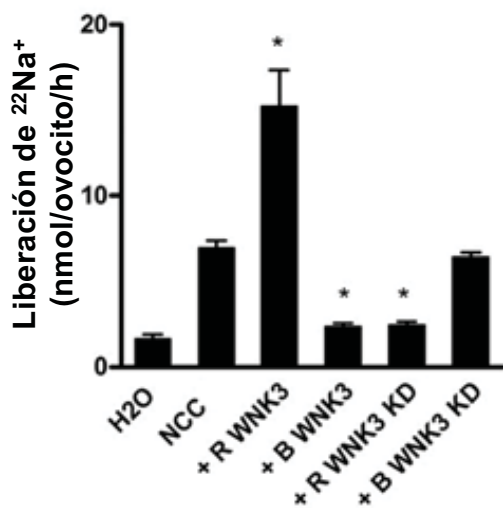


Fig. 1.8 Efecto de la isoforma WNK3 18b+22 (B WNK3) vs la isoforma WNK3 18a (R WNK3) sobre la actividad del cotransportador NCC. Ovocitos de *Xenopus* fueron inyectados con el RNAc del cotransportador solo o en presencia de las isoformas de WNK3 y sus variantes sin actividad catalítica (KD). *Significativamente diferente de la captura de ²²Na⁺ en ovocitos inyectados con el cotransportador NCC. La gráfica fue tomada y modificada de Glover et al. 2009.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso celular de recuperación del volumen en respuesta al estrés osmótico se ha estudiado ampliamente. Algunos aspectos, sin embargo, están poco aclarados. Es el caso de la identificación de la red de señales intracelulares activada ante una condición anisotónica y la subsecuente regulación de la actividad de canales o transportadores que permiten la recuperación del volumen. Se ha demostrado que los cotransportadores NKCC y KCC son sensibles a cambios en la osmolaridad extracelular, activándose bajo una condición hiper e hipotónica respectivamente. WNK3 es una cinasa que tiene la capacidad de modular la actividad de estos cotransportadores de forma recíproca y de manera dependiente de su actividad catalítica, activando a NKCC e inactivando a los KCCs, mientras que cuando carece de actividad catalítica, su efecto es opuesto, activando a los KCCs e inactivando a NKCC. Estos estudios se han llevado a cabo en ovocitos, sin que exista información en células de mamífero acerca del vínculo de la cinasa con los transportadores y su influencia en la regulación del volumen. En este contexto, es interesante responder la interrogante de si WNK3 es una cinasa que participa en los procesos de regulación del volumen celular y de ser así, cuáles son los mecanismos efectores de la recuperación del volumen que se encuentran bajo su influencia.

III. HIPÓTESIS

WNK3 es una cinasa que forma parte de la señalización celular durante los procesos de DRV e IRV, ejerciendo su efecto sobre la actividad de los mecanismos efectores de la recuperación del volumen: vía osmosensible de liberación de taurina, canal de Cl^-_{vol} , KCCs y NKCC.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la sobre-expresión de la cinasa WNK3 sobre los procesos de regulación del volumen celular frente condiciones de estrés osmótico en un modelo de células de mamífero HEK293.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar líneas HEK293 que expresen de manera estable a WNK3 y a la mutante sin actividad catalítica WNK3-DA como modelos de estudio.
- Determinar la distribución subcelular de WNK3 y la dinámica de la proteína frente al estrés osmótico.

WNK3 y el DRV

- Determinar el efecto de WNK3 sobre la eficiencia del proceso de DRV ante el estrés hipotónico.
- Examinar si el proceso de DRV es dependiente de la actividad catalítica de WNK3.
- Identificar los mecanismos de liberación de osmolitos que participan en el DRV y la influencia de WNK3 sobre su actividad.

WNK3 y el IRV

- Determinar el efecto de WNK3 sobre la eficiencia del proceso de IRV ante el estrés hipertónico.
- Investigar si el proceso de IRV es dependiente de la actividad catalítica de WNK3.
- Explorar el efecto de WNK3 sobre el funcionamiento de las vías de captura de osmolitos que operan durante el IRV.

Isoformas de WNK3 y cotransportadores electroneutros

- Empleando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión funcional, examinar las isoformas de WNK3 haciendo un análisis comparativo de sus efectos sobre la actividad de todos los CEN de la familia SLC12.

V. MÉTODOS

Ensayos en células HEK293

Amplificación de WNK3 endógena

Para determinar la expresión endógena de WNK3 en la línea celular HEK293, se realizó la extracción del RNA total de las células mediante el kit “Tripure isolation reagent” (Roche), la calidad del RNA fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehido y la concentración se determinó por espectrofotometría de luz UV. El DNA complementario (cDNA) se obtuvo mediante la reacción de retrotranscripción a partir del RNA extraído de las células. La isoforma endógena de WNK3 fue amplificada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como templado el cDNA y oligonucleótidos que flanquean los exones 18 y 22, los cuales fueron:

sentido 5'-TCCTCAGATGCTTCACTTCCA-3'

antisentido 5'- GTGTAAGTTGGTATTATG-3'

Generación de líneas estables WNK3+ y WNK3-DA

La mayoría de los ensayos que se llevaron a cabo en el presente trabajo doctoral estudian el comportamiento celular a nivel poblacional, requiriendo de un alto porcentaje de transfección, que no es logrado mediante la sobre-expresión transitoria de la proteína; por lo tanto se generaron líneas celulares que expresan de manera estable a la cinasa WNK3 y a su variante catalíticamente inactiva. Para llevar a cabo la sobre-expresión de WNK3 en células HEK293, se subclonó el cDNA de la isoforma 18a de WNK3 (clona WNK3-18a en pGH19, amablemente donada por el Dr. Gerardo Gamba) en el vector especial para expresión en células de mamífero, pcDNA3.1/NT-GFP TOPO (Invitrogen), que esta fusionado a la proteína verde fluorescente y cuenta con el gen de resistencia a neomicina. Se utilizaron los sitios de restricción 5' KpnI 3' NotI y el cDNA de WNK3 se fusionó al extremo 3' terminal de la GFP. Para generar la variante sin

actividad catalítica de WNK3 se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos con la mutación deseada y se utilizó el kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChange Mutagenesis (Stratagene). Este cambio consistió en sustituir el aminoácido aspartato que se encuentra en la posición 294 por una alanina con el fin de interrumpir la actividad cinasa de la proteína. La sustitución del aminoácido se realizó mediante una única reacción de cadena de la polimerasa. Bacterias XL 10-Gold se transformaron con el cDNA al que se le insertó la mutación. El tamaño de todas las clonas fue corroborado a través del análisis de restricción, linearizando con la enzima Not I. Adicionalmente, el cDNA de las clonas transformantes se secuenció de manera automatizada para corroborar la correcta inserción de la mutación.

Las células HEK293 se crecieron en cajas de 35 mm a 90% de confluencia y se transfectaron mediante Lipofectamina 2000® (Invitrogen), de acuerdo al protocolo del fabricante, utilizando $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ de cDNA de cada una de las construcciones. Transcurridas 24 h después de la transfección, el medio de cultivo fue suplementado con el antibiótico G418, análogo de la neomicina (Calbiochem, Merck Millipore) a una concentración final de 3 mg/ml. Los cambios de medio fueron realizados cada 36 h manteniendo el antibiótico presente. Dos semanas después, las células que integraron a WNK3 a su genoma, formaron colonias resistentes al antibiótico y fueron aisladas aquellas colonias positivas para GFP que se expandieron en medio de selección con G418 a una concentración final de 1 mg/ml. La sobre-expresión de WNK3 y WNK3-DA se corroboró por ensayos de inmunoblot.

Cultivo celular

Las líneas celulares fueron mantenidas con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomina (GIBCO), en una atmósfera humidificada y bajo condiciones estándar de incubación (5% de CO_2 y 95% de O_2 a 37°C). Las células se sembraron en cajas de 35 mm a una densidad de 1.5×10^5 células/caja para ensayos de captura de $^{86}\text{Rb}^+$ y liberación de ^3H -taurina. Cajas de 35 mm a una densidad de 25×10^3 células/caja fueron utilizadas para ensayos de $[\text{Cl}^-]_i$ y registros electrofisiológicos. En el

caso de los ensayos de inmunoblot las células fueron sembradas en cajas de 60 mm. Dependiendo del experimento, las células fueron utilizadas 1-3 días después de la resiembra.

Ensayos tipo Western blot

Con la finalidad de determinar la correcta sobre-expresión de WNK3 a nivel de proteína en nuestro modelo experimental, utilizamos la técnica de inmunoblot mediante su detección con un anticuerpo específico para WNK3. Las células fueron despegadas y lisadas utilizando buffer de lisis. Los homogenados fueron sonicados y centrifugados a 11000 g por 5 min, recuperando el sobrenadante. La concentración de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford y se separaron 80 µg de proteína por SDS-PAGE (gel de acrilamida 7.5%). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad) y fueron bloqueadas con 5% (p/v) de leche libre de grasas en TBS-Tween (TBS-T) e incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (1:1000) anti-WNK3 (Alpha Diagnostic International), anti-GFP o anti-β actina (Santa Cruz Biotechnology). Después de 4 lavados de 5 min con TBS-T las membranas se incubaron con el anticuerpo correspondiente acoplado a la peroxidasa de rábano HRP (1:7500, Zymed) durante 1 h a temperatura ambiente. El reactivo ECL®-Plus Western Blot Detection Reagents (GE Healthcare) fue usado para llevar a cabo la reacción de quimioluminiscencia. Las bandas fueron visualizadas por exposición de films Kodak BioMax (Sigma).

BUFFER DE LISIS	en mM	TBS -T	en mM
Tris/HCl pH 7.4	20	Tris/HCl	100
EDTA	1	NaCl	150
EGTA	1	Tween 20	0.1%
NaCl	50		
Tritón X-100	1%	pH 7.5	
Na ₃ VO ₄	0.5		
2-glicerofosfato	1		

Inmunocitoquímica

Para estudiar la localización subcelular de WNK3 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia comparando la distribución de la proteína endógena con la de las líneas que sobre-expresan a WNK3 o a la mutante WNK3-DA, así como el efecto de una condición anisotónica sobre dicha distribución. Las células cultivadas en cubreobjetos redondos a una densidad de 25×10^3 células/caja en cajas de 35 mm fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min, lavadas 3 veces durante 5 min cada una con PBS + BSA 0.1%, permeabilizadas y bloqueadas con PBS + BSA 0.1% + suero de cabra 10% + Tritón 100X 0.3% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se incubaron con los anticuerpos anti-WNK3 (1:100, Alpha Diagnostic International), anti-occludina (1:100, Zymed), o anti-golgina-97 (1:60, Molecular Probes) toda la noche a 4°C. Las células fueron lavadas 3 veces durante 5 min cada una con PBS + BSA 0.1% e incubadas con los anticuerpos secundarios fluorescentes anti conejo acoplado a FITC (1:250, Zymed) o anti ratón conjugado a CY5 (1:250, Molecular Probes) a temperatura ambiente y los lavados fueron repetidos. Los cubreobjetos se montaron utilizando medio de montaje DAPI (Vector Laboratories). Las fotografías fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000.

Mediciones de cambios en el volumen celular

Uno de los principales propósitos del presente trabajo fue evaluar el efecto de la sobre-expresión de WNK3 o WNK3-DA sobre los cambios en el volumen de células expuestas a alteraciones en la osmolaridad, para este fin se midieron la reducción o incremento relativo del volumen con respecto al registro obtenido en la condición isotónica. Para llevar a cabo los registros, las células se cultivaron en cubreobjetos rectangulares (10x50 mm) al 90% de confluencia en el momento del experimento y se utilizó un sistema de dispersión del ángulo de luz de acuerdo a McManus *et al.* 1993. Los cubreobjetos fueron colocados en un ángulo de 50° relativo a la luz de incidencia en una celda con 1 ml de medio isotónico en un espectrómetro de luminiscencia Fluoromax-3 Horiba. Las células fueron excitadas a 585 nm con una lámpara de

argón y la dispersión de la luz fue detectada a la misma longitud de onda. Las células se mantuvieron durante 100 s en solución isosmótica (2 ml). El estímulo hipotónico se obtuvo adicionando a la celda 1 ml de una solución que contiene una concentración reducida de NaCl 298 mOsm (H15%). El estímulo hipertónico (600 mOsm) se generó agregando a la celda 1 ml de solución isotónica adicionada con 500 mM de sorbitol. Ya que la señal de emisión correlaciona de manera inversa con el volumen, los resultados son expresados de acuerdo a la ecuación I_o/I_t , en donde I_o es el promedio de la señal de emisión cuando la basal ha sido ajustada antes de estímulo (promedio de los primeros 100 s) y la señal de emisión al tiempo t está representada por I_t .

MEDIO ISOTÓNICO	en mM
NaCl	160
KCl	5
MgSO ₄	1.17
CaCl ₂	1
Glucosa	10
HEPES	10
350mOsm pH 7.4	

La composición del medio se ajustó a la osmolaridad del medio de cultivo en el que las células están creciendo al momento del experimento (345±5 mOsm). La osmolaridad fue determinada mediante un osmómetro de punto de congelamiento (Osmette A, Precision Systems Inc).

Ensayos de liberación osmosensible de ³H-aurina

Para probar el efecto de sobre-expresar la cinasa WNK3 sobre la vía de liberación de osmolitos tomando como representativo a la taurina, las células fueron pre-incubadas con ³H-aurina (0.5 µCi/ml) durante 1 h en medio isotónico. Después de la incubación, fueron lavadas por 8 min con medio isotónico y perfundidas a 1 ml/min por 5 min para estabilizar la liberación basal. El medio fue reemplazado por solución hipotónica y las muestras fueron colectadas durante 1 ml/min por 8 min. Al final del experimento, las células fueron raspadas y la radioactividad remanente en las células así como en las colectas de cada minuto fue determinada en un contador de β-centelleo

líquido. Los resultados son expresados como porcentaje de liberación del isótopo radioactivo por minuto, con respecto a la radioactividad total incorporada durante el tiempo de captación.

Registros electrofisiológicos de la corriente de Cl^-_{vol}

El estudio de la ICl^-_{vol} y de las posibles modificaciones debidas a la sobre-expresión de WNK3 y la variante sin activada catalítica, fueron medidas con un amplificador de patch-clamp Axopatch 200 (Axon Instruments) usando la configuración de célula completa. Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente (25°C). Los electrodos de vidrio de borosilicato 1.5-mm OD, 1.0-mm ID (World Precision Instruments) se utilizaron con resistencias entre 3 y 5 MΩ cuando son llenados con la solución intracelular. La señal registrada fue filtrada a 10 kHz y transferida a una computadora con la interfase Digidata 1200 (Axon Instruments). Todos los registros fueron adquiridos y analizados con el software pCLAMP6 (Axon Instruments). Las corrientes fueron evocadas por pulsos de voltaje desde -100 a +100 mV en incrementos de 20 mV con una duración de 300 ms, fijando el potencial a 0 mV. El protocolo de voltaje se aplicó cada 2 min y la corriente a +100 mV fue monitoreada. Para expresar los datos como densidad de corriente, la capacitancia de la célula fue obtenida al comienzo del registro integrando el transitorio de corriente capacitiva. La solución hipotónica extracelular (298 mOsm) fue preparada omitiendo el manitol de la solución extracelular estándar, este procedimiento no altera el potencial de inversión del Cl^- (0 mV). Los cambios de las soluciones se llevaron a cabo utilizando un sistema de perfusión basada en bomba peristáltica. En los experimentos con bloqueadores DCPIB (10 μM) (Tocris Bioscience) o DIOA (20 μM) (Sigma), los compuestos fueron adicionados al medio hipotónico después de que la ICl^-_{vol} se estabilizó.

SOLUCIÓN EXTRACELULAR	en mM
NaCl	135
KCl	5
MgSO ₄	1.7
CaCl ₂	1
Glucosa	5
HEPES	10
manitol	50

350mOsm pH 7.4

SOLUCIÓN INTRACELULAR en mM	
CsCl	117.5
TEA-Cl ⁻	20
MgCl ₂	1
CaCl ₂	0.7
HEPES	10
EGTA	1
manitol	44
Mg-ATP	5
335mOsm pH 7.4	
Calcio amortiguado=200nM	

Ensayos de la actividad de los cotransportadores NKCC y KCCs

Para determinar el efecto de la sobre-expresión de WNK3 sobre la actividad de los CEN como mecanismos efectores de la recuperación del volumen celular, se llevaron a cabo ensayos de la actividad del NKCC y de los KCCs en cada una de las líneas generadas. Debido a la naturaleza electroneutra de los cotransportadores NKCC y KCCs, su actividad no puede evaluarse mediante el registro de cambios en el voltaje de la membrana celular, por lo cual la estrategia para cuantificar su funcionamiento es a través de la captura de iones radioactivos. El ⁸⁶Rb⁺ utiliza las mismas vías que el K⁺ para su movilización. Ensayos de captura de ⁸⁶Rb⁺ sensible a bumetanida fueron llevados a cabo para medir la actividad del cotransportador NKCC en condiciones iso o hipertónicas. Las células fueron pre-incubadas por 30 min en un medio libre de Cl⁻ suplementado con ouabaina 0.1 mM y luego transferidas al medio de captura que contiene 0.1 mM de ouabaina, más 1 μCi ⁸⁶Rb⁺/ml por 3 o 15 min. La captura de ⁸⁶Rb⁺ debida a la actividad del NKCC fue calculada por substracción de la captura en presencia de 10 μM de bumetanida (Sigma).

MEDIO LIBRE DE Cl ⁻	en mM	MEDIO DE CAPTURA	en mM
gluconato-Na ⁺	150	NaCl	160
gluconato-K ⁺	10	KCl	10
gluconato-Ca ²⁺	4.6	MgSO ₄	1
MgSO ₄	1	CaCl ₂	1
glucosa	5	glucosa	5
HEPES	10	HEPES	10
350 o 600 mOsm pH 7.4		350 o 600 mOsm pH 7.4	

Ya que la actividad del KCC es dependiente de la presencia de ambos iones (K^+ y Cl^-), su funcionamiento fue medido como captura de $^{86}Rb^+$ dependiente de Cl^- , en medio isos e hipotónico. Las células fueron pre-incubadas durante 30 min en una solución libre de Cl^- y de Na^+ con 0.1 mM de ouabaina, favoreciendo que las concentraciones de Cl^- y K^+ fueran menores en el interior celular. Posteriormente las células se pusieron en contacto con una solución libre de Na^+ adicionada con 0.1 mM de ouabaina y $^{86}Rb^+$ 1 μCi /ml durante 10 min. Remover el Na^+ extracelular previene la captura de $^{86}Rb^+$ por el NKCC endógeno e incrementar la concentración de KCl en la solución extracelular de captura hasta 10 mM favorece el funcionamiento del cotransportador en reversa (hacia el interior celular). Bajo estas condiciones el $^{86}Rb^+$ puede moverse al interior celular mediante los KCCs o bien a través de canales de K^+ , por lo que la captura debida exclusivamente a los KCCs es considerada como aquella fracción sensible a Cl^- (se utilizó un medio libre de Cl^- en donde dicho anión es reemplazado por gluconato). La captura de $^{86}Rb^+$ es normalizada con respecto a la concentración de proteína y los resultados se expresan como pmol / ($\mu g \times min$).

MEDIO LIBRE DE Na^+ y Cl^-	en mM	MEDIO LIBRE DE Na^+	en mM
N-metil-D-glucomina-gluconato	150	N-metil-D-glucomina - Cl^-	150
gluconato- K^+	10	KCl	10
gluconato- Ca^{2+}	4.6	$CaCl_2$	1
$MgSO_4$	1	$MgSO_4$	1.7
glucosa	5	glucosa	5
HEPES	10	HEPES	10
350 o 298 mOsm pH 7.4		350 o 298 mOsm pH 7.4	

Determinación de la concentración intracelular de Cl^-

Ya que la actividad de los CEN determina los niveles intracelulares de Cl^- y estos posiblemente se encuentren bajo la influencia de WNK3, se realizaron ensayos para determinar la $[Cl^-]_i$ en cada una de las líneas: V, WNK3+ y WNK3-DA. Para determinar los cambios en la $[Cl^-]_i$ se utilizó el indicador fluorescente 6-metoxi-N-etilquinolinium yodo (MEQ). Este tipo de indicadores funcionan por el apagamiento colisional mediante sales iónicas, en este caso el Cl^- . La intensidad de fluorescencia del compuesto será inversamente proporcional a la $[Cl^-]$ (Bowers y Verkman

1991). El indicador fluorescente MEQ se redujo bajo una atmósfera rica en N_2 utilizando borohidrido de sodio ($30 \mu M$) hasta crear el compuesto permeable dihydro-MEQ (diH-MEQ). Las células fueron incubadas durante 10 min con diH-MEQ ($25 \mu M$) recién preparado y posteriormente lavadas y preincubadas 15 min at $37^\circ C$ para obtener una distribución intracelular homogénea. El diH-MEQ es rápidamente reoxidado a MEQ dentro de la célula volviéndose impermeable (absorción/emisión máxima de 344/440 nm). Los cambios en la fluorescencia fueron observados utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. Las células fueron perfundidas con solución isotónica durante 5 min para obtener la fluorescencia basal y luego con medio hipotónico durante 15 min. Las imágenes fueron capturadas cada minuto y la intensidad de la señal fue determinada utilizando el software Image J (ImageJ 1.36b NIH, EUA). La relación entre la intensidad de la fluorescencia del indicador y la $[Cl^-]$, está dada por la ecuación de Stern-Volmer $(F_0/F_{Cl^-}) - 1 = K_q [Q]$, en donde F_0 = intensidad de fluorescencia obtenida cuando las células se encuentran en una solución libre de Cl^- y en presencia de anfotericina B, F_{Cl^-} = intensidad de la fluorescencia en presencia de una concentración determinada de Cl^- , $[Q]$ = concentración e Cl^- y K_q =valor de la constante de Stern-Volmer. El fármaco anfotericina B ($10 \mu M$) fue utilizado para equilibrar las concentraciones intra y extracelulares de Cl^- . Las células fueron colocadas en soluciones con concentraciones crecientes de Cl^- (20, 40 y 80 mM) por 5 min cada una, finalmente la fluorescencia fue apagada por adición de KSCN 160 mM para obtener la fluorescencia de fondo. El total de fluorescencia del MEQ, fue obtenida de la resta de la fluorescencia en presencia de KSCN a la fluorescencia obtenida en medio libre de Cl^- (F_0) (gluconato- K^+ 140 mM, gluconato- Ca^{2+} 4.6 mM, pH 7.4). A partir de la pendiente obtenida de la gráfica de F_0/F_{Cl^-} vs $[Cl^-]$ se obtuvo la constante de Stern-Volmer (K_q) y se determinó la $[Cl^-]_i$ en cada condición.

Ensayos en ovocitos de *Xenopus laevis*

Para determinar el efecto de las cuatro isoformas de WNK3 sobre la actividad de los CEN de la familia SLC12 se utilizó como abordaje experimental su coexpresión en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Obtención de clonas y transcripción in vitro del cRNA

Para obtener el cDNA de las cuatro potenciales isoformas de WNK3 generadas por empalme alternativo se llevo a cabo el siguiente protocolo. A partir de una genoteca de cerebro fetal humano (Clontech) usando el sistema Expand High Fidelity Plus PCR (Roche) y oligonucleótidos específicos diseñados flanqueando los sitios de restricción Stu I y Dra III, se amplificó un fragmento de WNK3 que contiene el exón 18b. Este fragmento fue fusionado a la clona original WNK3-18a. El exón 22 fue insertado en las clonas WNK3-18a y WNK3-18b utilizando una estrategia de PCR de dos pasos. Los oligonucleótidos utilizados para tal fin fueron:

Fragmento AB (1188 y 1325 pdb)

sentido 5'-TCCTCAGATGCTTCACTTCCA-3'

antisentido 5'ATTTCCAACCTCATTTATAAGGCAGCTTTCCCTGTAGCAACTATGCCATTGTCCACATGTGTC-3'

Fragmento CD (759 y 793 pdb)

sentido 5'GGGAAAAGCTGCCTTATAAATGAGTTGGAAAATCCACTGTGTGTGGAGAGTAATGCAGCATCATGC 3'

antisentido 5'-GTGTAAGTTGGTATTATG-3'

En el segundo paso de PCR para obtener el fragmento AD (1947 y 2118 pdb) que contiene al exón 22, se utilizaron los fragmentos AB y CD purificados en gel de agarosa y los siguientes oligonucleótidos:

sentido 5'-TCCTCAGATGCTTCACTTCCA-3'

antisentido 5'- GTGTAAGTTGGTATTATG-3'

Los fragmentos 18b y 22 fueron también insertados dentro del cDNA de WNK3 sin actividad catalítica. La identidad molecular de todas las construcciones se corroboró por secuenciación automatizada.

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* tanto de WNK3 como de los cotransportadores electroneutros, cada cDNA fue linearizado en el extremo 3' utilizando las enzimas de restricción Not I, Nhe I o Xba I (New England Biolabs) y se utilizó el sistema de transcripción de la RNA polimerasa T7 mMMESSAGE mMACHINE (Ambion). La integridad de cada RNAc fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa/formaldehído y su concentración se determinó en un espectrofotómetro mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm (DU 640, Beckman).

Extracción e inyección de ovocitos de Xenopus laevis

Los ovocitos fueron obtenidos de ranas adultas *Xenopus laevis* (NASCO) mantenidas a 18°C bajo condiciones controladas de luz. Los animales fueron sometidos a cirugía bajo anestesia por inmersión en triclaína 0.17%. Los ovocitos colectados se defolicularon manualmente después de haber permanecido 1 hr en agitación vigorosa en una solución ND96 libre de Ca²⁺, adicionado con 2 mg/ml de colagenasa. Una vez defoliculados, se incubaron durante toda la noche en medio ND96 a 16°C. Al día siguiente, los ovocitos seleccionados se microinyectaron con 50 nl de agua o con el RNAc de los genes de interés y fueron almacenados de 2 a 3 días a 16°C en medio ND96 suplementado con piruvato de sodio 2.5 mM y 5 mg/100ml de gentamicina, realizando cambios de medio cada 24 hrs. Dos horas antes de llevar a cabo el ensayo de captura con los isótopos radioactivos, los ovocitos (10 ovocitos por cada grupo experimental) fueron colocados en medio ND96 libre de Cl⁻. La osmolaridad de los medios fue ajustada con sacarosa.

MEDIO ND96 LIBRE DE Cl ⁻ en mM	MEDIO ND96 libre de Ca ²⁺ en mM
isetionato-Na ⁺	NaCl
96	96
gluconato-K ⁺	KCl
2	2
gluconato-Ca ²⁺	MgCl ₂
6	1
gluconato-Mg	HEPES
1	5
HEPES	
5	
piruvato- Na ⁺	
2.5	
gentamicina	
5mg/100ml	
	210 mOsm pH 7.4
210mOsm pH 7.4	

Ensayos funcionales de los CEN de la familia SLC12

La actividad de los CEN se evaluó mediante ensayos funcionales con trazadores radioactivos, ⁸⁶Rb⁺ o ²²Na⁺. Los RNAc utilizados fueron: NCC humano, NKCCC1 y NKCC2 de rata, KCCs (KCC1, KCC2a, KCC2b, KCC3a, KCC3b, o KCC4) de humano y de las isoformas de WNK3 de humano. Los ovocitos fueron inyectados con el RNAc del cotransportador correspondiente, solo o junto con el RNAc de las distintas isoformas de WNK3 wt o sus variantes sin actividad catalítica. Después de 2-3 días de incubación, la captura de ²²Na⁺ sensible a metolazona para NCC, ⁸⁶Rb⁺ sensible a bumetanida para NKCC1/2 o ⁸⁶Rb⁺ dependiente de Cl⁻ para los KCCs fue determinada de acuerdo a las siguientes especificaciones.

Diferentes estrategias de sustitución iónica y el uso de inhibidores a concentraciones específicas permitieron que los ensayos de captura fueran selectivos para cada cotransportador.

Fármaco/Medio	Concentración (en mM)	Molécula Blanco
Ouabaina	1	ATPasa Na ⁺ /K ⁺
Amilorida	0.1	Canales de Na ⁺ /intercambiador NHE
Bumetanida	0.1	NKCC1/2
Metolazona	0.1	NCC
Medio libre de K ⁺	-	NKCC1/2 y NCC
Medio libre de Na ⁺	-	NKCC1/2

Ensayos de captura de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida (NKCC1/2)

La actividad basal de NKCC1/2 expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* fue medida en una solución con 160 mOsm o su máxima activación por hipertonicidad 260 mOsm. Los ovocitos fueron incubados por 30 min en un medio libre de Cl^- suplementado con ouabaina 1 mM y transferidos al medio de captura que contiene 1 mM de ouabaina más 1 $\mu\text{Ci } ^{86}\text{Rb}^+/\text{ml}$, durante 1 h. Para determinar la captura debida a NKCC1/2 grupos en paralelo fueron expuestos al mismo medio de captura pero en presencia de bumetanida 0.1 mM.

MEDIO LIBRE DE Cl^-	en mM	MEDIO DE CAPTURA	en mM
gluconato- Na^+	62	NaCl	62
gluconato- K^+	10	KCl	10
gluconato- Ca^{2+}	4.6	CaCl_2	4.6
gluconato-Mg	1	MgCl_2	1
HEPES	5	HEPES	5
<hr/> 160 o 260 mOsm pH 7.4		<hr/> 160 o 260 mOsm pH 7.4	

Ensayos de captura de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a metolazona (NCC)

Los ovocitos fueron pre-tratados durante 30 min con un medio libre de Cl^- suplementado con 1 mM de ouabaina, 0.1 mM de amilorida y 0.1 mM de bumetanida. Posteriormente fueron expuestos a la solución de captura que consiste de un medio libre de K^+ con 0.1 mM de ouabaina, 0.1 mM de amilorida, 0.1 mM de bumetanida y 2 $\mu\text{Ci } ^{22}\text{Na}^+/\text{ml}$. La captura de $^{22}\text{Na}^+$ debida al NCC se determinó utilizando grupos en paralelo que fueron expuestos al mismo medio de captura pero en presencia de 0.1 mM de metolazona.

MEDIO LIBRE DE Cl^-	en mM	MEDIO LIBRE DE K^+	en mM
isetionato- Na^+	96	NaCl	40
gluconato- K^+	2	N-metil-D-glucamina- Cl^-	56
gluconato- Ca^{2+}	1.8	CaCl_2	1.8
gluconato-Mg	1	MgCl_2	1
HEPES	5	HEPES	5
<hr/> 210 mOsm pH 7.4		<hr/> 210 mOsm pH 7.4	

Ensayos de captura de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de Cl^- (KCCs)

Los ovocitos fueron pre-incubados durante 30 min en un medio libre de Cl^- y de Na^+ en presencia de 1 mM de ouabaina, seguido de 1 h de incubación en medio libre de Na^+ previamente suplementado con 1 mM de ouabaina y 1 μCi de $^{86}\text{Rb}^+$ /ml. La captura atribuida a los KCC se determinó por exposición de grupos de ovocitos a medio de captura libre de Cl^- en el que el Cl^- fue sustituido por gluconato.

<u>MEDIO LIBRE DE Na^+ y Cl^-</u>	<u>en mM</u>	<u>MEDIO LIBRE DE Na^+</u>	<u>en mM</u>
N-metil-D-glucamina-gluconato	50	N-metil-D-glucamina - Cl^-	50
gluconato- K^+	10	KCl	10
gluconato- Ca^{2+}	4.6	CaCl_2	1.8
gluconato- Mg^{2+}	1	MgSO_4	1
HEPES	5	HEPES	5
<hr/>		<hr/>	
110 o 210 mOsm pH 7.4		110 o 210 mOsm pH 7.4	

Todos los experimentos de captura se llevaron a cabo a 32 °C. Al final del periodo de captura, los ovocitos fueron lavados tres veces en medio de captura frío sin el isótopo radioactivo. Los ovocitos fueron disueltos en SDS al 10% y la actividad del trazador fue determinada en cada ovocito usando un contador de centelleo líquido.

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media \pm error estándar. Diferencias significativas entre los grupos experimentales fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de corrección de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a $*P < 0.05$.

En los experimentos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*, la captura en los grupos control fue tomada como 100% y los grupos experimentales fueron normalizados con respecto al control. Diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a $*P < 0.001$.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos como parte de esta tesis doctoral han sido divididos en dos secciones. La primera sección incluye datos publicados en la revista Pflügers Archiv - European Journal of Physiology en 2012. El artículo correspondiente, "*Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells*" se encuentra en el apéndice I y constituye la parte central de la investigación, abordando el objetivo principal de la tesis al evaluar el efecto de la sobreexpresión de WNK3 sobre los proceso de regulación del volumen celular.

En la segunda sección y como parte de los objetivos particulares del proyecto de investigación, la publicación "*Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters*" se enfoca al análisis comparativo del efecto de las cuatro isoformas de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores electroneutros Cl⁻/catión. Dicho artículo se puede encontrar en el apéndice II y fue publicado en la revista American Journal of Physiology-Cell Physiology en 2011.

SECCIÓN I

Influencia de WNK3 en la concentración intracelular de cloruro y la regulación del volumen en células HEK293

Expresión endógena de WNK3

Para identificar las isoformas de WNK3 expresadas de manera endógena en las células HEK293, se amplificó un fragmento de DNA entre los exónes 18 y 23, utilizando como templado el cDNA obtenido de las células HEK293 y oligonucleótidos que flanquean los sitios de empalme alternativo. En la figura VI.1 (a y b) se muestran las cuatro potenciales isoformas de WNK3 y los sitios sobre los cuales fueron diseñados los oligonucleótidos. Utilizando distintas condiciones de astringencia en la reacción de PCR, se amplificó un fragmento con un peso molecular de ~1.2 Kb, que migró a la misma distancia que la banda amplificada a partir de la construcción WNK3-18a

clonada en pGH19 y que fue utilizada como control (Fig. VI.1c). Los fragmentos fueron purificados del gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y secuenciados automáticamente. La secuencia de los amplificados muestra que el fragmento de WNK3 carece tanto de 141 pdb (pares de bases) que codifican para 47 aminoácidos correspondientes al exón 18b, como de 11 aminoácidos que conforman al exón 22 (Fig.VI.1d). Esta isoforma es denominada WNK3-18a.

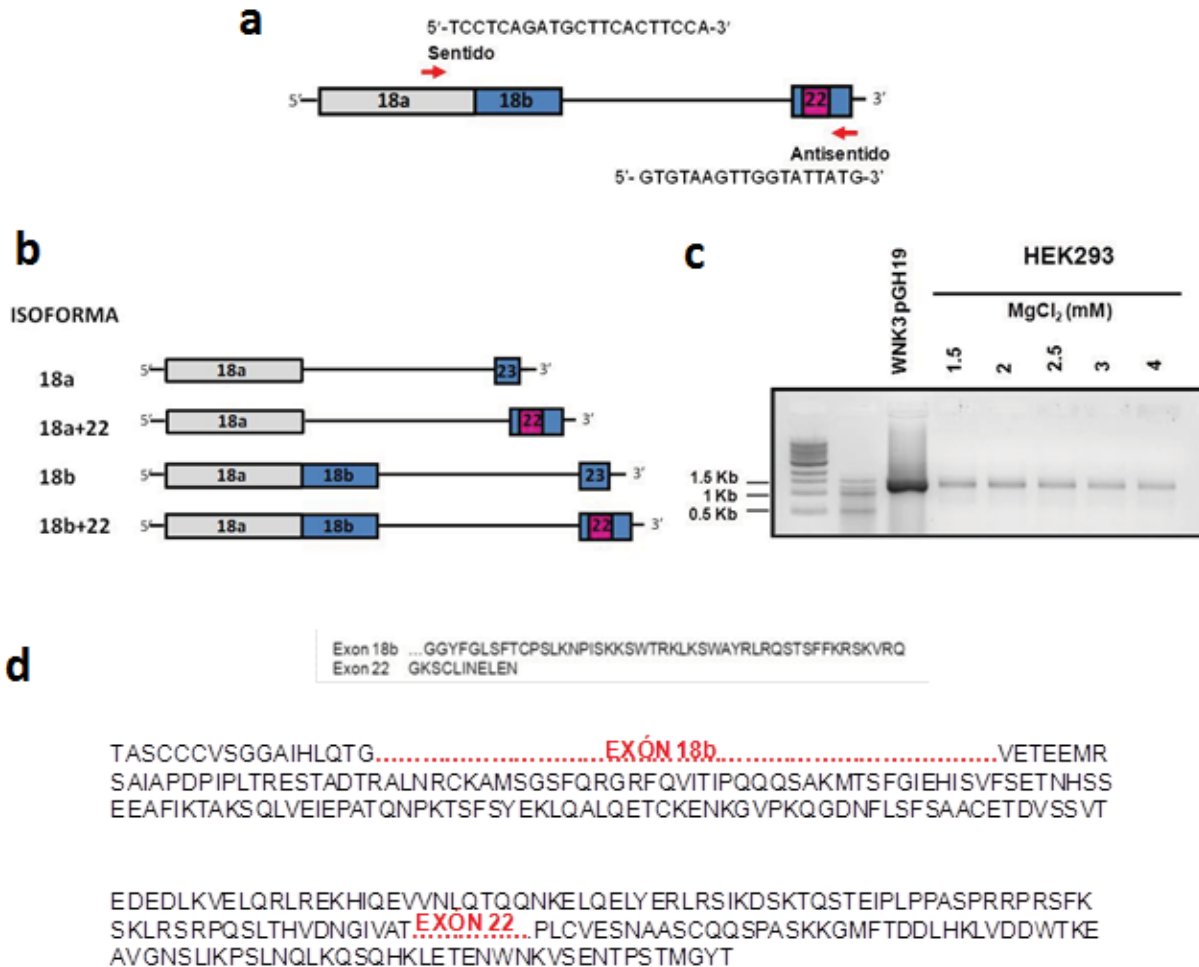


Fig. VI.1 Amplificación de WNK3 endógena de las células HEK293. Los oligonucleótidos fueron diseñados sobre los exones 18a y 23 como se indica en a. En b se muestran las cuatro potenciales isoformas que pueden ser amplificadas a partir de esta estrategia. (c) Productos amplificados a partir de la reacción de PCR siguiendo el siguiente protocolo: desnaturación 95°C 1min, alineamiento 55°C 1min, extensión 40 ciclos de 68°C por 3min. Se utilizaron distintas concentraciones de MgCl₂ para variar la astringencia de la reacción. Los carriles 1 y 2 corresponden a marcadores de bajo y alto peso molecular PhiX174/Hae III y λ/Hind III respectivamente. Como control en el tercer carril se utilizó la clona WNK3-18a que se encuentra clonada en el vector pGH19. (d) Secuencia de aminoácidos de los fragmentos amplificados.

Clonación de WNK3 en el vector de expresión en células de mamífero

La expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis* ha sido ampliamente utilizada para evaluar el efecto de WNK3 sobre la actividad de mecanismos de movilización iónica; sin embargo, no existe evidencia de su efecto en sistemas celulares más complejos, como es el caso de células de mamífero, ni sobre los procesos desencadenados por alteraciones en el volumen celular.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de WNK3 en los mecanismos de regulación del volumen en un modelo de células de HEK293, se subclonó el cDNA de WNK3 (WNK3-18a en pGH19) en el vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO. Para estos fines, se sustituyó el sitio de restricción EcoRI por KpnI mediante mutagénesis dirigida y el fragmento de interés se insertó en pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO entre los sitios 5'KpnI y 3'NotI del sitio de multiclación (Fig. VI.2). La mutante catalíticamente inactiva WNK3-DA se obtuvo mediante mutagénesis dirigida, sustituyendo el aspartato ubicado en la posición 294 por alanina. Las mutaciones y la correcta inserción de WNK3 en el vector, fueron corroboradas por secuenciación automatizada y análisis de restricción.

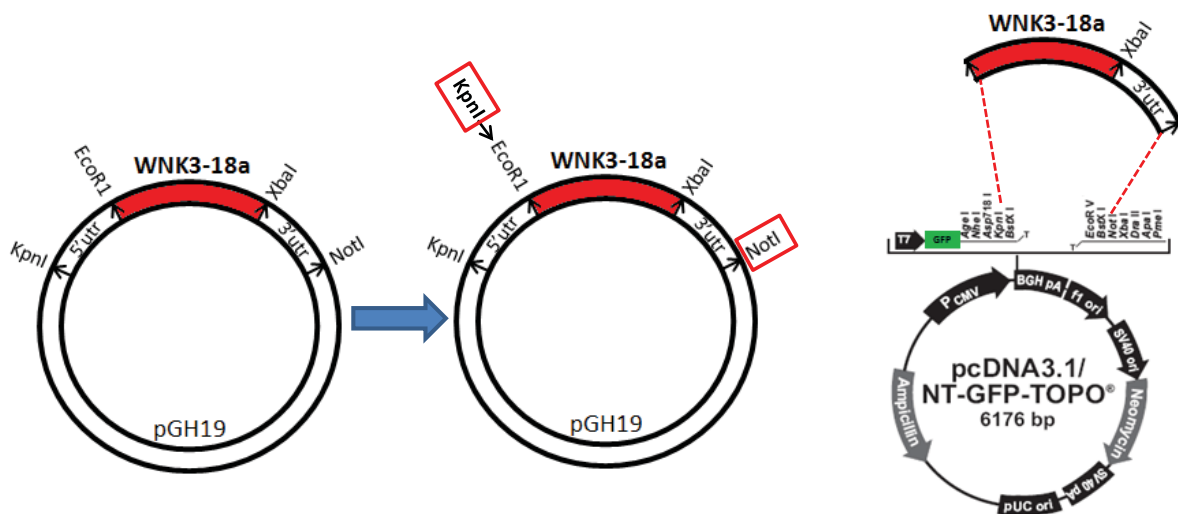


Fig. VI.2 Subclonación de WNK3 en pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO. El cDNA de WNK3 clonado en el vector pGH19 fue utilizado como molde para reemplazar el sitio de restricción EcoRI en el amino terminal por el sitio Kpn I mediante mutagénesis dirigida. El fragmento resultante, fue purificado del gel de agarosa y subclonado entre los sitios Kpn I y Not I de pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO.

Ya que alteraciones mínimas en la estructura proteica pueden generar impedimentos estéricos en su plegamiento y cambiar sustancialmente la funcionalidad de la molécula, se evaluó si la fusión de WNK3 a la GFP modifica los efectos previamente reportados de la cinasa. Para ello, se realizaron experimentos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus* tanto del RNAc de WNK3-GFP como del cotransportador NKCC1/2. La actividad de los cotransportadores fue medida como captura de ^{86}Rb sensible a bumetanida. Los resultados en la figura VI.3 muestran que WNK3-GFP mantiene su efecto modulador sobre la actividad de NKCC1/2, aumentando casi tres veces la actividad del NKCC1 y un 80% el funcionamiento de NKCC2. Por el contrario y de acuerdo a lo ya reportado, la variante sin actividad catalítica WNK3-DA reduce la actividad de ambos cotransportadores, incluso por debajo de la captura basal de $^{86}\text{Rb}^+$ debida a NKCC2.

Estas construcciones fueron utilizadas para generar las líneas celulares (HEK293) que expresan de manera estable a la cinasa WNK3 y su variante WNK3-DA. Es importante aclarar que la nomenclatura de la proteína WNK3 sin actividad catalítica varía de acuerdo a la literatura consultada, pudiendo encontrarla como WNK3D294A, WNK3-DA o bien WNK3-DA (Kinase Dead). Para fines prácticos a lo largo de este trabajo de tesis fue denominada WNK3-DA.

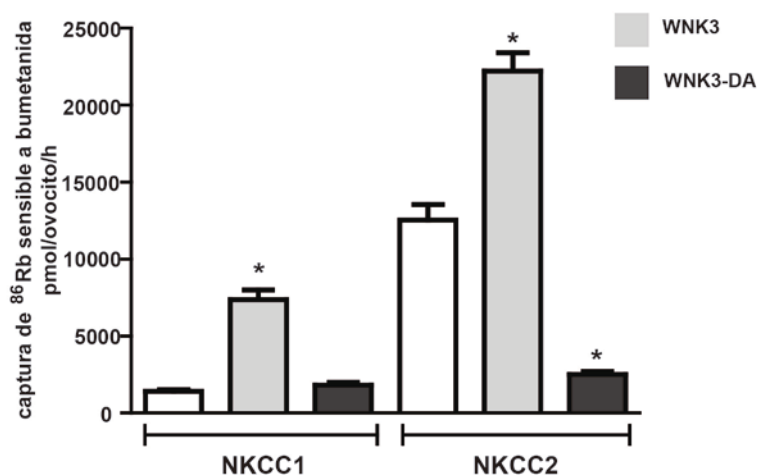


Fig VI. 3 Efecto de WNK3 fusionada a la GFP sobre la actividad de NKCC1/2. Se llevaron a cabo ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* de los cotransportadores NKCC1 y NKCC2 en presencia o ausencia de WNK3 y la mutante DA fusionadas a GFP. La actividad debida a los cotransportadores NKCCs fue obtenida por captura de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida siguiendo el protocolo descrito en la sección de Métodos. *Diferencias significativas a $P < 0.05$ con respecto al control que expresa únicamente el cotransportador.

Líneas establemente transfectadas WNK3+ y WNK3-DA

Las células HEK293 fueron transfectadas con el DNA de WNK3, con su variante catalíticamente inactiva o bien con el vector vacío. La sobreexpresión de WNK3 se corroboró a nivel de la proteína utilizando un anticuerpo que reconoce al epítipo localizado en el extremo carboxilo terminal de la cinasa. La figura VI.4 muestra una banda del peso molecular esperado (220 KDa aproximadamente) en las células WNK3+ y WNK3-DA, con una intensidad de señal mayor que la expresada en las células control. Esta banda migra a la misma distancia de la señal emitida utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína verde fluorescente y que se encuentra ausente tanto en las células HEK293 como en las células control (vector). Este resultado valida nuestro modelo de estudio demostrando el importante incremento en los niveles de expresión de la proteína WNK3 y de su variante sin actividad catalítica (DA) fusionadas a GFP. La proteína actina, fue utilizada como control de carga en estos experimentos de inmuno blot.

La expresión de la mutante catalíticamente inactiva indujo un cambio muy notable en la morfología celular. Mediante microscopía de campo claro utilizando iluminación DIC (del inglés Differential Interference Contrast) se pudo observar que las células son mucho más planas, y muestran extensiones pronunciadas tipo filopodio a diferencia de la morfología de huso típica tanto de las células sin transfectar como las células WNK3+ (Fig. VI.5).

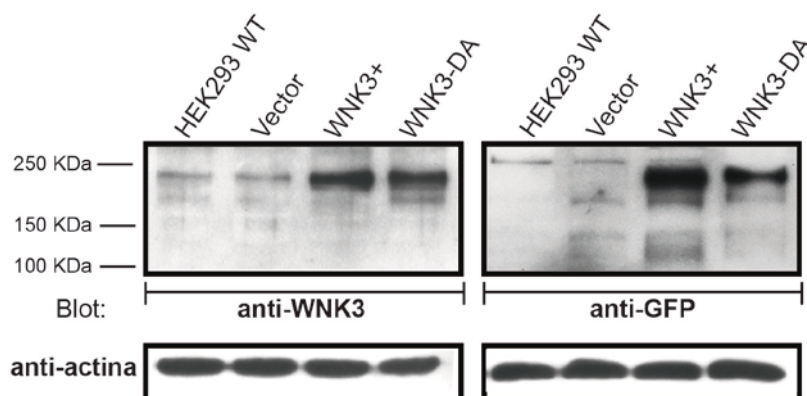


Fig. VI.4 Sobreexpresión de WNK3 a nivel de proteína. Western blot de extractos totales obtenidos de cada una de las líneas celulares HEK293 y transfectadas establemente con el vector vacío, WNK3 o WNK3-DA. Las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 7.5% y la proteína actina se utilizó como control de carga.

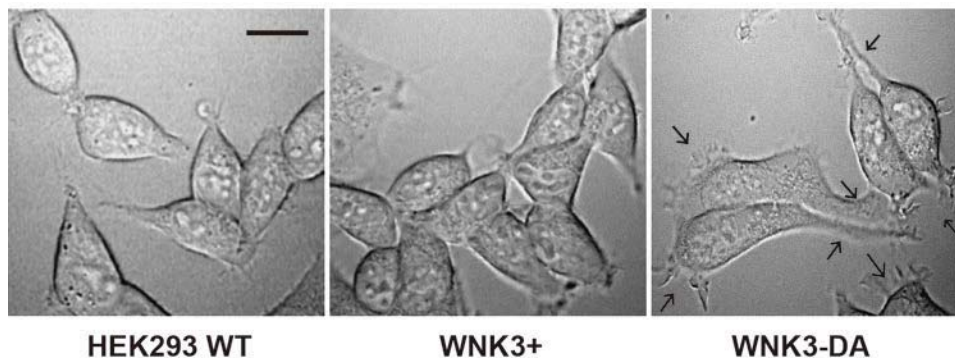


Fig. VI.5 Morfología de las líneas celulares. Microfotografías mediante iluminación DIC a una magnificación de 40X, comparando la morfología celular de líneas WNK3+ y WNK3-DA con respecto a la forma típica de las células HEK293. Las flechas en el panel de la derecha enfatizan la presencia de las extensiones tipo filopodio ausentes en los demás tipos celulares. Barra de escala= 10 μ m.

Localización subcelular y redistribución de WNK3 por estrés osmótico

Para identificar la localización subcelular de WNK3, así como del efecto de la pérdida de su actividad cinasa sobre esta ubicación, se examinó el patrón de distribución de la fluorescencia, a través de ensayos de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-WNK3. Mediante escaneo laser confocal se identificó la presencia de WNK3 en las uniones intercelulares con un patrón de localización en forma de puntos (*puncta*); estas estructuras colocalizaron de manera parcial con el marcaje de ocludina, un marcador característico de uniones estrechas (Fig. VI.6 panel superior). En las células WNK3-DA el patrón de localización difiere considerablemente del de las células con sobreexpresión de WNK3. En ellas se observó una señal fluorescente ubicada de manera puntual en la región cercana al núcleo, que colocaliza parcialmente con golgina-97, marcador de la cisterna trans de Golgi (Fig. VI.6 panel inferior). Es posible que estas diferencias en el patrón de distribución tengan una relación con los mecanismos de regulación del volumen celular, pero hasta el momento no es posible establecer una relación clara entre estos fenómenos.

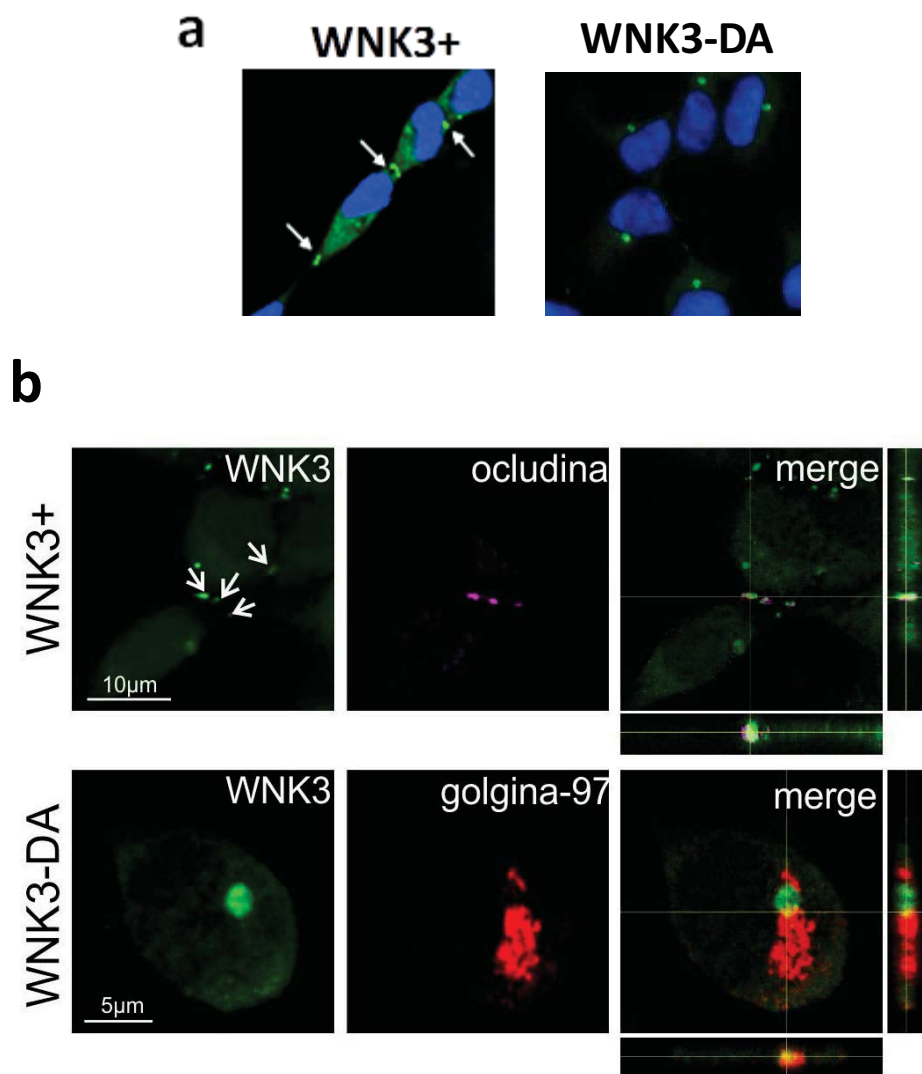


Fig. VI.6 Localización subcelular de WNK3 (a). Células WNK3+ y WNK3-DA inmunoteñidas con anti-WNK3 en verde y DAPI como marcador de núcleos en azul. **(b)** Colocalización de la señal de WNK3 con marcadores de uniones estrechas (anti-occludina en magenta como pseudocolor) en el caso de las células WNK3+ y de la región *trans* de Golgi (anti golgina-97 en rojo) en las células WNK3-DA. Los planos ortogonales se muestran para la imagen del solapamiento (merge), plano xy debajo y plano yz derecha. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía confocal.

Adicionalmente, con el objetivo de estudiar el efecto de alteraciones anisotónicas sobre la localización subcelular de WNK3, las células se sometieron a un estrés hipotónico 15%, obtenido mediante la reducción en la concentración de NaCl, o bien a un incremento en la tonicidad extracelular hasta 600 mOsm por adición de sorbitol a la solución isotónica. Ambos estímulos generaron cambios importantes en la localización de WNK3 y WNK3-DA. Los

resultados se muestran en la figura VI.7 y son expresados como cambio en el número de *puncta* por célula bajo las diferentes condiciones osmóticas. Estos datos muestran la reducción de WNK3 de las uniones intercelulares frente al estrés hipo e hipertónico, incrementando la señal fluorescente en el citosol. En el caso de la mutante WNK3-DA, se observó una clara reducción de la señal en Golgi, moviéndose hacia las uniones intercelulares (Fig VI.7).

Las diferencias en la localización de WNK3 con y sin actividad catalítica, así como la dinámica de distribución ante estrés osmótico, podrían ser indicativo de su relación con los cambios celulares desencadenados ante alteraciones en el volumen.

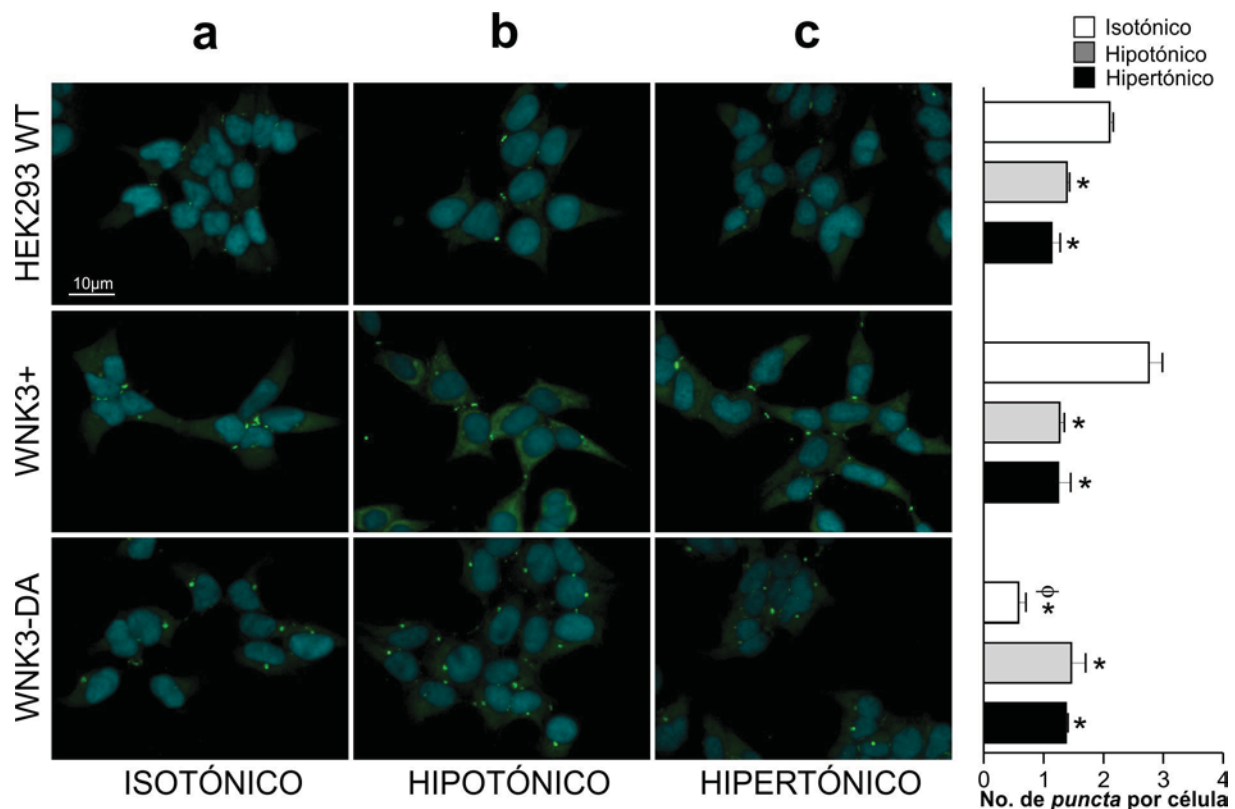


Fig. VI.7 Relocalización de WNK3 y WNK3-DA por estrés osmótico. Las células fueron sometidas al cambio en la osmolaridad (H15%, 298 mOsm o hipertónico 600 mOsm) durante 3 min y fijadas con paraformaldehído 4% para su posterior procesamiento con el anticuerpo específico anti-WNK3. Las barras representan el número de *puncta* por célula bajo las diferentes condiciones osmóticas a partir del procesamiento de tres imágenes de cada condición en tres experimentos independientes. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía confocal.*Diferencias significativas de la condición isotónica en cada línea celular a $P < 0.05$. Φ Significativamente diferente de las células HEK293 en isotónico a $P < 0.05$.

WNK3 y el decremento regulador del volumen celular

Las características del hinchamiento y el consecuente proceso de DRV en las células WNK3+ y WNK3-DA se examinaron con la finalidad de comparar el comportamiento celular en respuesta a una condición hipotónica 15%. En todas las líneas celulares (HEK293, Vector, WNK3+ y WNK3-DA), el hinchamiento máximo ocurrió dentro de los primeros segundos después del estímulo hipotónico, en un rango de 10-20 s, sin encontrarse diferencias significativas en la magnitud del hinchamiento entre los grupos experimentales, cuyos valores se encuentran entre $11.5 \pm 0.9\%$ y $13.8 \pm 1.1\%$. Este proceso de acumulación de agua es seguido del mecanismo de regulación activa del volumen (DRV), cuya eficiencia final fue calculada como porcentaje de recuperación del volumen con respecto al hinchamiento máximo.

Las curvas del cambio en volumen en las células HEK293 y las células V utilizadas como control a lo largo de los experimentos subsecuentes, fueron esencialmente idénticas, mostrando una recuperación del volumen de $79.2 \pm 4\%$. La recuperación del volumen no se vio afectada significativamente por la sobreexpresión de WNK3 ($68.8 \pm 4.1\%$); por el contrario se observó un incremento del 30.1% en la eficiencia del DRV de las células que expresan a la mutante WNK3-DA (Fig. VI.8).

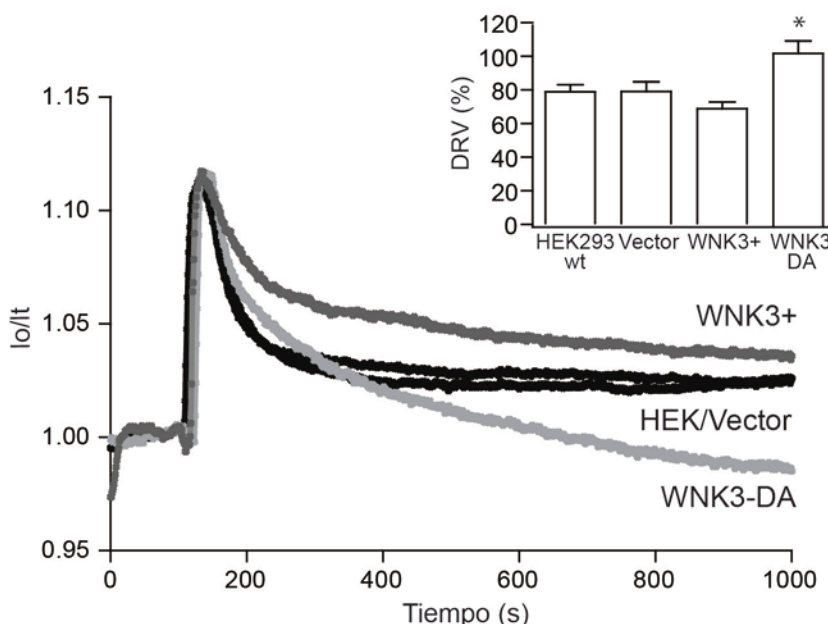


Fig VI.8. Efecto de WNK3 sobre el proceso de DRV Los cambios en el volumen fueron medidos mediante el sistema de dispersión del haz de luz tal como se describe en la sección de Métodos. En la gráfica se muestran trazos representativos de los cambios en el volumen producidos por la exposición de las células a un estímulo H15%. Las barras representan el porcentaje del DRV al final del experimento con respecto al hinchamiento máximo. Los resultados son expresados de acuerdo a la ecuación I_0/I_t , en donde I_0 es el promedio de la señal de emisión en condiciones basales (promedio de los primeros 100 s) y la señal de emisión al tiempo t está representada por I_t . *Significativamente diferente de las células control a $P < 0.05$.

Analizando la cinética de regulación del volumen, la curva del DRV en las células control (V) se ajustó a un modelo de decaimiento monoexponencial, sin que se encontraran diferencias significativas entre los valores de la constante de tiempo (τ) y la amplitud con respecto a las células HEK293 sin transfectar (48.3 ± 5.6 y 50.9 ± 3.7 s respectivamente). Sin embargo, esta cinética mostró diferencias importantes ante la sobreexpresión de WNK3 o de la mutante WNK3-DA. A diferencia del comportamiento en las células control, el modelo de decaimiento biexponencial explica mejor el comportamiento del DRV en estos dos tipos celulares, a partir del cual se identificaron dos fases claramente diferenciadas, cuyos parámetros se muestran en la tabla VI.I. El valor de τ para la fase rápida fue mayor en las células WNK3 (53.9 ± 3.9 s) que en aquellas que expresan a la mutante WNK3-DA (25.7 ± 4.8 s); mientras que en la fase lenta no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos celulares.

Tabla VI.I Parámetros del comportamiento exponencial del DRV.

	τ (s)	Amplitud (I _o /I _t)
HEK293	48.3 ± 5.6	0.0219 ± 0.003
Vector	50.9 ± 3.7	0.0221 ± 0.002

	Fase	τ (s)	Contribución (%)
WNK3	rápida	53.9 ± 3.9	66.3 ± 6.9
	lenta	418 ± 43	33.7 ± 0.9
WNK3-DA	rápida	25.7 ± 4.8	40.9 ± 5.2
	lenta	475 ± 42.2	59 ± 5.2

Estas diferencias en la eficiencia de la recuperación del volumen por la sobreexpresión de WNK3 o de WNK3-DA, pueden ser atribuidas a un efecto sobre los mecanismos efectores del DRV. En prácticamente todos los tipos celulares, la regulación del volumen se lleva a cabo mediante la activación de vías que permiten la liberación de osmolitos presentes en altas concentraciones intracelulares. Los iones K^+ y Cl^- , así como compuestos orgánicos de bajo peso molecular, particularmente la taurina, son los más relevantes para el proceso de recuperación del volumen. Su contribución al DRV dependerá tanto del tipo celular como de la magnitud del estímulo hipotónico. En este estudio se examinó la movilización osmosensible de taurina así

como la actividad de los cotransportadores electroneutros KCCs y del canal de Cl^- activado por volumen frente a una reducción en la osmolaridad extracelular en las distintas líneas celulares.

Efecto de WNK3 en la vía de liberación de osmolitos orgánicos

Tomando a la taurina como representativo de los osmolitos orgánicos que se movilizan ante el estrés hipotónico, se realizaron ensayos utilizando ^3H -taurina como trazador en las células HEK293 y se sometieron a distintas magnitudes de estímulo hipotónico (15, 20, 30 y 40%). El curso temporal de la movilización osmosensible de taurina, muestra una rápida liberación, directamente dependiente de la magnitud del estrés osmótico. El porcentaje de liberación en condiciones basales (isotónico) durante 5 min fue de $1.24 \pm 0.08\%$, este valor se incrementa notablemente cuando las células se exponen a una reducción del 30, 35 y 40% en la osmolaridad extracelular (2.53 ± 0.14 , 4.88 ± 0.36 y $7.06 \pm 0.7\%$ respectivamente); sin embargo, no se observó liberación hipotónica de taurina cuando la magnitud en la reducción del estrés osmótico fue del 15% (1.28 ± 0.11), condición en la cual se evaluó el proceso del DRV (Fig. VI.9a).

Una de las características de la vía de liberación osmótica de taurina es su modulación por la actividad de distintas proteínas cinasas, de tal forma que es importante evaluar el efecto de la sobre-expresión de WNK3 y la variante sin actividad catalítica sobre la liberación de taurina. Como se muestra en la figura VI.9b, utilizando un estímulo hipotónico 40% en las células control (V), se activa rápidamente la salida de taurina, aumentando de manera progresiva hasta alcanzar el pico máximo al minuto 3 con un $12.5 \pm 1.6\%$ de liberación total, inactivándose posteriormente hasta alcanzar valores muy cercanos a la liberación basal 8 minutos después de haberse presentado el estímulo hipotónico. Esta cinética de eflujo de taurina, se comparó con la de liberación en las células WNK3+ y WNK3-DA. En las células WNK3+ el total de taurina liberada durante los primeros 5 min posteriores al estímulo es de $11.8 \pm 1.5\%$ con una cinética de liberación prácticamente idéntica a la de las células control. Por el contrario, en las células WNK3-DA, a pesar de que el curso de liberación de taurina es muy similar alcanzando el pico máximo al minuto 3, la magnitud de la liberación es notablemente

menor, con un valor de $7.5 \pm 1.2\%$, lo cual implica una reducción del 40% en la liberación hipotónica de taurina, siendo un dato importante a considerar en posteriores investigaciones.

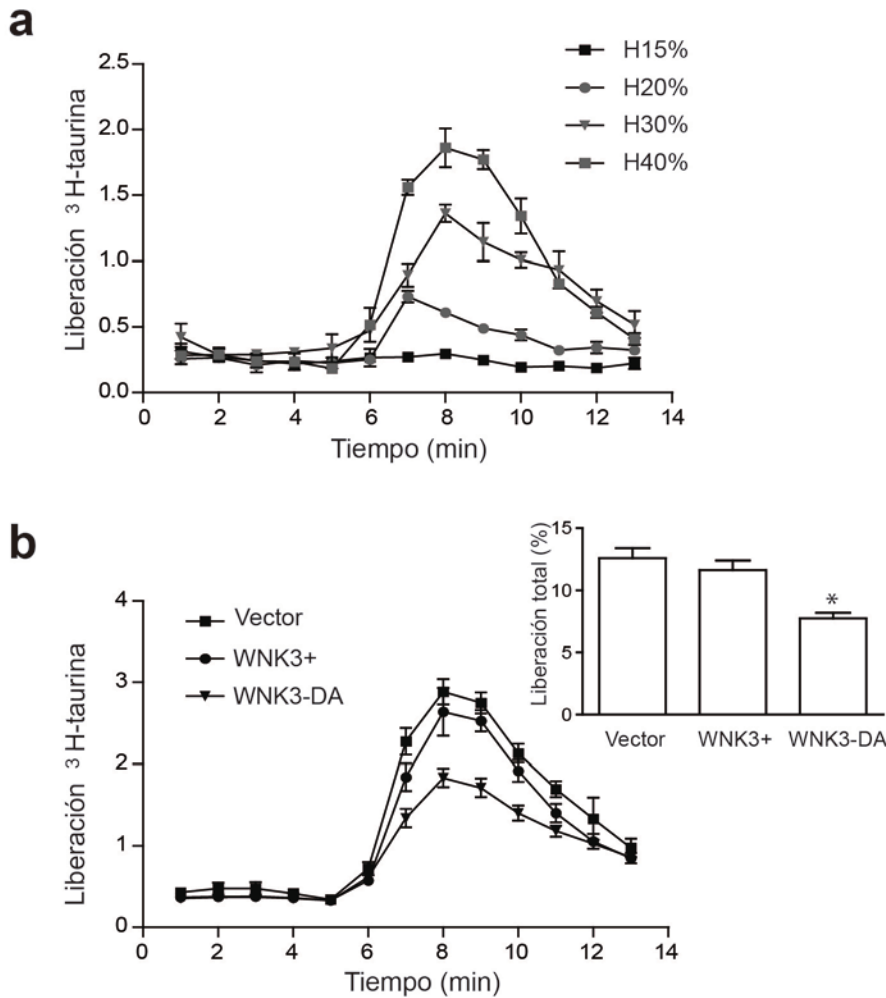


Fig.VI.9 Liberación osmosensible de ³H-aurina (a) Sensibilidad hipotónica de la vía de liberación de taurina en las células HEK293. Se muestran cuatro diferentes reducciones en la tonicidad de los medios extracelulares: Hipotónico (H) 15, 30, 35 y 40%. La reducción en la osmolaridad fue obtenida mediante la disminución en la concentración de NaCl. **(b)** Efecto de la sobreexpresión de WNK3 y la mutante DA sobre la vía de liberación de taurina ante una reducción del 40% en la osmolaridad. *Significativamente diferente $P < 0.05$ con respecto al control (V).

Modulación de los niveles intracelulares de Cl^- por WNK3

El hecho de que el estímulo H15% no induzca la apertura de la vía de liberación osmosensible de taurina, sugiere que el proceso de DRV se lleva a cabo principalmente a través de la liberación de osmolitos de naturaleza inorgánica. Es de particular interés el caso del Cl^- ya que en los últimos años se ha especulado acerca del papel de WNK3 como moduladora de la $[Cl^-]_i$ por sus efectos sobre los cotransportadores electroneutros de Cl^- /catión. Este efecto, sin embargo no ha sido evaluado de manera directa. En este proyecto de investigación se hicieron este tipo de medidas evaluando las concentraciones basales de Cl^-_i en las distintas líneas celulares.

La $[Cl^-]_i$, se cuantificó mediante registros ópticos con una resolución de célula única utilizando el indicador de Cl^- fluorescente MEQ, tal como se describe en la sección de Métodos. La $[Cl^-]_i$ fue medida indirectamente como un cambio en la fluorescencia del compuesto MEQ considerándola una relación inversamente proporcional a los niveles intracelulares de Cl^- . A partir de la curva de calibración se obtuvo el valor de la constante de Stern-Volmer que fue utilizada para determinar la concentración de Cl^- en cada caso. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de Cl^- entre las células WNK3+ y WNK3-DA con respecto al control, siendo los valores obtenidos (en mM), 34.2 ± 1.8 , 41.6 ± 2.4 y 26.4 ± 1.4 para las células V, WNK3+ y WNK3-DA respectivamente (Fig. VI.10). Estos datos darían consistencia a los resultados reportados en ovocitos de *Xenopus* sobre la actividad de los cotransportadores electroneutros, en donde WNK3 inactiva a los KCCs y sobreactiva a los NKCCs incrementando teóricamente la $[Cl^-]_i$, mientras que WNK3-DA sobreactiva a los KCCs e inactiva a los NKCCs produciendo una reducción en los niveles intracelulares de Cl^- (de los Heros et al. 2005).

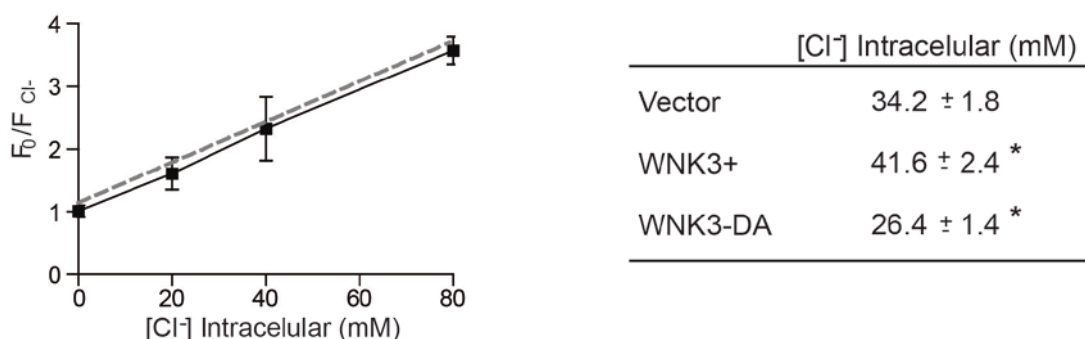


Fig VI.10 Concentración intracelular de Cl^- en las distintas líneas celulares. Las células fueron cargadas con diH-MEQ (25 μ M) por 10 min, una vez que se internaliza, el compuesto es reducido hasta el sensor fluorescente de Cl^- -MEQ. Se contruyó la curva de calibración a partir de la cual se calculó la constante de Stern-Volmer con un valor de $32.2 M^{-1}$ (regresión lineal indicada como línea punteada con una $r^2=0.99$). Los datos de la fluorescencia de célula única fueron obtenidos mediante microscopía de epifluorescencia registrando los cambios en la señal a 440 nm. *Significativamente diferente $P < 0.05$ con respecto al control (V).

Los niveles de Cl^-_i se modificaron ante un estrés osmótico. Una condición hipotónica generó una reducción rápida y pronunciada en la concentración de Cl^-_i dentro de los primeros 4 min que es atribuida a la dilución del medio por la entrada de agua durante el hinchamiento, a

esta fase siguió otra de reducción gradual y sostenida del Cl^- que ocurre en paralelo a la regulación del volumen celular. La reducción de cloruro en esta segunda fase, se vio modificada por la sobreexpresión de WNK3 y la mutante WNK3-DA. Los datos en la Fig. VI.11 muestran una reducción de $19.8 \pm 0.8\%$, una menor disminución en las células que sobre-expresan la cinasa WNK3: $12.1 \pm 1.6 \%$, mientras que el porcentaje de reducción en presencia de la mutante DA sin actividad catalítica fue más pronunciado, $23.9 \pm 1\%$ (Fig. VI.11).

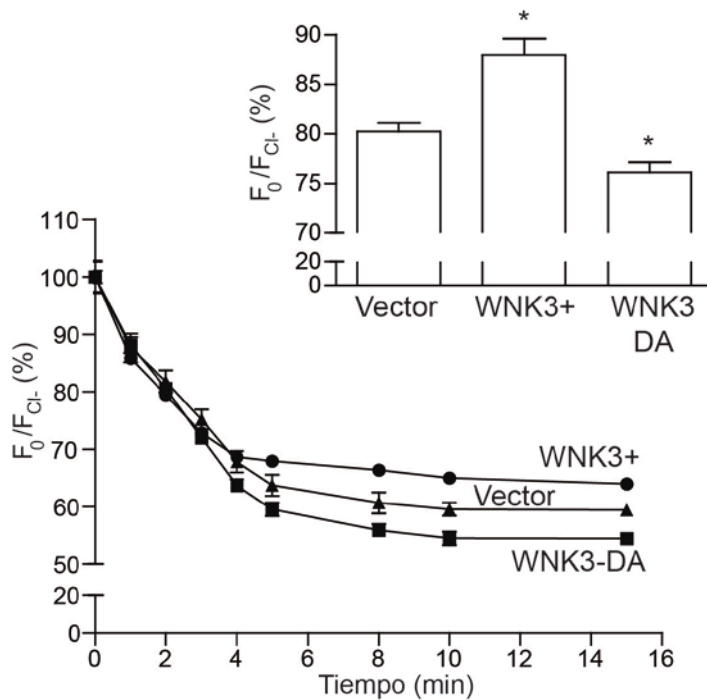


Fig.VI.11 Reducción relativa de la $[Cl^-]_i$ inducida por el estímulo H15%. La gráfica corresponde al curso temporal de los cambios en la $[Cl^-]_i$ durante el DRV en las células control (V), WNK3+ y WNK3-DA. Los resultados se muestran como porcentaje de reducción de la fluorescencia con respecto a la condición isotónica en cada tipo celular. Las barras representan el porcentaje de decaimiento de la $[Cl^-]_i$ en el rango de 4-15min y corresponden a la media \pm EE de 3 experimentos independientes. *Significativamente diferente de las células V a $P < 0.05$.

El siguiente aspecto interesante de evaluar que derivó de estos resultados, fue el investigar cuál de los mecanismos de movilización de Cl^- estaba siendo afectado y era el responsable de las diferencias observadas en la $[Cl^-]_i$ de los distintos tipos celulares. Durante hipotonicidad, el Cl^- puede estarse moviendo hacia el exterior celular principalmente mediante dos mecanismos, el canal de Cl^- activado por volumen, o bien a través de los cotransportadores electroneutros KCCs.

Registros electrofisiológicos utilizando la técnica de patch clamp en su conformación de célula completa permitieron el estudio de la corriente de Cl^-_{vol} y del efecto de la cinasa WNK3 sobre este parámetro. Se utilizó un protocolo de pulsos de voltaje desde -100 a +100 mV en incrementos de 20 mV como se especifica en los Métodos. La corriente obtenida en cada célula fue normalizada con respecto a su capacitancia cuyos valores en pF fueron: Vector 17 ± 2.3 , WNK3+ 18.4 ± 2.1 y WNK3-DA 18.9 ± 4 . Frente a la reducción del 15% en la osmolaridad extracelular, en los tres tipos celulares evaluados se produce una corriente de Cl^- de rectificación saliente, con una cinética de inactivación a potenciales positivos y un potencial de inversión de -3 mV, muy cercano al potencial de equilibrio del Cl^- predicho para nuestras soluciones (0 mV). La figura VI.12 muestra que la densidad de corriente obtenida a +100 mV en los tres grupos experimentales no presenta diferencias significativas entre las células modificadas, siendo 271 ± 41.6 , 268.7 ± 23.4 y 242.8 ± 8.6 pA/pF para las células V, WNK3+ y WNK3-DA respectivamente (Fig. VI.12).

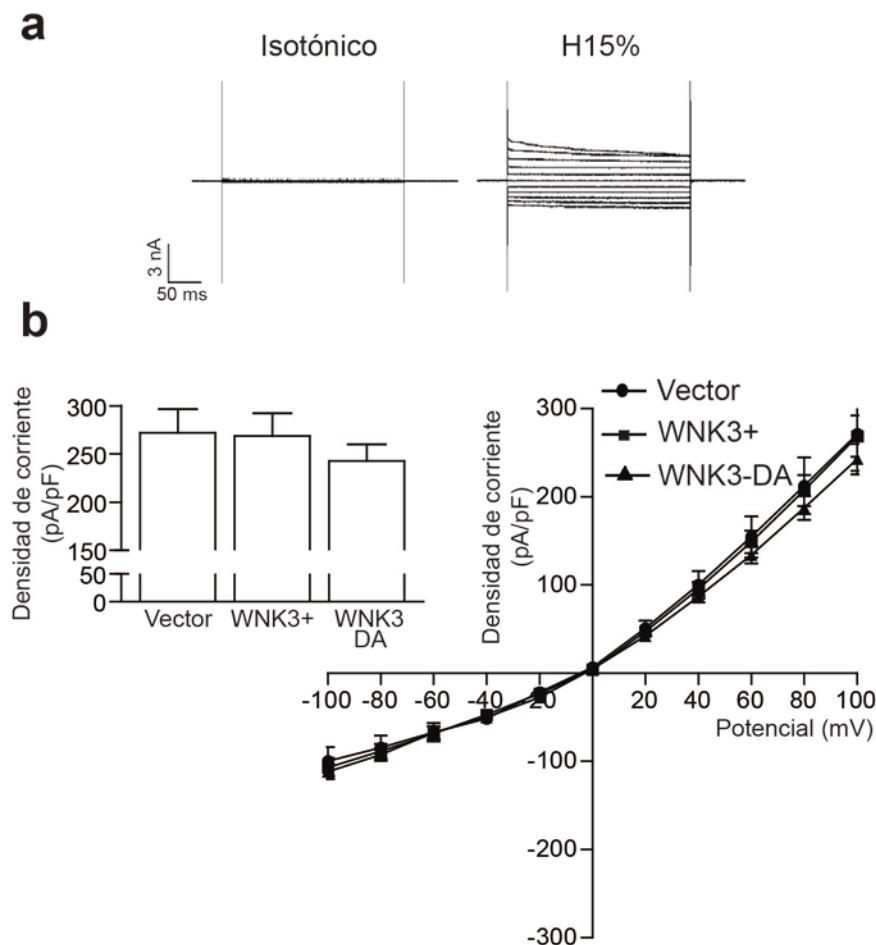


Fig. VI.12 Corriente de Cl^- activada por hipotonicidad. El potencial fue fijado a 0 mV y las corrientes se produjeron por la aplicación de pulsos de voltaje desde -100 a +100 mV en incrementos de 20 mV durante 300 ms. **(a)** trazos representativos de la corriente inducida bajo el protocolo descrito después de 10 minutos de estabilización en la solución indicada. **(b)** Curva densidad de corriente (pA/pF) vs Voltaje (mV) en las células V, WNK3+ y WNK3-DA. Las barras representan la densidad de corriente en cada tipo celular a +100 mV. Los resultados son expresados como media \pm EE de 7-15 experimentos.

Para estudiar el efecto de la cinasa WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores KCCs se realizaron experimentos de captura de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de la presencia de Cl^- y en medio libre de Na^+ para evitar la captura vía el NKCC. En condiciones basales (isotónico) la captura de $^{86}\text{Rb}^+$ en las células control (V) fue de 8.8 ± 1.4 pmol/(μg de proteína x min) incrementándose hasta 24.7 ± 6.4 pmol/(μg de proteína x min) por efecto del estrés hipotónico. En las células WNK3+ la actividad del cotransportador fue prácticamente abolida, estando incluso por debajo del funcionamiento basal de los KCCs. Por el contrario, la expresión de la variante sin actividad catalítica WNK3-DA, incrementa notablemente su funcionamiento siendo casi 5 veces mayor que en las células V desde la condición isotónica con 53.2 ± 11.7 pmol/(μg de proteína x min), resaltando que el estímulo H15% no produce un incremento adicional al obtenido en isotónico por la WNK3-DA (Fig.VI.13).

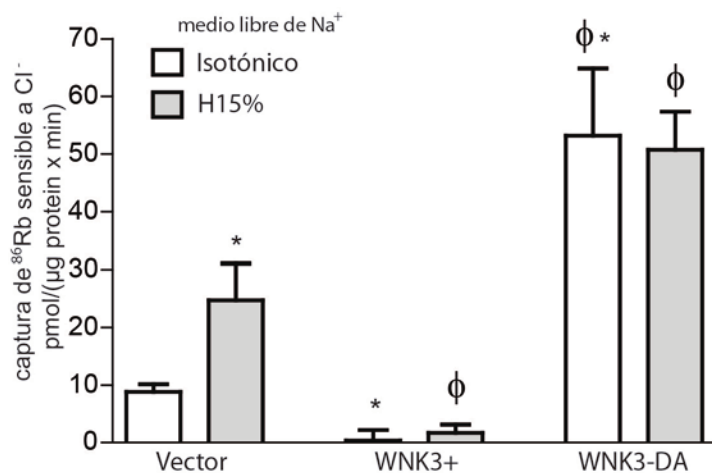


Fig. VI.13 Efecto de la sobreexpresión de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores KCCs. La captura de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a Cl^- fue medida en las células WNK3+ y WNK3-DA, comparándola con la obtenida en las células control V en condiciones isotónicas (barras blancas) o durante hipotonicidad (barras grises). Las barras representan los resultados de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control V en isotonicidad a $P < 0.05$. ϕ Significativamente diferente de las células control en H15% a $P < 0.05$.

Los resultados mostrados hasta este punto demuestran tres aspectos importantes: i) el estrés hipotónico induce un cambio importante en la distribución subcelular de WNK3 y WNK3-DA, ii) la sobreexpresión de WNK3 aumenta la concentración de Cl^- intracelular y modifica la cinética del DRV al inhibir la actividad de los KCCs y iii) Un efecto opuesto se observó por la carencia de la actividad cinasa de la proteína, con una mayor reducción en el Cl^- intracelular y una mayor eficiencia en el DRV, todo ello como resultado de la sobreactivación de los KCCs.

Con el propósito de examinar la contribución de cada una de las vías de liberación de Cl^- (canal de Cl^-_{vol} o KCCs) al proceso del DRV, se intentó un abordaje farmacológico usando como inhibidores el DCPIB para los canales y el DIOA para los KCCs; sin embargo, nuestros resultados en las células HEK293 indican que este compuesto tiene también un efecto inhibitor muy potente sobre las corrientes de Cl^- activadas por volumen, reduciendo $75 \pm 7.9\%$, incluso a bajas concentraciones ($20 \mu\text{M}$). A su vez, el DCPIB anteriormente descrito como bloqueador selectivo de la $\text{ICl}^-_{\text{vol}}$, reduce $43.4 \pm 0.3\%$ la actividad hipotónica de los KCCs, a las concentraciones en las que ejerce sus acciones sobre las corrientes de Cl^- . El efecto de ambos fármacos fue evaluado sobre el proceso de DRV en las células HEK293, observando claras diferencias sobre todo en los primeros minutos de la regulación del volumen. Una concentración de $20 \mu\text{M}$ de DIOA redujo $25.4 \pm 3.9\%$ el DRV, mientras que el DCPIB $10 \mu\text{M}$ disminuye la eficiencia del proceso $34.4 \pm 6.4\%$; el efecto de estos fármacos fue aditivo (Fig. VI.14).

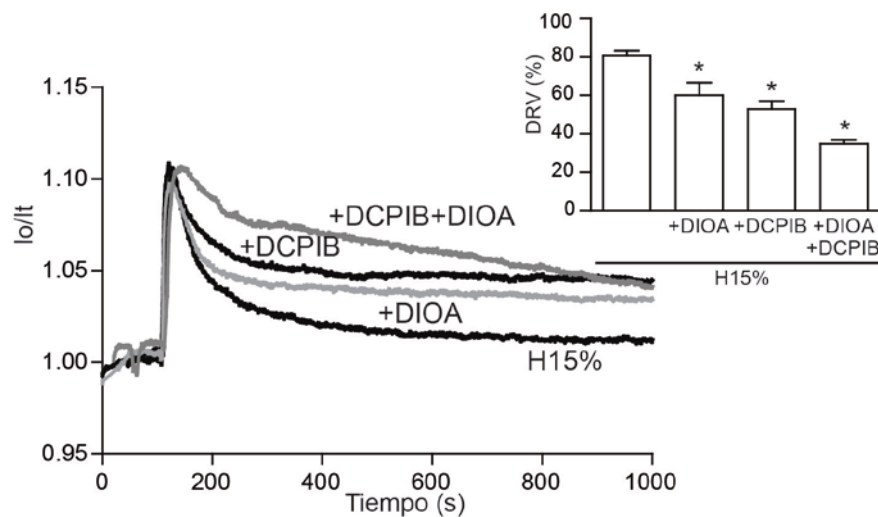


Fig. VI.14 Efecto del DCPIB y el DIOA sobre el DRV. Las células fueron preincubadas con los fármacos 30 min antes del registro y se mantuvieron presentes durante el experimento. Las barras corresponden al porcentaje del DRV al final de la fase rápida. *Significativamente diferente del control en H15% a $P < 0.05$.

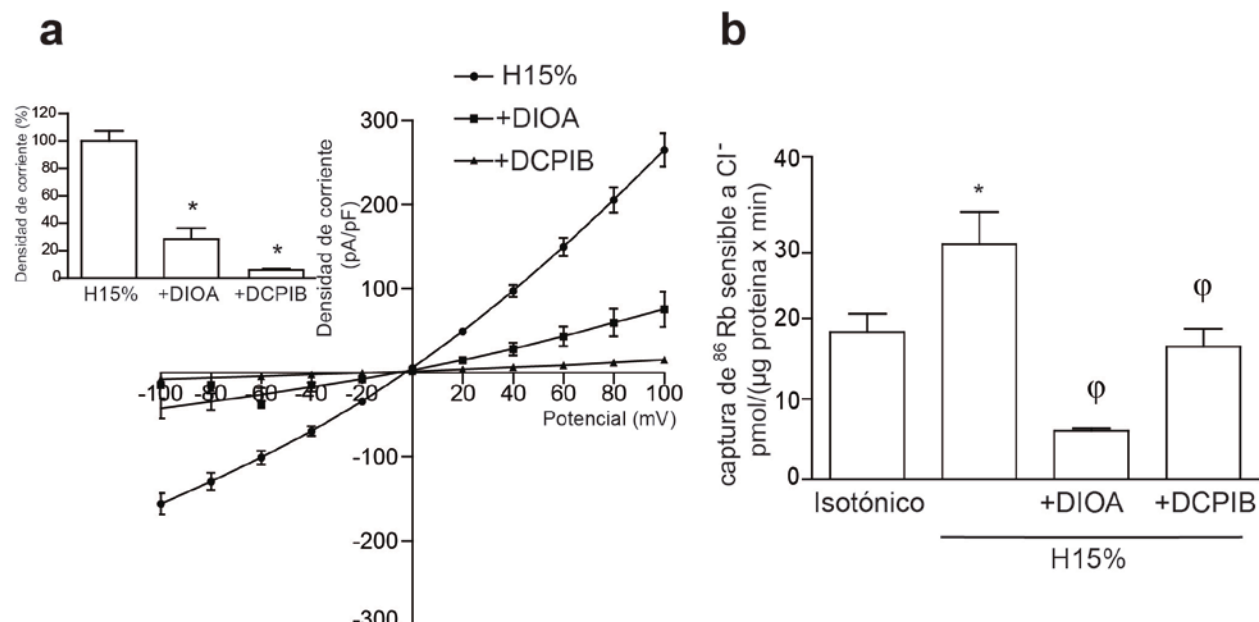


Fig. VI.15 Efecto del DCPIB y DIOA sobre la Cl^-_{vol} y la actividad de los cotransportadores electroneutros KCCs en células HEK293 expuestas a H15%. (a) curva I-V en presencia de los inhibidores que fueron agregados a la solución extracelular en perfusión en el momento de máxima amplitud de la corriente alcanzada en cada tipo celular. Las barras representan el porcentaje de reducción de la densidad de corriente a +100 mV. * Diferencias significativas con respecto al control en H15% a $P < 0.05$. **(b)** Efecto inhibitor del DCPIB y DIOA sobre la actividad hipotónica de los KCCs. Las células fueron preincubadas 30 min antes de llevar a cabo la captura de $^{86}Rb^+$ y permanecieron presentes en las soluciones a lo largo del experimento. *Significativamente diferente con respecto al control en isotonicidad a $P < 0.05$; ϕ Significativamente diferente de la condición H15% a $P < 0.05$.

WNK3 y el incremento regulador del volumen celular

La siguiente fase en la investigación estuvo encaminada a evaluar el efecto de la WNK3 en el proceso de recuperación del volumen cuando las células se exponen a un estrés hipertónico. Se usaron las mismas herramientas que en la condición hipotónica, es decir, la sobreexpresión de WNK3 (WNK3+) y la expresión de la cinasa sin actividad catalítica (WNK3-DA). El medio hipertónico se preparó por adición de sorbitol hasta alcanzar una osmolaridad final de 600 mOsm. Este estímulo induce una importante reducción del volumen celular ($32.4 \pm 1.3\%$), seguida del proceso activo de recuperación de volumen denominado IRV. El porcentaje de regulación final del volumen fue de $48.3 \pm 2.4\%$ en las células control, sin modificarse significativamente en las células WNK3-DA ($50.8 \pm 4.6\%$). En las células que sobreexpresan a WNK3, en cambio, se observó un aumento del $30 \pm 3.8\%$ en la eficiencia del IRV; este efecto fue

prevenido en presencia de la bumetanida 10 μ M, inhibidor del cotransportador NKCC (Fig. VI. 16).

Las curvas de regulación del volumen en las células control y WNK3+ se ajustaron a un modelo de crecimiento monoexponencial, en donde el valor de τ es mayor en las células WNK3+ (212.6 \pm 9.9 s) que en las células control (149.56 \pm 19.3 s). Un incremento en la amplitud de la curva del IRV en las células WNK3+ correlaciona con el aumento en la eficiencia final de regulación arriba mencionado. En el caso de las células WNK3-DA, el curso temporal de regulación del volumen se ajusta mejor a una ecuación biexponencial, cuyos parámetros se especifican en la tabla II; en estas células la recuperación del volumen es significativamente mayor (26.2 \pm 3.6%) en la primera etapa de la regulación del volumen. Este comportamiento, fue revertido por efecto de la bumetanida, sugiriendo la participación del cotransportador NKCC al proceso.

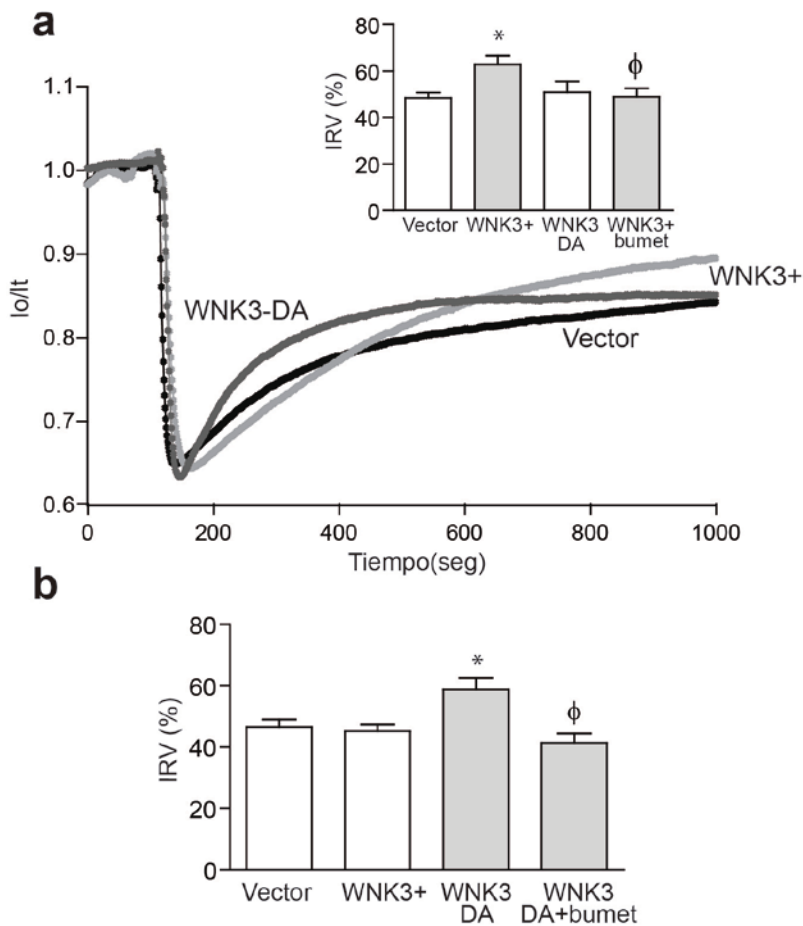


Fig. VI 16 Curso temporal de los cambios en el volumen celular inducidos por hipertonicidad en las células HEK293 y las líneas establemente transfectadas. **(a)** En la gráfica se muestran trazos representativos de los cambios en el volumen producidos por la exposición de las células a un estímulo hipertónico de 600 mOsm. Las barras representan el porcentaje del IRV al final del experimento (inserto en **a**) con respecto al hinchamiento máximo y el efecto de la bumetanida como inhibidor del cotransportador NKCC. En **b** el porcentaje de regulación en los primeros minutos del proceso de IRV. *Significativamente diferente de las células control a $P < 0.05$. ϕ Significativamente diferente de la condición en ausencia de bumetanida a $P < 0.05$.

El estudio de la actividad del NKCC en los distintos tipos celulares se llevó a cabo mediante la medición de la captura de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida $10\ \mu\text{M}$. La actividad del cotransportador se evaluó al tiempo final del experimento de IRV (15 min) y después de los primeros minutos del proceso de regulación en los que se observaron diferencias en la cinética por la expresión de WNK3-DA (3 min). En la figura VI.17 se observa que la actividad del NKCC no se incrementa por estrés hipertónico en ninguno de los dos tiempos evaluados; sin embargo, al minuto 3 (Fig. VI.17a), la captura de $^{86}\text{Rb}^+$ en las células WNK3-DA aumentó casi al doble y de manera independiente de la condición osmótica. Al tiempo final de la regulación, la actividad del cotransportador tanto en las células WNK3+ como en las mutantes WNK3-DA es mayor, 37.5 ± 3.6 y $63 \pm 1.4\%$ respectivamente, con respecto a las células control. Una vez más, este efecto es independiente de la osmolaridad de la solución experimental (Fig. VI.17b).

Tabla VI.II Fases del proceso de IRV, análisis exponencial

	τ (s)	Amplitud (Io/I _t)
Vector	149.56 ± 19.3	0.2944 ± 0.0195
WNK3	212.6 ± 9.89	0.3676 ± 0.0136

	Fase	τ (s)	Contribución (%)
WNK3-DA	rápida	66.9 ± 8.1	57.6 ± 3.6
	lenta	121.3 ± 7.85	42.4 ± 3.6

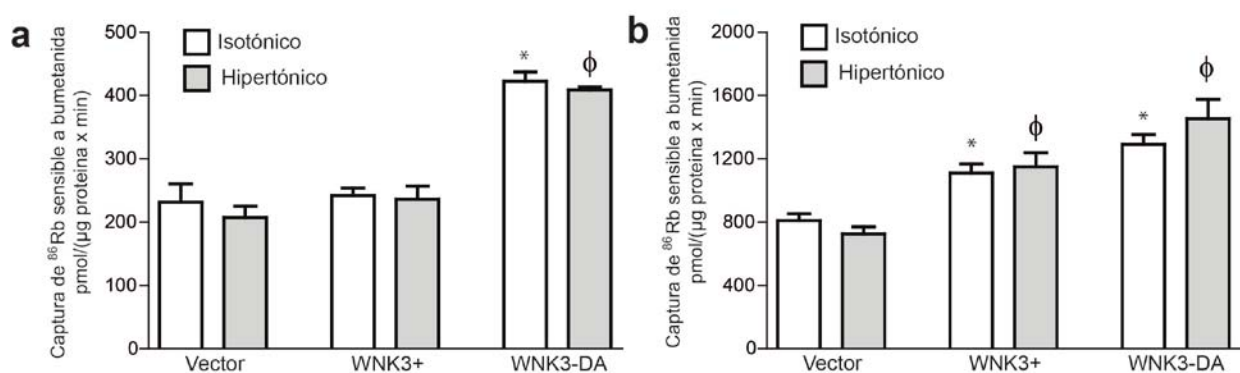


Fig. VI.17 Actividad del NKCC en células WNK3+ y WNK3-DA. La captura de $^{86}\text{Rb}^+$ fue llevada a cabo tal como se especifica en la sección de métodos al minuto 3 (**a**) y al minuto 15 (**b**) tanto en condiciones isotónicas como hipertónicas. * Significativamente diferente del control en isotonicidad a $P < 0.05$; φ Significativamente diferente de las células control durante hipertonicidad a $P < 0.05$.

Los resultados correspondientes a esta sección experimental arrojan datos interesantes: i) El cotransportador NKCC no participa de manera activa en el proceso de IRV en las células HEK293 y ii) en las células WNK3+ y WNK3-DA se observa un incremento en la actividad del cotransportador NKCC, desde la condición isotónica, que no se sobrepasa en condiciones hipertónicas. Por esta razón se afectan distintas etapas de la regulación del volumen celular.

VI.2 SECCIÓN II

Efecto de las variantes de WNK3 sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a Cl⁻

La mayoría de los estudios que evalúan la participación de WNK3 sobre la actividad de diversas vías de transporte iónico, incluidos los resultados presentados anteriormente, se llevaron a cabo utilizando la isoforma de WNK3 denominada 18a; sin embargo, mediante el análisis genómico de WNK3 se han detectado dos sitios de empalme alternativo que dan lugar a cuatro isoformas: WNK3 18a, WNK3 18b, WNK3 18a+22 y WNK3 18b+22.

Glover y colaboradores en el 2009, mostraron datos interesantes acerca de la isoforma WNK3-18b y su efecto sobre la actividad del cotransportador renal NCC. De acuerdo a este reporte, WNK3 18b+22 tiene un comportamiento totalmente opuesto al de la isoforma 18a, ejerciendo un efecto análogo al de la mutante WNK3-DA (18a), esto es, inhibe al cotransportador NCC mientras que la variante que carece de actividad catalítica lo sobreactiva. Sin embargo, de acuerdo a su patrón de distribución, NCC y WNK3 18b son entidades moleculares que no colocalizan tisularmente. En esta sección se presentan los resultados de un estudio del efecto de las isoformas de WNK3 sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a Cl⁻, con particular interés en aquellos que se localizan en el mismo tejido.

El que se lleve a cabo este tipo de estudio en líneas celulares de mamífero tiene varias desventajas metodológicas: i) los ensayos de actividad de los cotransportadores son a nivel poblacional y por lo tanto requieren de altos niveles de expresión de la proteína exógena (que

no se logran mediante la transfección transitoria), haciendo necesaria la generación de líneas estables, ii) se requiere la coexpresión tanto de la cinasa como del cotransportador por lo que se deberían construir 28 líneas para la cinasa activa y 28 para la mutante sin actividad catalítica, dificultando su manejo y aumentando el costo de la investigación por el incremento en los reactivos utilizados, ii) se debe tener especial cuidado en que los niveles de sobreexpresión cinasa/cotransportador sean proporcionales lo cual incrementa la dificultad y el tiempo de estandarización del modelo. Ante estos inconvenientes, la expresión funcional en ovocitos de *Xenopus* es una primera y eficiente aproximación para determinar posibles efectos diferenciales de las isoformas de WNK3. Los ovocitos de *Xenopus* han sido ampliamente utilizados para el estudio de la expresión de proteínas exógenas a partir de la microinyección de RNAc, debido a que ofrecen la ventaja de una considerable sobreexpresión de la proteína de interés y adicionalmente, cada ovocito microinyectado se comporta como un sistema independiente confiriendo una alta reproducibilidad de los resultados.

Clonación de las isoformas de WNK3 y generación de las construcciones

Utilizando como molde la genoteca de cerebro fetal humano (Human fetal brain Marathon-Ready, Clontech) y oligonucleótidos diseñados sobre los exones 18a y 23 detallados en la sección de Métodos, se amplificaron mediante reacciones de PCR dos productos cuya identidad molecular se corroboró mediante secuenciación automatizada y análisis de restricción (Fig.VI.18). El producto de menor tamaño corresponde a WNK3 18a (1018 pdb), mientras que el fragmento mayor es el de WNK3 18b con 140 pdb adicionales (1158 pdb). Estos productos se purificaron y subclonaron en el vector de expresión pGH19 entre los sitios 5'StuI y 3'DraIII del sitio de multiclonación. El exón 22 no pudo ser amplificado a partir de la genoteca siguiendo la misma estrategia de clonación, lo cual probablemente se deba a las diferencias en cuanto a abundancia de las isoformas ya que basados en los datos mostrados en Holden, 2004, el exón 22 se expresa en una proporción muy baja con respecto al exón 18a o 18b.

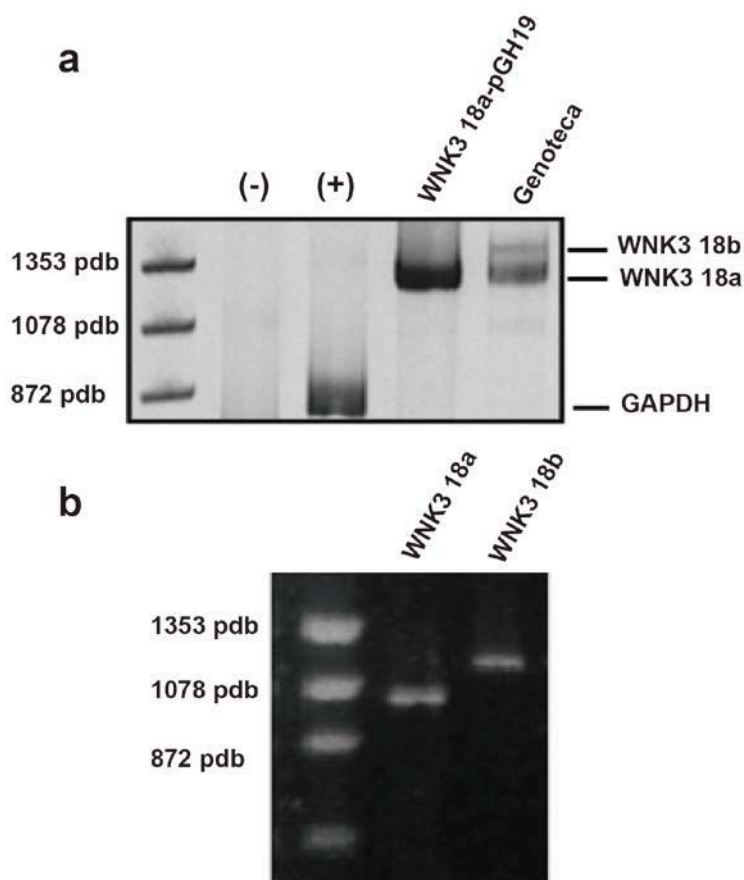


Figura VI.18 Amplificación de dos isoformas de WNK3 a partir de genoteca de cerebro fetal humano (a). mediante la estrategia de PCR y utilizando los oligonucleótidos diseñados sobre el exón 18a y el exón 23 como se detalla en el texto, se amplificó un producto que contienen el exón 18a (1270 pdb) y un segundo producto que contiene el exón 18b (1410 pdb). Un fragmento de ~ 860 pdb fue amplificado a partir de los oligonucleótidos específicos para GAPDH. **(b)** Las clonas fueron digeridas con las enzimas *StuI* y *DraIII* generando un fragmento de 1018 pdb en el caso de WNK3 18a y un fragmento de 1158 pdb en WNK3 18b.

Para obtener el cDNA de las isoformas de WNK3 que contienen el exón 22, se diseñó una estrategia de inserción mediante PCR de dos pasos utilizando los oligonucleótidos que se detallan en los Métodos. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en pGH19 y corroborados en su secuencia de manera automática así como mediante el análisis de restricción (Fig. VI.19). Con la finalidad de determinar si los efectos de cada una de las isoformas de WNK3 sobre los cotransportadores son dependientes de la actividad catalítica de WNK3, se generó mediante mutagénesis dirigida la variante de WNK3 sin actividad catalítica (WNK3-DA) que fue secuenciada para corroborar el correcto cambio en los nucleótidos.

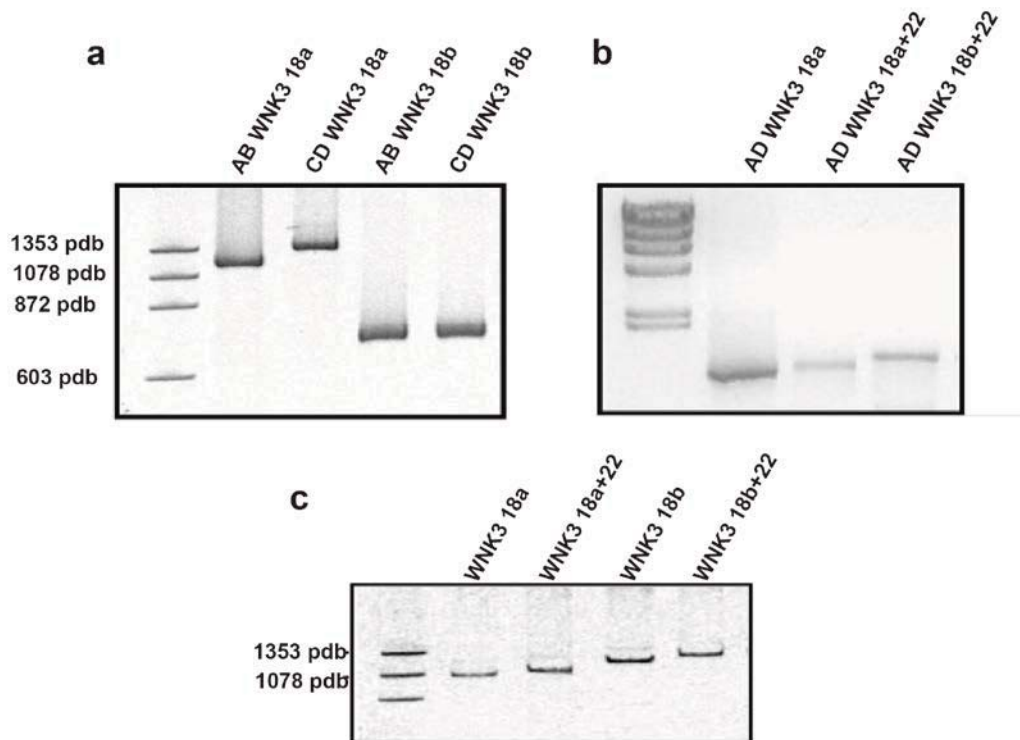


Fig.

VI.19 Amplificación por PCR de dos pasos como estrategia para insertar el exón 22 (a) amplificación de los fragmentos AB y CD generando los siguientes productos: fragmento AB WNK3 18a (1074 pdb), AB WNK3 18b (1215 bdp), fragmentos CD WNK3 18a y 18b (684 pdb). (b) los productos de la segunda PCR corresponden a los fragmentos, AD WNK3 18a+22 (1755 pdb) y AD WNK3 18b+22 (1866 pdb). (c) Análisis de restricción de las cuatro isoformas de WNK3, las clonas fueron digeridas durante 1h con las enzimas *StuI* y *DrallI*.

Efecto de las isoformas de WNK3 sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a Cl⁻

En trabajos previos se ha reportado un claro y potente efecto activador de WNK3-18a sobre el funcionamiento de los cotransportadores de Cl⁻ acoplados a sodio (Kahle et al. 2005; Rinehart et al. 2005). En esta sección de resultados se presentan los efectos de las otras variantes de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores NCC, NKCC1 y NKCC2. Los experimentos de NKCC se llevaron a cabo en hipotonicidad ya que en esta condición el cotransportador se encuentra inhibido. En la tabla III se muestran los valores obtenidos de la actividad de los NKCCs bajo las distintas condiciones experimentales. En general, la actividad basal del NKCC1 presenta una variación entre 139 a 275 pmol x ovocito⁻¹ x hr⁻¹; la coexpresión de cualquiera de las isoformas de WNK3 genera un incremento por arriba de 1500 pmol x ovocito⁻¹ x hr⁻¹. Expresados en porcentajes, los incrementos fueron de 2,330 ± 250, 3,383 ± 244, 3320 ± 405 y 2217 ± 567 para

las isoformas WNK3-8a, 18b, 18a+22 y 18b+22 respectivamente (Fig. VI.20a). La actividad del NKCC2 en presencia de las isoformas 18a y 18b muestran un incremento significativo en su actividad (tabla III), un resultado similar al obtenido para NKCC1.

Tabla III. Efecto de las isoformas de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores de cationes acoplados a Cl⁻.

	Control	WNK3-18a	Control	WNK3-18b	Control	WNK3-18a+22	Control	WNK3-18b+22
NKCC1	195 ± 42	5116 ± 551	208 ± 71	7560 ± 767	139 ± 48	7430 ± 907	275 ± 64	4756 ± 282
NKCC2	4160 ± 373	9721 ± 708	4106 ± 373	7622 ± 419	5342 ± 369	7324 ± 740	5342 ± 369	7001 ± 519
NCC	2379 ± 159	9310 ± 473	2016 ± 193	5690 ± 595	1353 ± 212	4246 ± 325	2513 ± 313	7446 ± 701
KCC1	3821 ± 372	518 ± 113	4053 ± 294	933 ± 144	2635 ± 354	2752 ± 263	3631 ± 372	1077 ± 237
KCC2a	15085 ± 943	1038 ± 179	10498 ± 656	2975 ± 330	15085 ± 943	3967 ± 1050	8201 ± 567	3253 ± 216
KCC2b	5192 ± 365	1617 ± 198	7771 ± 606	1305 ± 95	4185 ± 619	2455 ± 229	9117 ± 576	3650 ± 678
KCC3a	7777 ± 859	1398 ± 263	10547 ± 972	1129 ± 194	5811 ± 565	2894 ± 326	11448 ± 1391	848 ± 199
KCC3b	14229 ± 859	38 ± 27	14229 ± 1399	164 ± 34	NE	NE	NE	NE
KCC4	10724 ± 603	3052 ± 232	11327 ± 535	2752 ± 193	10264 ± 679	3168 ± 280	12120 ± 536	3016 ± 320

Los valores son la media ± EE. NE, no evaluado.

En el caso del cotransportador NCC, todas las isoformas producen un aumento significativo en su actividad. Los valores de captura de ⁸⁶Rb⁺ sensible a metolazona representativos de la actividad del NCC, se encuentran resumidos en la tabla III y corresponden a los porcentajes de incremento mostrados en la gráfica de la figura VI.20b. El máximo porcentaje de activación se obtiene en presencia de la isoforma WNK3-18a (337 ± 21%) mientras que el incremento en su actividad por efecto de las demás variantes es ligeramente menor 209 ± 21% para WNK3 18b, 234 ± 30% en WNK3 18a+22 y 208 ± 19% en el caso de WNK3-18b+22. Es importante notar que la isoforma 18b+22 que fue sugerida como inhibidora de la actividad del NCC (Glover et al. 2009) produce un incremento de su actividad en un porcentaje muy similar a las demás isoformas.

En cuanto a los cotransportadores de Cl⁻ acoplados a potasio, el efecto clásico de WNK3 18a sobre su actividad, es una potente inactivación de los KCCs incluso en una condición hipotónica en la que estos cotransportadores alcanzan su máximo funcionamiento. Las distintas variantes de WNK3 se coexpresaron junto con los cuatro miembros de la familia de cotransportadores de Cl⁻ acoplados a potasio (KCC1-4), además de dos variantes de KCC2 y

KCC3. Los resultados de captura de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a cloro que permiten diseccionar la actividad de los KCCs se muestran en la tabla III, en donde se observa que las cuatro isoformas de WNK3 inducen la reducción de la actividad de todos los KCCs evaluados. Los porcentajes de inhibición varían entre el 60 y el 90% y se muestran en las gráficas de la figura VI.21.

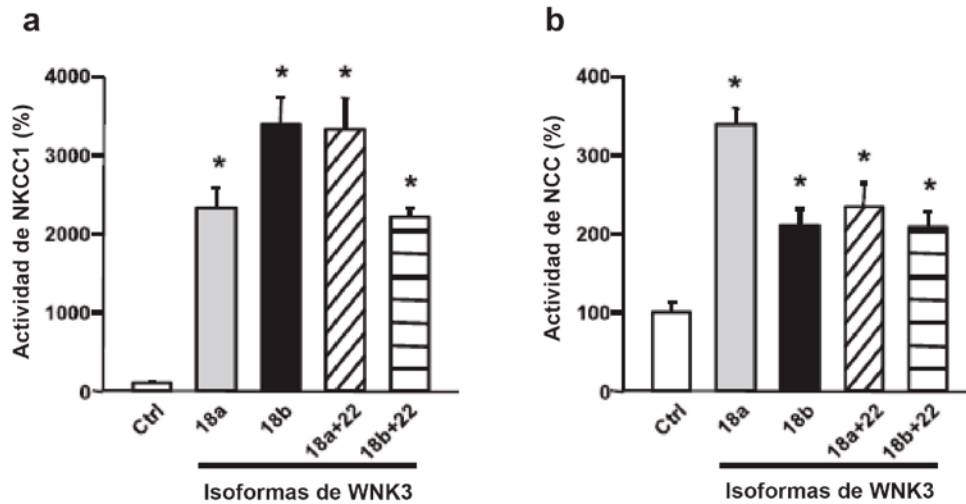


Fig VI.20 Efecto de las variantes de WNK3 en la actividad de los cotransportadores NKCC1 (a) y NCC (b). Los datos fueron normalizados con respecto a la actividad basal en ausencia de WNK3 que fue tomada como el 100%. Los experimentos se llevaron a cabo en una condición hipotónica. *Significativamente diferente de control a $P < 0.001$.

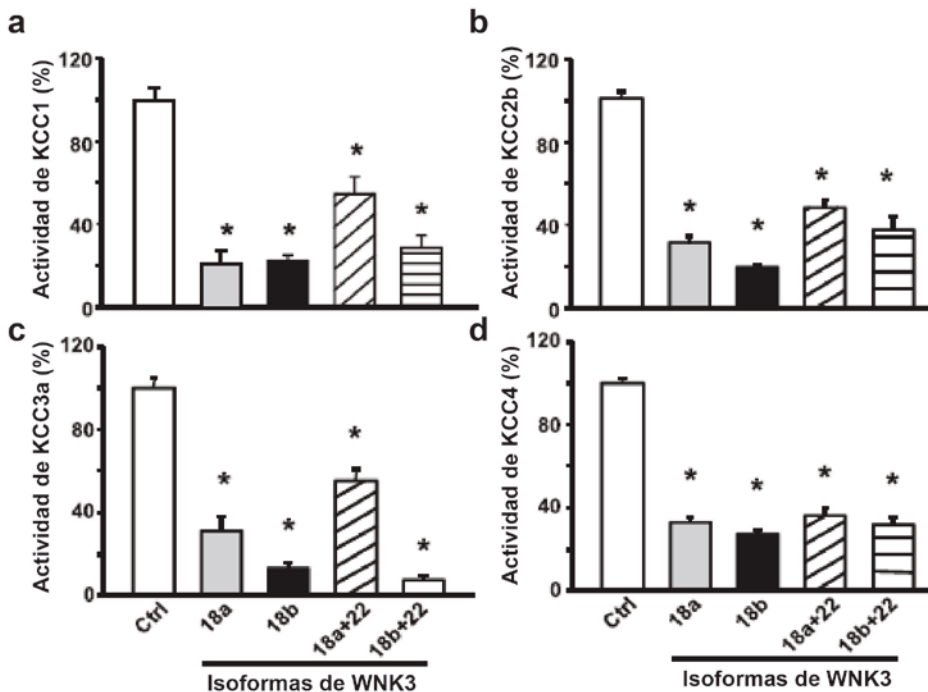


Fig. VI.21 Efecto de las variantes de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores de Cl^- acoplados a potasio KCC1 (a), KCC2b (b), KCC3a (c) y KCC4 (d). Los experimentos fueron llevados a cabo en una condición hipotónica. *Diferencias significativas con respecto al control a $P < 0.001$.

Efecto de las isoformas de WNK3-DA sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a Cl⁻

La pérdida de la actividad catalítica de la proteína WNK3-18a tiene consecuencias interesantes sobre la actividad de los cotransportadores, ya que no solo evita el efecto de WNK3, sino que modifica su actividad basal. Una pregunta importante por resolver es si este efecto es una respuesta conservada para las otras isoformas de WNK3. Para responder a esta cuestión, mediante mutagénesis puntual se eliminó la actividad catalítica de las isoformas de WNK3 y se evaluó su efecto sobre la actividad de los cotransportadores NKCC1/2, NCC, KCC1, KCC2a, KCC2b, KCC3a y KCC4.

En la tabla IV se indican los valores obtenidos de captura de ⁸⁶Rb⁺ dependiente de la actividad de NKCC1, que en condiciones basales se encontró en un rango de 7048 ± 425 a 10263 ± 1793 pmol x ovocito⁻¹ x h⁻¹. El efecto de las mutantes DA fue consistente entre las distintas isoformas, reduciendo la captura a 2839 ± 310, 3294 ± 218, 1206 ± 175 y 3440 ± 166 pmol x ovocito⁻¹ x h⁻¹ en el caso de los ovocitos que coexpresan a WNK3-18a, 18b, 18a+22 y 18b+22 respectivamente. Los resultados obtenidos en el caso de la actividad del NKCC2 reflejan el mismo efecto inhibitor por parte de las isoformas 18a y 18b (Tabla IV). Estos experimentos se llevaron a cabo en condiciones hipertónicas en donde el NKCC alcanza su máxima activación. Efectos muy similares se observaron en el caso de la actividad del NCC, en donde todas las isoformas redujeron su actividad que va de 1145±176 a 6289 ± 658 en hipertonicidad hasta 124 ± 155 pmol x ovocito⁻¹ x h⁻¹ en WNK3-18a, 724 ± 120 pmol x ovocito⁻¹ x h⁻¹ por la coexpresión de WNK3-18b, 1010 ± 325 pmol x ovocito⁻¹ x h⁻¹ en presencia de WNK3 18a+22 y 1897 ± 482 con WNK3-18b+22. Los porcentajes de incremento se muestran en la figura VI.22.

El efecto de las variantes DA sobre el funcionamiento de la familia de cotransportadores que acoplan el movimiento de Cl⁻ al gradiente del K⁺ se evaluó en una condición isotónica, en la cual su actividad es esencialmente nula, a excepción del KCC2 que presenta moderada actividad basal. La coexpresión de las isoformas 18a y 18a+22 induce un incremento en la actividad de todas las variantes de KCC, particularmente la isoforma en la que está presente el exón 22. Sin

embargo, la expresión de la isoforma DA de WNK3-18b con o sin exón 22 evita el efecto potenciador de la actividad de los KCC característico de la falta de actividad cinasa de la proteína. Estos datos se muestran en la tabla IV y como porcentaje en la figura VI.23.

Tabla IV. Efecto de las isoformas catalíticamente inactivas de WNK3 sobre la actividad de los CEN acoplados a Cl⁻

	Control	WNK3-18a	Control	WNK3-18b	Control	WNK3-18a+22	Control	WNK3-18b+22
NKCC1	8518 ± 880	2839 ± 310	7048 ± 425	3294 ± 218	10263 ± 1793	1260 ± 175	7858 ± 681	3440 ± 166
NKCC2	6190 ± 328	1800 ± 183	6190 ± 328	1864 ± 433	NE	NE	NE	NE
NCC	3505 ± 461	124 ± 155	1145 ± 176	724 ± 120	2557 ± 262	1010 ± 325	6289 ± 658	1897 ± 482
KCC1	156 ± 21	627 ± 120	150 ± 16	542 ± 156	22 ± 27	786 ± 207	106 ± 16	139 ± 30
KCC2a	1881 ± 291	6235 ± 1056	1282 ± 174	1162 ± 154	2257 ± 476	7289 ± 1589	1282 ± 174	1207 ± 201
KCC2b	544 ± 39	1529 ± 165	418 ± 30	374 ± 36	635 ± 78	2994 ± 587	353 ± 37	239 ± 42
KCC3a	363 ± 58	714 ± 172	178 ± 27	278 ± 78	477 ± 104	795 ± 151	199 ± 50	62 ± 37
KCC4	546 ± 99	1554 ± 285	558 ± 109	645 ± 176	928 ± 180	5686 ± 1556	895 ± 221	1186 ± 370

Los valores son la media ± EE. NE, no evaluado.

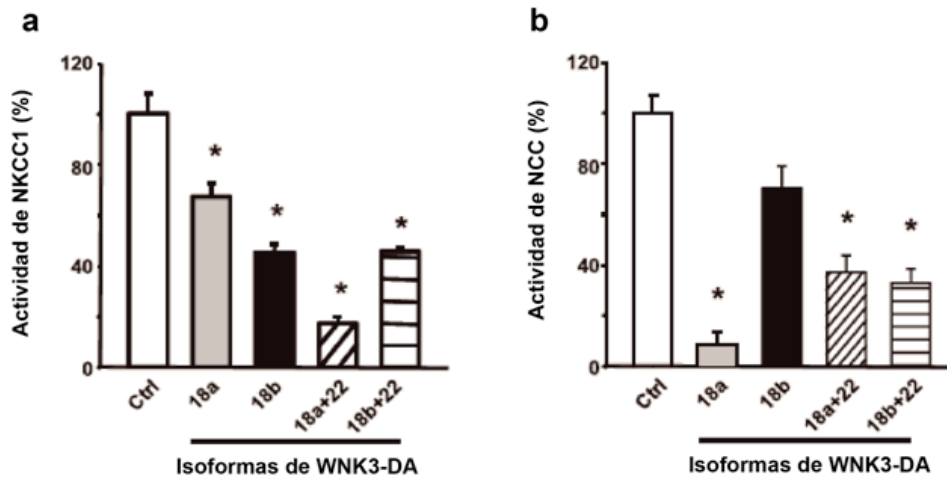


Fig. VI.22 Efecto de las variantes catalíticamente inactivas de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores , NKCC1 (a) y NCC (b). Los experimentos correspondientes a NKCC1 se llevaron a cabo bajo una condición hipertónica. *Significativamente diferente del control a P<0.001.

Es importante notar que a pesar de que las otras isoformas de WNK3 mantienen un efecto similar al descrito para la WNK3-18a, la magnitud de estos efectos es diferente entre ellas. La figura VI.24 muestra estas diferencias como delta de la actividad del cotransportador. Es claro que el efecto de la isoforma 18b tanto nativa como de la mutante DA sobre la actividad de NKCC1 es mayor comparada con el efecto de WNK3-18a, contrario a lo que ocurre con el

NCC, en donde el efecto de las isoformas 18a es mayor que el de las 18b (con o sin actividad catalítica). Estas diferencias se eliminan en presencia del exón 22 cuando se estudia la actividad del NCC y se revierten en el caso del NKCC1.

Las observaciones anteriormente descritas sugieren que existen secuencias dentro de la estructura de WNK3 que modulan la magnitud del efecto sobre la actividad de los cotransportadores, enfatizando la relevancia del estudio detallado del patrón de expresión de cada isoforma.

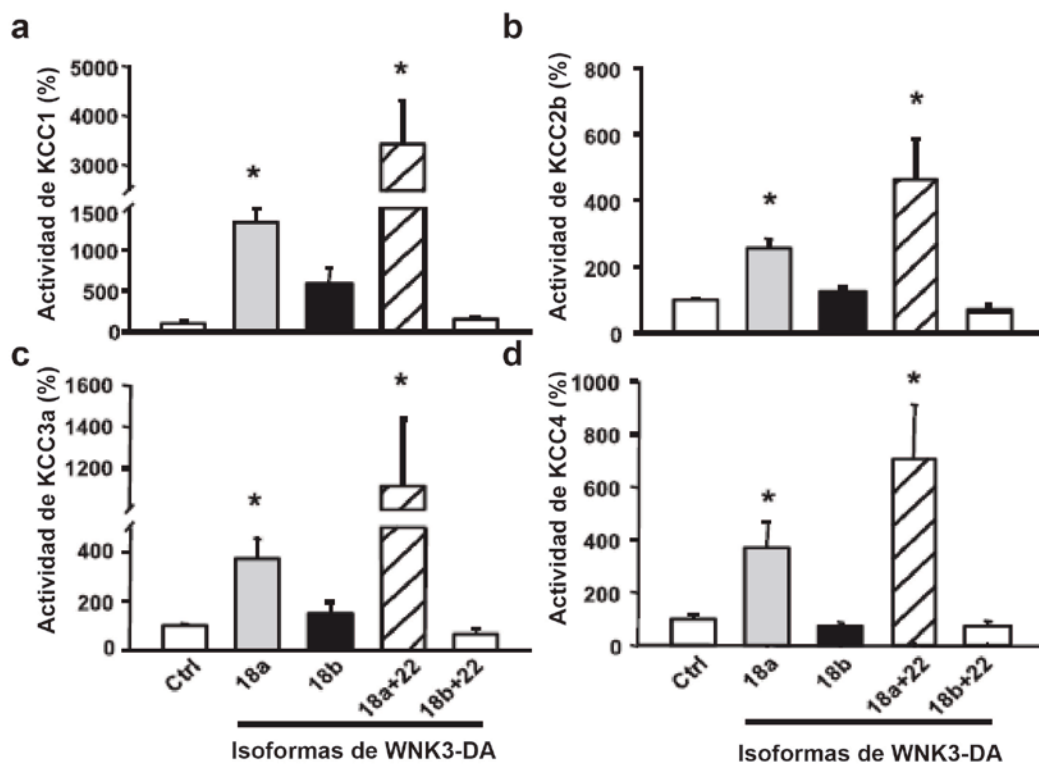


Fig. VI.23 Efectos de las variantes catalíticamente inactivas de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores de K^+ acoplados a Cl^- KCC1 (a) KCC2b (b), KCC3a (c) y KCC4 (d). Los se llevaron a cabo bajo una condición isotónica. *Significativamente diferente del control a $P < 0.001$.

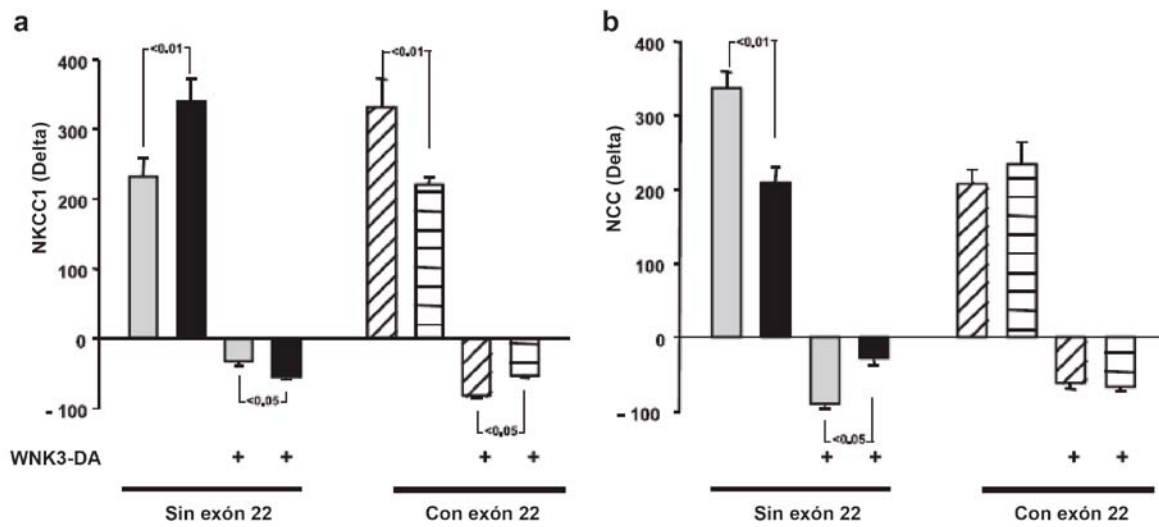


Fig. VI.24 Diferencias en la magnitud del efecto de las isoformas de WNK3 y sus variantes catalíticamente inactivas sobre la actividad de los cotransportadores NKCC y NCC. Los resultados son expresados como delta del efecto en NKCC1 (**a**) o NCC (**b**) por WNK3-18a (barras grises) o WNK3-18b (barras negras), con o sin actividad catalítica. Las barras en diagonal corresponden al efecto de WNK3-18a+22 y las barras horizontales a WNK3-18b+22, con y sin actividad catalítica como se indica en la figura.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo resaltan la participación de la cinasa WNK3 en la regulación del volumen celular en células HEK293. En experimentos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus*, WNK3 ha mostrado ejercer una regulación recíproca sobre la actividad de los CEN de cationes acoplados a cloruro, los cuales participan de manera activa durante los mecanismos de regulación de volumen. Esta característica es única para la WNK3 dentro de la familia de estas cinasas y la hace particularmente interesante. El procedimiento experimental usado en esta investigación se basó de manera importante en la observación de los efectos de sobre-expresión de la cinasa WNK3 y la expresión de la mutante sin actividad catalítica como herramienta de estudio. Las células renales HEK293 de origen embrionario fueron seleccionadas como modelo experimental por su alta eficiencia como sistema de sobre-expresión de proteínas exógenas. El uso del vector pcDNA3.1/NT-GFP TOPO (Invitrogen), simplificó el proceso de selección ya que además del gen de resistencia a antibiótico, contiene un gen reportero con la GFP fusionada al extremo amino terminal de WNK3, de tal manera que las líneas establemente transfectadas podían ser corroboradas tanto por ensayos tipo western blot utilizando anticuerpos anti-WNK3 o anti-GFP, como por microscopía de fluorescencia. La variante de WNK3 sin actividad catalítica (WNK3-DA) fue diseñada mediante mutagénesis dirigida sustituyendo el residuo de aspartato (D) en la posición 294 por un residuo de alanina (A), este aspartato funciona como sitio de unión a Mg^{2+} y es necesario para la actividad cinasa de la proteína.

En esta investigación se mostró la localización de WNK3 en puntos a nivel de las uniones intercelulares en el cultivo de células HEK293. Este mismo patrón de localización de WNK3 se ha observado en epitelios secretores especializados en el transporte de Cl^- , incluyendo ductos pancreáticos y biliares, epidídimo, glándulas gástricas y epitelio de absorción del intestino delgado (Kahle *et al.* 2005). Este patrón de distribución sugiere una relación de WNK3 con procesos de transporte iónico transepitelial. Sin embargo, su localización subcelular pudiera ser dependiente del tipo de célula, ya que en cultivos gliales de naturaleza neoplásica, WNK3 se

localiza claramente en estructuras vesiculares en el citosol (Haas *et al.* 2011). Será necesario ampliar las investigaciones a otros tipos celulares, evaluando si dicha distribución es particular de la célula en estudio o si estos cambios están asociados a eventos propios de la transformación celular durante neoplasias. La localización de WNK3 en las uniones intercelulares, requiere que la proteína exprese su actividad de fosforilación. Como se muestra en nuestras investigaciones, la mutante WNK3-DA ya no se le encuentra en las uniones intercelulares sino que se localiza en una zona cercana al núcleo, que colocaliza parcialmente con la cisterna trans de Golgi.

Un resultado interesante de nuestra investigación es que se demostró por primera vez, una implicación de WNK3 en el fenotipo de las células HEK293. La observación de un cambio notable en la morfología de las células WNK3-DA, sugiere que la actividad catalítica de WNK3 se requiere para que se lleven a cabo las interacciones debidas con aquellos componentes del citoesqueleto, presumiblemente necesarios para el correcto ensamblaje de la arquitectura celular típica de la línea HEK293. La vía de señalización que incluye a las proteínas Rho GTPasas podría estar participando en este proceso, por su importante implicación en la morfogénesis epitelial. La proteína Rac, uno de los elementos de esta vía, induce la formación de una red de actina submembranal que capacita a la célula para formar extensiones periféricas tipo lamelipodio, mientras que otro de los elementos de la vía, el Cdc42, es indispensable durante la formación de filopodios (Papakonstanti *et al.* 2000). De particular interés para la línea de esta investigación, es que dichas modificaciones podrían alterar la respuesta de la célula ante cambios osmóticos, ya que el citoesqueleto es uno de los elementos celulares que presenta alteraciones drásticas durante la respuesta a los cambios en el volumen celular, tanto para la modificación inicial del volumen inducida por la alteración osmótica, como para la correcta recuperación del volumen original de la célula. El citoesqueleto también tiene un papel en el direccionamiento de proteínas de transporte de osmolitos hacia la membrana celular, así como en su funcionamiento y reciclamiento (Pedersen *et al.* 2001). Un elemento del mayor interés en esta cadena de interacciones con el citoesqueleto posiblemente moduladas por WNK3, podría establecerse a través de sus acciones sobre los cotransportadores NKCCs y KCCs. Estas

moléculas han mostrado operar como intermediarios entre las conexiones de la membrana plasmática y el citoesqueleto a través de su unión a las proteínas ezrina-radixina-moesina, modulando las fuerzas contráctiles que se generan entre la matriz extracelular y la membrana plasmática durante la migración de la célula (Denker *et al.* 2000; Denker y Barber 2002), proceso durante el cual se requieren adaptaciones en el volumen celular (Lang *et al.* 1998). La modulación de la actividad de estos CEN por WNK3 puntualiza su relevancia en los procesos de migración celular, por lo que es interesante evaluarla con detalle en investigaciones posteriores. La evidencia que liga los fenómenos de volumen y migración celular indica que NKCC1 es un elemento indispensable para que se lleven a cabo los cambios de volumen asociados a la invasión celular y que su actividad es dependiente de la presencia de WNK3 (Haas *et al.* 2011).

La dinámica de la distribución subcelular de WNK3 y de su variante sin actividad catalítica se modificó sustancialmente frente al estrés osmótico. Las condiciones anisotónicas llevaron a la relocalización de la proteína hacia el citosol, un efecto asociado probablemente a la necesaria disponibilidad de la cinasa en el citoplasma para interactuar con sus proteínas blanco durante la respuesta adaptativa al cambio en volumen. Los resultados no muestran la movilización de WNK3 a la membrana plasmática o sus regiones circundantes, por lo que es probable que WNK3 forme parte de una compleja red de señalización dentro de la regulación del volumen celular, por arriba de otras proteínas que se encargan de la activación directa de los canales y cotransportadores.

WNK3 y el decremento regulador del volumen

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la WNK3 no participa en el proceso de movilización de agua que genera el hinchamiento cuando la célula se expone a una condición hipotónica (H15%); en cambio, WNK3 sí ejerce un efecto sobre el proceso de DRV, cuya eficiencia muestra una reducción, ligera pero significativa por la sobre-expresión de la cinasa. Un dato de mayor relevancia en relación con la importancia de WNK3 en el DRV es el que la mutante DA sin actividad catalítica no solo restablece la velocidad del proceso, sino que

lo acelera. Este hallazgo junto con el cambio en la cinética de la regulación del volumen sugiere que la WNK3 está participando en la modulación de algunas de las vías de movilización de los osmolitos, manteniendo la vía deprimida por una acción relativa a su actividad de fosforilación. Con base en el conocimiento de la importancia del estado de fosforilación de al menos algunas de las vías de movilización de osmolitos responsables del DRV, como es el caso de los transportadores KCC, es posible que la enzima esté contribuyendo a la dinámica de fosforilación de al menos este sistema de cotransportadores, sin excluir la posibilidad de su influencia en otras de las vías de movilización de osmolitos que permiten la recuperación del volumen celular. Como se mencionó en la Introducción, los osmolitos que participan de manera importante en el DRV son por una parte los iones presentes en los compartimientos intra y extracelulares, en concentraciones suficientemente elevadas como para incidir en la movilización osmótica de agua, y por otra parte, el grupo de osmolitos orgánicos, que son un conjunto de moléculas heterogéneas, que cumplen con el mismo requisito de concentración suficiente para participar en la dinámica de los flujos de agua. En este trabajo se investigaron los efectos de WNK3 sobre los mecanismos encargados de la movilización de los osmolitos que, en general son canales y CEN para el caso de los iones, y vías difusionales en el caso de los osmolitos orgánicos.

La movilización de osmolitos orgánicos es uno de los mecanismos celulares más importantes para enfrentar y contrarrestar las alteraciones en el volumen de la célula y la taurina es considerada el osmolito orgánico representativo; sin embargo, nuestros resultados en células HEK293 indican que esta vía no se encuentra activa ante un estímulo hipotónico de 15%, por lo que en este tipo celular la liberación hipotónica de taurina parece ser útil únicamente para enfrentar perturbaciones en la osmolaridad de mayor magnitud. De acuerdo al tipo celular se han reportado variaciones en la sensibilidad de la liberación hipotónica de taurina; por ejemplo, en células de tipo epitelial son necesarias reducciones de al menos 20% en la osmolaridad para activar la vía (Tomassen *et al.* 2004), en contraste con las células nerviosas que movilizan taurina frente a reducciones de 3-5% en la osmolaridad (Olson y Li 2000; Tuz *et al.* 2001).

De acuerdo a estos resultados, el DRV en células HEK293 frente a una condición hipotónica 15%, se lleva a cabo mediante la movilización de osmolitos inorgánicos, en donde el Cl^- parece tener un papel fundamental. Una contribución importante del presente trabajo al entendimiento de las funciones de la cinasa WNK3, fue demostrar su capacidad de modular la $[\text{Cl}^-]_i$; este efecto había sido intuido previamente por su influencia sobre la actividad de los CEN; sin embargo, no se había demostrado de manera cuantitativa. Lo que se demostró en este trabajo es que la $[\text{Cl}^-]_i$ en las células HEK293 en condiciones isotónicas, está determinada al menos parcialmente por la actividad de la cinasa WNK3, ya que la sobre-expresión de la cinasa incrementa la $[\text{Cl}^-]_i$, en tanto que cuando se expresa la enzima sin actividad catalítica, se observa una reducción. El estrés hipotónico produce la salida de Cl^- generando un decremento en sus niveles intracelulares; dicho proceso fue igualmente modificado por la sobre-expresión de WNK3 y WNK3-DA. Este efecto es indicativo de la influencia de WNK3 sobre las vías de liberación de Cl^- , dentro de las cuales en este trabajo (Cruz-Rangel *et al.* 2012) se evaluaron el canal de Cl^-_{vol} y los cotransportadores KCCs. Los resultados mostraron que WNK3 no regula la amplitud de la corriente de Cl^- activada por volumen bajo las condiciones experimentales utilizadas en la investigación; sin embargo, no es posible considerar de forma concluyente este resultado negativo, ya que las proteínas sobre-expresadas pueden estar siendo diluidas por el remplazo parcial o total del contenido citosólico en la modalidad de patch clamp de célula completa, en la que se realizó el análisis de estas corrientes de Cl^- . Esta cuestión puede ser aclarada más definitivamente en estudios en los que se utilice la conformación de parche perforado, la cual permite mantener la integridad de la composición iónica y proteica del interior celular.

A diferencia de las observaciones sobre el canal de Cl^-_{vol} , en el presente estudio se pudo demostrar que WNK3 ejerce una importante modulación de la actividad de los cotransportadores KCCs en las células HEK293. Un papel importante de la isoforma KCC3 en el DRV ha sido demostrada en cultivos primarios de neuronas piramidales de hipocampo provenientes de ratones KCC3-/- (Boettger *et al.* 2003). En estas células, la regulación del volumen después del estrés hipotónico se ve dramáticamente reducida con respecto al control,

causando adicionalmente neurodegeneración. Este efecto de la ablación génica de KCC3 sobre el DRV, también ha sido observado en células del túbulo renal y eritrocitos (Boettger *et al.* 2003; Rust *et al.* 2007). Cabe mencionar que en las células HEK293 no existen reportes de la expresión de las distintas isoformas de los KCC (KCC1-KCC4) encontradas en otros tipos celulares, por lo que los resultados obtenidos a partir la captura de ^{86}Rb sensible a Cl^- como los del presente trabajo no permiten hacer una distinción entre las posibles variantes, sino que la actividad medida corresponde a la suma de todas aquéllas variantes que tengan una expresión funcional en estas células. En este tema, nuestros resultados muestran claramente que la sobre-expresión de WNK3 abate la actividad de los KCCs tanto en condiciones isotónicas como frente al estrés hipotónico. Su efecto está mediado por la actividad cinasa de la proteína, ya que la mutante inactiva WNK3-DA incrementa la actividad de los KCCs por arriba de su funcionamiento normal durante hipotonicidad. Estos efectos podrían explicar al menos parcialmente las diferencias en la $[\text{Cl}^-]_i$ y el efecto de la WNK3 sobre el DRV. Este tipo de modulación de la actividad de los KCCs por WNK3 correlaciona con los datos obtenidos utilizando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión heteróloga. A diferencia de estos reportes, en nuestro modelo de estudio es interesante notar que en presencia de la mutante catalíticamente inactiva WNK3-DA, el estrés hipotónico no incrementa la actividad de los KCCs más allá de la respuesta ya observada en isotonicidad. Una posible explicación es que en los ovocitos se están sobre-expresando tanto la proteína WNK3-DA como el cotransportador y por lo tanto hay un mayor número de KCCs disponibles por ser activados. El número de KCCs funcionalmente expresados en las células HEK293 sobre los que la proteína WNK3-DA puede ejercer sus efectos es limitado, por lo que desde la condición isotónica se alcanza la máxima actividad de los cotransportadores. Será interesante llevar a cabo estudios comparativos en sistemas de distinto nivel de especialización como pueden ser los ovocitos y los sistemas celulares ya determinados.

El estado de fosforilación de los KCCs es esencial para la modulación de su función, ya que se activan por defosforilación de la molécula y se inactivan por su fosforilación. Estudios realizados en KCC3 mostraron que la fosforilación tiene lugar en los residuos de treonina 991 y 1048, sitios altamente conservados entre los miembros de los KCCs (Rinehart *et al.* 2009). De

acuerdo a nuestros resultados, es posible que en la condición isotónica, la cinasa WNK3 mantenga un estado basal de baja actividad de los KCCs y frente a una condición hipotónica se favorezca la defosforilación de los cotransportadores ya sea por el incremento en la actividad de proteínas fosfatasas o por un decremento en la actividad de WNK3, que lleve a la reducción en la función de los cotransportadores. Estos resultados van de acuerdo con la hipótesis de que el estado de fosforilación de los cotransportadores es el elemento determinante para su actividad. Como se demostró en ovocitos, en las células HEK293 bajo una condición en donde hay una sobre-expresión de WNK3 (células WNK3+) se alcanzaría un estado máximo de fosforilación, que inactiva a los cotransportadores, y los hace incapaces de responder al estímulo hipotónico. Por el contrario, el simular una condición en la que los niveles de WNK3 activa son reducidos (por un exceso de la mutante catalíticamente inactiva WNK3-DA) llevará a la defosforilación de los KCCs y se traduciría en su activación máxima. El estudio de los niveles de fosforilación de los KCCs en las líneas WNK3+ y WNK3-DA mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra los residuos de treonina 991 y 1048 será necesario para demostrar inequívocamente estas consideraciones en un sistema de células especializadas.

Una acotación importante de este trabajo es la de hacer hincapié en la dificultad de discernir farmacológicamente entre la contribución de los KCCs y el canal de Cl^-_{vol} a la recuperación del volumen celular. La baja especificidad de los inhibidores clásicos de estas vías (DIOA y DCPIB respectivamente), hacen que al menos en las células HEK293 no sea posible usar este tipo de abordaje experimental. Estos resultados constituyen un importante llamado de atención para aquellas investigaciones en otros tipos celulares, que atribuyen una importante contribución de los KCCs al proceso del DRV utilizando concentraciones de DIOA que al menos en las células HEK293 bloquean rápida y totalmente la $\text{ICl}^-_{\text{vol}}$ (Taouil y Hannaert 1999; Ernest *et al.* 2005). Nuestros resultados resaltan la importancia de que en estudios de esta naturaleza se asegure el evaluar la selectividad de los fármacos utilizados en las distintas vías de movilización de osmolitos. En tanto esto no se haya realizado, dichos resultados deben considerarse con las reservas pertinentes.

Finalmente, aunque los efectos de WNK3 sobre los KCCs pueden explicar los cambios en la eficiencia del DRV, los mecanismos que la célula emplea para regular el volumen frente al estrés osmótico son procesos dinámicos y complejos. Es claro que aún con la sobre-expresión de WNK3 y la consecuente eliminación de la actividad de los KCCs, las células son todavía capaces de regular su volumen con bastante eficiencia, indicando la contribución al DRV de otros mecanismos efectores independientes de WNK3; los canales de K^+ son candidatos potenciales. Las corrientes de K^+ activadas durante hipotonicidad están asociadas a fenómenos concurrentes al cambio en volumen, como pueden ser cambios en el potencial de membrana, en la concentración citosólica de calcio, o el estiramiento de la membrana. Estas condiciones pueden constituir señales de activación de canales de K^+ tales como los activados por voltaje, o los activados Ca^{2+} intracelular. No se excluye que estén operando canales K^+ activados por señales directamente relacionadas con el volumen, aún no identificadas y que se denominan en forma general como canales activados por hinchamiento (Hoffmann y Pedersen 2011). En las células HEK293 no se cuenta con una caracterización completa de las corrientes de K^+ implicadas en el DRV y la mayoría de las investigaciones realizadas en este tipo celular con respecto a canales de K^+ han usado a estas células como sistema de expresión de proteínas exógenas. Es así como se ha explorado la participación de los canales TASK-2 (Niemeyer *et al.* 2001). El conjunto de estas observaciones señala que la influencia de WNK3 sobre las corrientes de K^+ inducidas durante hipotonicidad es un tópico interesante de abordar en trabajos de investigación posteriores.

WNK3 y el incremento regulador del volumen

Nuestro estudio describe la participación de WNK3 sobre el proceso de regulación de volumen ante una condición hipertónica. Los modelos de incremento en la osmolaridad extracelular hacen uso de moléculas relativamente inertes como sorbitol, sacarosa, manitol o mio-inositol, que evitan la alteración de parámetros fisiológicos, como fuerza iónica, concentración de Cl^- , concentración de Na^+ o cambio en el pH. En este trabajo se utilizó un incremento de hasta 600 mOsm mediante la adición de sorbitol, manteniendo constante la concentración de NaCl en 135

mM. Es importante destacar que la magnitud del incremento en la osmolaridad debe considerar las diferencias en el tipo celular; existen células poco tolerantes al estrés hipertónico, que desencadena procesos de muerte incluso frente elevaciones discretas en la osmolaridad, mientras que otras son más resistentes tanto a la magnitud como a la duración del estrés osmótico (Burg *et al.* 2007) . Las células HEK293 son un tipo celular relativamente resistente a alteraciones osmóticas, ya que la exposición a 600 mOsm durante periodos de hasta 15 min no produce efectos lesivos aparentes y las células conservan la capacidad de regulación del volumen.

Bajo este modelo de estrés hipertónico utilizado en el presente estudio, las tres líneas celulares desarrolladas para la investigación, WNK3 (vector), WNK3+ y WNK3-DA muestran el mismo porcentaje de encogimiento, indicando que la WNK3 no tiene efecto sobre el desplazamiento inicial de agua generada por la condición hipertónica. En donde sí se observa una influencia de WNK3 es en la respuesta adaptativa de recuperación del volumen. La eficiencia total del IRV se incrementa con la sobre-expresión de WNK3 en tanto que no se afecta por la expresión de la cinasa sin actividad catalítica. Este resultado es la suma de efectos distintos de cada una de las condiciones examinadas, es decir, la sobre-expresión de WNK3 y la expresión de WNK3-DA en momentos distintos del proceso de IRV. Los efectos de la manipulación celular en ambos casos se previenen por la inhibición del cotransportador, utilizando a la bumetanida como bloqueador, lo que sugiere la participación del transportador electroneutro NKCC en las acciones de WNK3. Los resultados obtenidos de los ensayos de actividad del NKCC muestran que en las células HEK293 este cotransportador no es uno de los mecanismos celulares importantes para la regulación del volumen frente al estrés hipertónico inducido por sorbitol; esta misma observación había sido reportada previamente por Isenring *et al.* 1998 empleando una condición hipertónica por aumento en la osmolaridad con sacarosa. En cambio, en otros tipos celulares la participación del NKCC en el proceso del IRV es indispensable ya que la inhibición de la actividad del cotransportador abate la regulación del volumen (Friedrich *et al.* 2006). En un modelo animal de NKCC^{-/-}, los astrocitos derivados de la corteza cerebral muestran una reducción importante en su capacidad de regular el volumen ante una

condición hipertónica, indicando que la participación del NKCC1 es esencial para el proceso de IRV. Es interesante que en este mismo modelo de estudio, el DRV inducido después de un estrés hipotónico se acelera en los astrocitos NKCC-/-, siendo 45% más eficiente la recuperación del volumen; esto sugiere que alguna vía de transporte iónico activada durante el DRV está siendo sobreactivada en los astrocitos NKCC-/- (Su *et al.* 2002). Estos datos son indicativos de la variabilidad y complejidad de los mecanismos de regulación del volumen con respecto al tipo celular.

A pesar de que el mecanismo de IRV en células HEK293 no depende mayormente del NKCC, nuestros resultados indican que WNK3 tiene la capacidad de regular la actividad del cotransportador en condiciones isotónicas. Al igual que en ovocitos de *Xenopus*, en células HEK293 que sobre-expresan a WNK3 se muestra un incremento en la actividad del NKCC, que es observable desde la condición isotónica, lo cual explicaría el incremento en la eficiencia del IRV. Algunos estudios sobre las isoformas NKCC1 y NKCC2 han mostrado que la función del cotransportador se regula por eventos de fosforilación/defosforilación, incrementándose la actividad por la fosforilación simultánea de los residuos de treonina 99, 104 y 117 en el segmento amino terminal (Gimenez y Forbush 2005). Los principales intermediarios propuestos para llevar a cabo la fosforilación del cotransportador son las cinasas SPAK (STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase) y OSR1 (oxidative stress-responsive kinase-1) (Piechotta *et al.* 2002; Dowd y Forbush 2003). Las WNK podrían participar en esta cadena de señalización actuando como responsables de la fosforilación y activación de OSR1 y SPAK (Vitari *et al.* 2005). En nuestra investigación, una modulación análoga por WNK3 sobre el NKCC de las células HEK293, podría explicar el mecanismo por el cual se está activando el cotransportador. La movilización de WNK3 de uniones intercelulares hacia el citosol y no hacia la membrana plasmática frente al estrés osmótico mostrada en el presente trabajo, es otra de las evidencias en favor de que WNK3 es una cinasa que se ubica cascada arriba de otras proteínas en la señalización celular durante el IRV.

Es de hacer notar que existe una diferencia importante acerca del funcionamiento de NKCC entre los ovocitos de *Xenopus* y las células HEK293 con relación al efecto de la mutante sin actividad catalítica. Mientras que en los ovocitos, WNK3-DA inhibe completamente la actividad del cotransportador estimulada por la condición hipertónica, en las células HEK293 que expresan a la mutante, se acelera el funcionamiento del NKCC desde la condición isotónica y ya no hay cambio en respuesta a la hipertonidad. Este efecto probablemente esté relacionado con la activación del cotransportador por niveles bajos de cloruro citosólico que se encuentran en la línea celular y no en el ovocito, como consecuencia del incremento en la actividad de los KCCs y que describimos en párrafos anteriores. Ha sido reportado que la reducción de la $[Cl^-]_i$, es un estímulo que incrementa la fosforilación de los residuos de treonina necesarios para la activación de los transportadores NKCC1, NKCC2 y NCC (Darman y Forbush 2002; Pacheco-Alvarez *et al.* 2006; Ponce-Coria *et al.* 2008), y que el mecanismo de activación bajo esta condición implica la participación de WNK3. Se ha propuesto que WNK3 detecta los niveles bajos de Cl^-_i y activa a SPAK, la cual directamente ejerce su influencia sobre el cotransportador a través de la fosforilación de las treoninas 96, 101 y 111, incrementando su operación (Ponce-Coria *et al.* 2008). Una explicación alternativa implica la participación de otros de los miembros de la familia de cinasas WNK, como WNK1 o WNK2 que se expresan en las células HEK293 de manera endógena (Haas *et al.* 2011) y que podrían encargarse de la fosforilación y activación del NKCC.

Finalmente, a pesar de que el cotransportador NKCC no participa de manera importante en el proceso de IRV al menos en este tipo celular, es destacable la observación del potencial de WNK3 para modular la actividad de este cotransportador. Este efecto será mucho más drástico en células cuya regulación del volumen depende de forma importante del NKCC, como es el caso de las células de glioma D54-MG en donde el IRV corre esencialmente a cargo de NKCC y en donde se ha mostrado que su actividad es dependiente de WNK3 (Haas *et al.* 2011).

Es importante señalar que a pesar de que la sobreexpresión de la cinasa WNK3 en las células HEK293 no refleja de forma directa el papel fisiológico de esta proteína, su efecto modulador sobre la actividad de los cotransportadores electroneutros es claro e implica una primera aproximación al entendimiento de su participación en los procesos de la recuperación del volumen en un sistema de células de mamífero. Más aún, ya que los niveles de expresión de la proteína WNK3 endógena son muy bajos con respecto a los de la mutante catalíticamente inactiva, es probable que exista una competencia por los sitios de unión a las proteínas blanco y el efecto de WNK3 sea enmascarado por el exceso de WNK3-KD; por tanto, esta estrategia experimental podría reflejar indirectamente el papel de la cinasa WNK3 tanto en la modulación de los niveles intracelulares de Cl^- , como en los procesos de recuperación del volumen, a través de efectos múltiples y complejos. Este trabajo es el primero en abordar el tema de la respuesta adaptativa tanto en condiciones hipotónicas como hipertónicas. Nuestras investigaciones, junto las reportadas recientemente en células del glioma humano (Haas *et al.* 2011), en las que se aborda la participación de WNK3 en la respuesta al estrés hipertónico, son hasta la fecha, la única fuente de información en un sistema de líneas celulares. Las coincidencias y las diferencias encontradas en estos estudios y en aquéllos realizados en ovocitos, evidencian la necesidad de proseguir con las investigaciones tendientes a profundizar la participación de WNK3 en las respuestas al estrés osmótico en varios tipos celulares.

Efecto de las isoformas de WNK3 sobre la actividad de los CEN de la familia SLC12

Los estudios de la WNK se han desarrollado muy recientemente y prácticamente toda la información acerca de sus funciones, incluyendo modulación de la actividad de vías de transporte iónico, participación en procesos de movilidad, invasión y sobrevivencia celular, proviene de estudios con la isoforma 18a. Otra isoforma descrita es la 18b, que se localiza exclusivamente en el sistema nervioso central. La introducción del exón 22 por empalme alternativo en ambos casos genera cuatro potenciales isoformas de WNK3: 18a, 18a+22, 18b y 18b+22. Como una aproximación inicial al conocimiento de la influencia de las distintas isoformas sobre los procesos biológicos mencionados, es importante investigar las posibles

similitudes o diferencias entre las distintas variantes. Una investigación reciente en ovocitos de *Xenopus* comparó la influencia de las isoformas 18a y 18b+22 sobre la actividad del cotransportador NCC y se encontró que las dos isoformas tienen efectos opuestos sobre la funcionalidad del cotransportador, ya que WNK3 18a incrementa la actividad del cotransportador, en una función dependiente de su actividad catalítica, mientras que la isoforma WNK3 18b+22 tiene efectos opuestos, inhibiendo la actividad del NCC, mientras que la pérdida de la actividad catalítica la acelera (Glover *et al.* 2009). Esta observación resulta interesante en tanto que muestra que la isoforma WNK3 18b+22 se comporta como la mutante generada *in vitro* WNK3-DA, sugiriendo la posibilidad de la existencia en la célula de un mecanismo endógeno para la modulación recíproca de la actividad de los CEN. Una limitante de este trabajo es que el exón 18b parece ser exclusivo del sistema nervioso central (Holden *et al.* 2004), mientras que NCC es un cotransportador de expresión renal, por lo que se trata de dos entidades moleculares que no colocalizan. El interés de nuestra investigación fue determinar el efecto de las isoformas de WNK3 sobre todos los CEN de la familia SLC12, con particular interés en aquellos que presentan la misma distribución tisular.

Los resultados de este trabajo (Cruz-Rangel *et al.* 2011) mostraron que las cuatro isoformas de WNK3 tienen esencialmente el mismo efecto sobre el funcionamiento de los CEN, activando aquellos que se encargan de internalizar Cl^- (NCC y NKCC1/2) e inactivando a los KCCs. Las variantes catalíticamente inactivas muestran el efecto contrario, es decir, inactivan a NCC y a NKCC1/2, mientras que activan a los KCCs. Si bien, la magnitud de los efectos de activación e inactivación varía de acuerdo a la isoforma de WNK3, todas ellas, incluso la isoforma 18b+22 presentan un comportamiento similar sobre el NCC. Nuestros resultados entonces, no coinciden con los reportados por Glover *et al.* 2009. Buscando una posible explicación a esta diferencia, puede argumentarse que la cinasa WNK3, al igual que un gran número de proteínas, es susceptible de cambiar su efecto por alteraciones en su estructura primaria. Esta posibilidad fue descartada en nuestra investigación, ya que todas las clonas que se utilizaron en ella fueron totalmente secuenciadas, descartando posibles mutaciones que hubieran podido modificarla. Este tipo de control no aparece en el trabajo de Glover *et al.* 2009.

Si bien las condiciones de nuestros experimentos no dejan duda de la similitud de acciones de las cuatro isoformas de WNK3 sobre la función de los CEN, no puede excluirse que pudieran tener acciones distintas en otros sistemas en los que se ha documentado la influencia de WNK3. Tal es el caso de la regulación de la actividad de canales iónicos como ROMK, TRPV5 y 6, en procesos celulares como apoptosis y transformación neoplásica. Esta variedad de posibilidades, tanto en la presencia de variantes como en los sistemas funcionales sobre los que actúan, representa un área de investigación amplia y de gran interés dentro del tema de las cinasas WNK y en particular la WNK3.

Los resultados obtenidos en los trabajos de investigación que conforman esta tesis, proporcionan evidencia suficiente de que WNK3 regula la actividad de los CEN de cationes acoplados a cloruro, tanto en sistemas de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus* como en un modelo de células de mamífero (HEK293). La trascendencia fisiopatológica de estos resultados va más allá de la regulación del volumen celular, en particular en aquellos sistemas como el nervioso, en el que la regulación de los niveles de Cl^-_i es de una importancia fundamental, tanto en la fisiología de las células nerviosas como en la neuropatología, tal como se describe brevemente a continuación.

En el sistema nervioso, los CEN son indispensables para mantener la excitabilidad neuronal dentro de los límites normales. La liberación de K^+ como resultado de la actividad neuronal, modifica constantemente su concentración extracelular, que sin embargo, demanda una regulación precisa de sus niveles debido a las funciones críticas del K^+ , como son el establecimiento del potencial de reposo de la membrana y la repolarización subsecuente a la generación del impulso nervioso. Los CEN, como el NKCC tienen a su cargo el amortiguar los cambios en los niveles de K^+ a través de su recaptura. A otro nivel en el sistema nervioso, los CEN, modulados por las WNKs tienen una gran importancia en la transmisión GABAérgica. El tipo de respuesta de las neuronas GABAérgicas depende de la $[Cl^-]_i$. La activación del receptor ionotrópico genera hiperpolarización y por tanto una inhibición, cuando induce la entrada de cloruro a favor del gradiente de concentración. Cuando los niveles de cloruro extracelular son

mayores, como ocurre en etapas tempranas embrionarias y posnatales, la $[Cl^-]_i$ se encuentra por arriba del potencial de equilibrio, y la activación del receptor entonces genera la salida de Cl^- y la despolarización. Es posible entonces, que las variaciones en la expresión funcional de los cotransportadores NKCC1 y KCC2, determinen los gradientes de Cl^- y la respuesta correspondiente. Estudios de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica muestran la expresión de WNK3 en el soma de neuronas GABAérgicas fortaleciendo su papel en la regulación de la neurotransmisión a cargo del GABA (Kahle *et al.* 2005).

En relación con las patologías, en procesos de isquemia y trauma las concentraciones de K^+ extracelular llegan a alcanzar niveles muy altos hasta de 80 mM, lo cual pone en peligro la excitabilidad neuronal y aún más la supervivencia de las células nerviosas. Se ha documentado el papel clave del cotransportador NKCC1 presente en células gliales de la zona de la penumbra, que tiene a su cargo la recaptura del K^+ y el restablecimiento de niveles fisiológicos del K^+ extracelular (Pasantes-Morales y Vazquez-Juarez 2012) Otro transportador de esta familia, el KCC2, participa también en condiciones extremas de incremento extracelular de K^+ en las que los gradientes iónicos permiten que la operación del transportador ocurra en el sentido de su recaptura (Macaulay y Zeuthen 2012). Durante la encefalopatía hepática, los cotransportadores pueden estar participando, por una parte cuando los niveles elevados de NH_4^+ incrementan la actividad del NKCC1 contribuyendo al edema cerebral asociado a esta patología (Pasantes-Morales y Vazquez-Juarez 2012) y por otra parte, se ha sugerido que los KCCs son capaces de transportar NH_4^+ (Liu *et al.* 2003; Williams y Payne 2004) pudiendo contribuir a exacerbar el detonante de la patología que es la acumulación de NH_4^+ en la célula.

La actividad epileptiforme así como el desarrollo de esquizofrenia han sido atribuidos en parte a alteraciones en los patrones de expresión de NKCC1 y KCC2, y por tanto en los gradientes de Cl^- , generando actividad aberrante de la neurotransmisión GABAérgica (Munoz *et al.* 2007; Munoz *et al.* 2007; Kalkman 2011).

Todas estas evidencias que subrayan la importancia de los CEN en la fisiología y patología del sistema nervioso, junto con los resultados que se van reconociendo a cerca de la capacidad de WNK3 de modular la actividad de los cotransportadores de la familia SLC12 enfatizan la importancia de investigar su participación en la fisiología normal del sistema nervioso así como en el desarrollo de eventos clínicos y síndromes neurológicos.

VIII. CONCLUSIONES

Este trabajo de investigación presenta una visión integrativa de la participación de WNK3 en los mecanismos de recuperación del volumen frente a condiciones anisotónicas. Las observaciones más importantes son puntualizadas a continuación:

- La cinasa WNK3 es un elemento de la señalización que regula la entrada y salida de Cl^- mediante los CEN durante la regulación del volumen celular.
- WNK3 incrementa el funcionamiento de NKCC y previene la activación de los KCCs independientemente del cambio osmótico. La ausencia de actividad cinasa de WNK3 (WNK3-DA) tiene el efecto opuesto, incrementando la actividad de los KCCs desde la condición de isotonicidad. Estos efectos son debidos presumiblemente a la regulación del estado de fosforilación de los cotransportadores por WNK3.

La pérdida de la actividad catalítica de WNK3 incrementa el funcionamiento de NKCC mediante un mecanismo complejo aún desconocido, que probablemente implique a la $[\text{Cl}^-]_i$.

- La influencia de WNK3 sobre la actividad de los CEN conduce a la regulación de los niveles intracelulares de Cl^- : WNK3 incrementa la $[\text{Cl}^-]_i$ mientras que en ausencia de la actividad catalítica la $[\text{Cl}^-]_i$ se reduce.
- La acción de la WNK3 regulando la $[\text{Cl}^-]_i$ puede ser relevante para fenómenos como la adhesión de células tumorales y la excitabilidad neuronal en los sistemas GABAérgicos.

IX. REFERENCIAS

- Alexander, RT y Grinstein S (2006). "Na⁺/H⁺ exchangers and the regulation of volume." *Acta Physiol (Oxf)* 187(1-2): 159-167.
- Anselmo, AN, Earnest S, Chen W, Juang YC, Kim SC, Zhao Y y Cobb MH (2006). "WNK1 and OSR1 regulate the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in HeLa cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29): 10883-10888.
- Arreola, J, Melvin JE y Begenisich T (1995). "Volume-activated chloride channels in rat parotid acinar cells." *J Physiol* 484 (Pt 3): 677-687.
- Bagnasco, SM, Uchida S, Balaban RS, Kador PF y Burg MB (1987). "Induction of aldose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(6): 1718-1720.
- Banderali, U y Roy G (1992). "Anion channels for amino acids in MDCK cells." *Am J Physiol* 263(6 Pt 1): C1200-1207.
- Bergeron, MJ, Gagnon E, Wallendorff B, Lapointe JY y Isenring P (2003). "Ammonium transport and pH regulation by K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporters." *Am J Physiol Renal Physiol* 285(1): F68-78.
- Biwarsi, J y Verkman AS (1991). "Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride." *Biochemistry* 30(32): 7879-7883.
- Boese, SH, Wehner F y Kinne RK (1996). "Taurine permeation through swelling-activated anion conductance in rat IMCD cells in primary culture." *Am J Physiol* 271(3 Pt 2): F498-507.
- Boettger, T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, Faulhaber J, Ehmke H, Pfeffer C, Scheel O, Lemcke B, Horst J, Leuwer R, Pape HC, Volkl H, Hubner CA y Jentsch TJ (2003). "Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold." *EMBO J* 22(20): 5422-5434.
- Bowens, NH, Dohare P, Kuo YH y Mongin AA (2012). "DCPIB, the Proposed Selective Blocker of Volume-Regulated Anion Channels, Inhibits Several Glutamate Transport Pathways in Glial Cells." *Mol Pharmacol*.
- Burg, MB, Ferraris JD y Dmitrieva NI (2007). "Cellular response to hyperosmotic stresses." *Physiol Rev* 87(4): 1441-1474.
- Cabantchik, ZI y Greger R (1992). "Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes." *Am J Physiol* 262(4 Pt 1): C803-827.
- Cowley, BD, Jr., Ferraris JD, Carper D y Burg MB (1990). "In vivo osmoregulation of aldose reductase mRNA, protein, and sorbitol in renal medulla." *Am J Physiol* 258(1 Pt 2): F154-161.

- Cruz-Rangel, S, Gamba G, Ramos-Mandujano G y Pasantés-Morales H (2012). "Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells." *Pflugers Arch* 464(3): 317-330.
- Cruz-Rangel, S, Melo Z, Vazquez N, Meade P, Bobadilla NA, Pasantés-Morales H, Gamba G y Mercado A (2011). "Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters." *Am J Physiol Cell Physiol* 301(3): C601-608.
- Culliford, SJ, Borg JJ, O'Brien MJ y Kozłowski RZ (2004). "Differential effects of pyrethroids on volume-sensitive anion and organic osmolyte pathways." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31(3): 134-144.
- Cha, SK y Huang CL (2010). "WNK4 kinase stimulates caveola-mediated endocytosis of TRPV5 amplifying the dynamic range of regulation of the channel by protein kinase C." *J Biol Chem* 285(9): 6604-6611.
- Chung, WY, Park HW, Heo DK, Kim KH, Lee MG y Kim JY (2011). "WNK4 kinase negatively regulates the surface expression of muscarinic M3 receptor." *Cell Signal* 23(3): 566-571.
- Darman, RB y Forbush B (2002). "A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1." *J Biol Chem* 277(40): 37542-37550.
- de La Paz, LD, Lezama R, Torres-Marquez ME y Pasantés-Morales H (2002). "Tyrosine kinases and amino acid efflux under hyposmotic and ischaemic conditions in the chicken retina." *Pflugers Arch* 445(1): 87-96.
- de Los Heros, P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, Mount DB, Lifton RP, Hebert SC y Gamba G (2006). "WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(6): 1976-1981.
- Decher, N, Lang HJ, Nilius B, Bruggemann A, Busch AE y Steinmeyer K (2001). "DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration." *Br J Pharmacol* 134(7): 1467-1479.
- Denker, SP y Barber DL (2002). "Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1." *J Cell Biol* 159(6): 1087-1096.
- Denker, SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H y Barber DL (2000). "Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation." *Mol Cell* 6(6): 1425-1436.
- Dowd, BF y Forbush B (2003). "PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1)." *J Biol Chem* 278(30): 27347-27353.
- Dube, L, Parent L y Sauve R (1990). "Hypotonic shock activates a maxi K⁺ channel in primary cultured proximal tubule cells." *Am J Physiol* 259(2 Pt 2): F348-356.

- Ernest, NJ, Weaver AK, Van Duyn LB y Sontheimer HW (2005). "Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 288(6): C1451-1460.
- Felipe, A, Snyders DJ, Deal KK y Tamkun MM (1993). "Influence of cloned voltage-gated K⁺ channel expression on alanine transport, Rb⁺ uptake, and cell volume." *Am J Physiol* 265(5 Pt 1): C1230-1238.
- Fernandez-Fernandez, JM, Nobles M, Currid A, Vazquez E y Valverde MA (2002). "Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(6): C1705-1714.
- Ferraris, JD y Burg MB (2006). "Tonicity-dependent regulation of osmoprotective genes in mammalian cells." *Contrib Nephrol* 152: 125-141.
- Franco, R, Torres-Marquez ME y Pasantes-Morales H (2001). "Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices." *Pflugers Arch* 442(5): 791-800.
- Friedrich, B, Matskevich I y Lang F (2006). "Cell volume regulatory mechanisms." *Contrib Nephrol* 152: 1-8.
- Galiotta, LJ, Falzoni S, Di Virgilio F, Romeo G y Zegarra-Moran O (1997). "Characterization of volume-sensitive taurine- and Cl⁻-permeable channels." *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): C57-66.
- Galiotta, LJ, Romeo G y Zegarra-Moran O (1996). "Volume regulatory taurine release in human tracheal 9HTEo- and multidrug resistant 9HTEo-/Dx cells." *Am J Physiol* 271(3 Pt 1): C728-735.
- Gamba, G (2005). "Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters." *Physiol Rev* 85(2): 423-493.
- Garzon-Muvdi, T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, Delpire E y Gamba G (2007). "WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters." *Am J Physiol Renal Physiol* 292(4): F1197-1207.
- Gimenez, I (2006). "Molecular mechanisms and regulation of furosemide-sensitive Na-K-Cl cotransporters." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15(5): 517-523.
- Gimenez, I y Forbush B (2005). "Regulatory phosphorylation sites in the NH₂ terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2)." *Am J Physiol Renal Physiol* 289(6): F1341-1345.
- Glover, M, Zuber AM y O'Shaughnessy KM (2009). "Renal and brain isoforms of WNK3 have opposite effects on NCCT expression." *J Am Soc Nephrol* 20(6): 1314-1322.
- Grant, AC, Thomson J, Zammit VA y Shennan DB (2000). "Volume-sensitive amino acid efflux from a pancreatic beta-cell line." *Mol Cell Endocrinol* 162(1-2): 203-210.
- Greger, R, Heitzmann D, Hug MJ, Hoffmann EK y Bleich M (1999). "The Na⁺2Cl⁻-K⁺ cotransporter in the rectal gland of *Squalus acanthias* is activated by cell shrinkage." *Pflugers Arch* 438(2): 165-176.

- Grissmer, S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD y Chandy KG (1994). "Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines." *Mol Pharmacol* 45(6): 1227-1234.
- Grunnet, M, Jespersen T, MacAulay N, Jorgensen NK, Schmitt N, Pongs O, Olesen SP y Klaerke DA (2003). "KCNQ1 channels sense small changes in cell volume." *J Physiol* 549(Pt 2): 419-427.
- Haas, BR, Cuddapah VA, Watkins S, Rohn KJ, Dy TE y Sontheimer H (2011). "With-No-Lysine Kinase 3 (WNK3) stimulates glioma invasion by regulating cell volume." *Am J Physiol Cell Physiol* 301(5): C1150-1160.
- Hall, JA, Kirk J, Potts JR, Rae C y Kirk K (1996). "Anion channel blockers inhibit swelling-activated anion, cation, and nonelectrolyte transport in HeLa cells." *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): C579-588.
- Hayashi, H, Szaszi K y Grinstein S (2002). "Multiple modes of regulation of Na⁺/H⁺ exchangers." *Ann N Y Acad Sci* 976: 248-258.
- Hebert, SC, Mount DB y Gamba G (2004). "Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family." *Pflugers Arch* 447(5): 580-593.
- Heise, CJ, Xu BE, Deaton SL, Cha SK, Cheng CJ, Earnest S, Sengupta S, Juang YC, Stippec S, Xu Y, Zhao Y, Huang CL y Cobb MH (2010). "Serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK) 1 and the epithelial sodium channel are regulated by multiple with no lysine (WNK) family members." *J Biol Chem* 285(33): 25161-25167.
- Helix, N, Strobaek D, Dahl BH y Christophersen P (2003). "Inhibition of the endogenous volume-regulated anion channel (VRAC) in HEK293 cells by acidic di-aryl-ureas." *J Membr Biol* 196(2): 83-94.
- Hernandez-Carballo, CY, De Santiago-Castillo JA, Rosales-Saavedra T, Perez-Cornejo P y Arreola J (2010). "Control of volume-sensitive chloride channel inactivation by the coupled action of intracellular chloride and extracellular protons." *Pflugers Arch* 460(3): 633-644.
- Hisamoto, N, Moriguchi T, Urushiyama S, Mitani S, Shibuya H y Matsumoto K (2008). "Caenorhabditis elegans WNK-STE20 pathway regulates tube formation by modulating CIC channel activity." *EMBO Rep* 9(1): 70-75.
- Hoffmann, EK y Dunham PB (1995). "Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation." *Int Rev Cytol* 161: 173-262.
- Hoffmann, EK, Lambert IH y Pedersen SF (2009). "Physiology of cell volume regulation in vertebrates." *Physiol Rev* 89(1): 193-277.
- Hoffmann, EK y Pedersen SF (2011). "Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways." *Acta Physiol (Oxf)* 202(3): 465-485.

- Holden, S, Cox J y Raymond FL (2004). "Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3)." *Gene* 335: 109-119.
- Hong, C, Moorefield KS, Jun P, Aldape KD, Kharbanda S, Phillips HS y Costello JF (2007). "Epigenome scans and cancer genome sequencing converge on WNK2, a kinase-independent suppressor of cell growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26): 10974-10979.
- Hougaard, C, Klaerke DA, Hoffmann EK, Olesen SP y Jorgensen NK (2004). "Modulation of KCNQ4 channel activity by changes in cell volume." *Biochim Biophys Acta* 1660(1-2): 1-6.
- Isenring, P, Jacoby SC, Payne JA y Forbush B, 3rd (1998). "Comparison of Na-K-Cl cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na-L-Cl cotransporter." *J Biol Chem* 273(18): 11295-11301.
- Jackson, PS y Strange K (1993). "Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux." *Am J Physiol* 265(6 Pt 1): C1489-1500.
- Jackson, PS y Strange K (1995). "Characterization of the voltage-dependent properties of a volume-sensitive anion conductance." *J Gen Physiol* 105(5): 661-676.
- Jensen, HS, Callo K, Jespersen T, Jensen BS y Olesen SP (2005). "The KCNQ5 potassium channel from mouse: a broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes." *Brain Res Mol Brain Res* 139(1): 52-62.
- Jiang, Y, Ferguson WB y Peng JB (2007). "WNK4 enhances TRPV5-mediated calcium transport: potential role in hypercalciuria of familial hyperkalemic hypertension caused by gene mutation of WNK4." *Am J Physiol Renal Physiol* 292(2): F545-554.
- Jun, P, Hong C, Lal A, Wong JM, McDermott MW, Bollen AW, Plass C, Held WA, Smiraglia DJ y Costello JF (2009). "Epigenetic silencing of the kinase tumor suppressor WNK2 is tumor-type and tumor-grade specific." *Neuro Oncol* 11(4): 414-422.
- Junankar, PR y Kirk K (2000). "Organic osmolyte channels: a comparative view." *Cell Physiol Biochem* 10(5-6): 355-360.
- Kahle, KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS y Lifton RP (2004). "WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2064-2069.
- Kahle, KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I y Lifton RP (2005). "WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(46): 16783-16788.
- Kahle, KT, Rinehart J y Lifton RP (2010). "Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases." *Biochim Biophys Acta* 1802(12): 1150-1158.
- Kahle, KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC y Lifton RP (2003). "WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion." *Nat Genet* 35(4): 372-376.

- Kalkman, HO (2011). "Alterations in the expression of neuronal chloride transporters may contribute to schizophrenia." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(2): 410-414.
- Khan, SH, Ahmad N, Ahmad F y Kumar R (2010). "Naturally occurring organic osmolytes: from cell physiology to disease prevention." *IUBMB Life* 62(12): 891-895.
- Krapivinsky, GB, Ackerman MJ, Gordon EA, Krapivinsky LD y Clapham DE (1994). "Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pClIn." *Cell* 76(3): 439-448.
- Kregenow, FM (1971). "The response of duck erythrocytes to nonhemolytic hypotonic media. Evidence for a volume-controlling mechanism." *J Gen Physiol* 58(4): 372-395.
- Kubo, M y Okada Y (1992). "Volume-regulatory Cl⁻ channel currents in cultured human epithelial cells." *J Physiol* 456: 351-371.
- Lambert, IH y Hoffmann EK (1994). "Cell swelling activates separate taurine and chloride channels in Ehrlich mouse ascites tumor cells." *J Membr Biol* 142(3): 289-298.
- Lambert, IH, Hoffmann EK y Pedersen SF (2008). "Cell volume regulation: physiology and pathophysiology." *Acta Physiol (Oxf)* 194(4): 255-282.
- Lang, F (2007). "Mechanisms and significance of cell volume regulation." *J Am Coll Nutr* 26(5 Suppl): 613S-623S.
- Lang, F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E y Haussinger D (1998). "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms." *Physiol Rev* 78(1): 247-306.
- Lauf, PK (1981). "A chemically unmasked, chloride dependent K⁺ transport in low K⁺ sheep red cells: genetic and evolutionary aspects." *Prog Clin Biol Res* 56: 13-34.
- Lauf, PK (1983). "Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: I. Dependence on chloride and external ions." *J Membr Biol* 73(3): 237-246.
- Lazrak, A, Liu Z y Huang CL (2006). "Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1615-1620.
- Lee, BH, Min X, Heise CJ, Xu BE, Chen S, Shu H, Luby-Phelps K, Goldsmith EJ y Cobb MH (2004). "WNK1 phosphorylates synaptotagmin 2 and modulates its membrane binding." *Mol Cell* 15(5): 741-751.
- Leng, Q, Kahle KT, Rinehart J, MacGregor GG, Wilson FH, Canessa CM, Lifton RP y Hebert SC (2006). "WNK3, a kinase related to genes mutated in hereditary hypertension with hyperkalaemia, regulates the K⁺ channel ROMK1 (Kir1.1)." *J Physiol* 571(Pt 2): 275-286.
- Lezama, R, Ortega A, Ordaz B y Pasantes-Morales H (2005). "Hyposmolarity-induced ErbB4 phosphorylation and its influence on the non-receptor tyrosine kinase network response in cultured cerebellar granule neurons." *J Neurochem* 93(5): 1189-1198.

- Liu, X, Titz S, Lewen A y Misgeld U (2003). "KCC2 mediates NH₄⁺ uptake in cultured rat brain neurons." *J Neurophysiol* 90(4): 2785-2790.
- Macaulay, N y Zeuthen T (2012). "Glial K⁽⁺⁾ clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps." *Neurochem Res* 37(11): 2299-2309.
- MacLeod, RJ y Hamilton JR (1999). "Increases in intracellular pH and Ca⁽²⁺⁾ are essential for K⁽⁺⁾ channel activation after modest 'physiological' swelling in villus epithelial cells." *J Membr Biol* 172(1): 47-58.
- Maingret, F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M y Honore E (1999). "TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel." *J Biol Chem* 274(3): 1381-1387.
- Maingret, F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M y Honore E (2000). "Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁽⁺⁾ channels TREK-1 and TRAAK." *J Biol Chem* 275(14): 10128-10133.
- McManus, M, Fischbarg J, Sun A, Hebert S y Strange K (1993). "Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and membrane transport processes." *Am J Physiol* 265(2 Pt 1): C562-570.
- Moniz, S, Verissimo F, Matos P, Brazao R, Silva E, Kotelevets L, Chastre E, Gespach C y Jordan P (2007). "Protein kinase WNK2 inhibits cell proliferation by negatively modulating the activation of MEK1/ERK1/2." *Oncogene* 26(41): 6071-6081.
- Munoz, A, Mendez P, DeFelipe J y Alvarez-Leefmans FJ (2007). "Cation-chloride cotransporters and GABA-ergic innervation in the human epileptic hippocampus." *Epilepsia* 48(4): 663-673.
- Niemeyer, MI, Cid LP, Barros LF y Sepulveda FV (2001). "Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume." *J Biol Chem* 276(46): 43166-43174.
- Nilius, B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulos V y Droogmans G (1997). "Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells." *Prog Biophys Mol Biol* 68(1): 69-119.
- Oh, E, Heise CJ, English JM, Cobb MH y Thurmond DC (2007). "WNK1 is a novel regulator of Munc18c-syntaxin 4 complex formation in soluble NSF attachment protein receptor (SNARE)-mediated vesicle exocytosis." *J Biol Chem* 282(45): 32613-32622.
- Ohta, A, Yang SS, Rai T, Chiga M, Sasaki S y Uchida S (2006). "Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells." *Biochem Biophys Res Commun* 349(2): 804-808.
- Oiki, S, Kubo M y Okada Y (1994). "Mg²⁺ and ATP-dependence of volume-sensitive Cl⁻ channels in human epithelial cells." *Jpn J Physiol* 44 Suppl 2: S77-79.
- Okada, Y (1997). "Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor." *Am J Physiol* 273(3 Pt 1): C755-789.

- Okada, Y (2006). "Cell volume-sensitive chloride channels: phenotypic properties and molecular identity." *Contrib Nephrol* 152: 9-24.
- Okada, Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J y Morishima S (2001). "Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD)." *J Physiol* 532(Pt 1): 3-16.
- Olson, JE y Li GZ (2000). "Osmotic sensitivity of taurine release from hippocampal neuronal and glial cells." *Adv Exp Med Biol* 483: 213-218.
- Orlov, SN y Novikov KN (1996). "[The regulation of cell volume: the mechanisms, coupled cellular reactions and pathophysiological significance]." *Fiziol Zh Im I M Sechenova* 82(8-9): 1-15.
- Pacheco-Alvarez, D, Cristobal PS, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Munoz E, Diaz A, Juarez ME, Gimenez I y Gamba G (2006). "The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion." *J Biol Chem* 281(39): 28755-28763.
- Pacheco-Alvarez, D, Vazquez N, Castaneda-Bueno M, de-Los-Heros P, Cortes-Gonzalez C, Moreno E, Meade P, Bobadilla NA y Gamba G (2012). "WNK3-SPAK interaction is required for the modulation of NCC and other members of the SLC12 family." *Cell Physiol Biochem* 29(1-2): 291-302.
- Papakonstanti, EA, Vardaki EA y Stournaras C (2000). "Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation." *Cell Physiol Biochem* 10(5-6): 257-264.
- Pasantes-Morales, H, Cardin V y Tuz K (2000). "Signaling events during swelling and regulatory volume decrease." *Neurochem Res* 25(9-10): 1301-1314.
- Pasantes-Morales, H, Lezama R y Franco R (2004). "Are membrane tyrosine kinase receptors involved in osmotransduction?" *Adv Exp Med Biol* 559: 301-312.
- Pasantes-Morales, H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G y Tuz KL (2006). "Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality." *Am J Med* 119(7 Suppl 1): S4-11.
- Pasantes-Morales, H y Morales Mulia S (2000). "Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels." *Nephron* 86(4): 414-427.
- Pasantes-Morales, H y Vazquez-Juarez E (2012). "Transporters and channels in cytotoxic astrocyte swelling." *Neurochem Res* 37(11): 2379-2387.
- Paulmichl, M, Li Y, Wickman K, Ackerman M, Peralta E y Clapham D (1992). "New mammalian chloride channel identified by expression cloning." *Nature* 356(6366): 238-241.
- Pedersen, SF, Hoffmann EK y Mills JW (2001). "The cytoskeleton and cell volume regulation." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130(3): 385-399.
- Pedersen, SF, Kapus A y Hoffmann EK (2011). "Osmosensory mechanisms in cellular and systemic volume regulation." *J Am Soc Nephrol* 22(9): 1587-1597.

- Pedersen, SF, Prenen J, Droogmans G, Hoffmann EK y Nilius B (1998). "Separate swelling- and Ca²⁺-activated anion currents in Ehrlich ascites tumor cells." *J Membr Biol* 163(2): 97-110.
- Piechotta, K, Lu J y Delpire E (2002). "Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1)." *J Biol Chem* 277(52): 50812-50819.
- Ponce-Coria, J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de Los Heros P, Juarez P, Munoz E, Michel G, Bobadilla NA, Gimenez I, Lifton RP, Hebert SC y Gamba G (2008). "Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(24): 8458-8463.
- Rinehart, J, Kahle KT, de Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G y Lifton RP (2005). "WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(46): 16777-16782.
- Rinehart, J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, Risinger M, Pan W, Wu D, Colangelo CM, Forbush B, Joiner CH, Gulcicek EE, Gallagher PG y Lifton RP (2009). "Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity." *Cell* 138(3): 525-536.
- Rinehart, J, Vazquez N, Kahle KT, Hodson CA, Ring AM, Gulcicek EE, Louvi A, Bobadilla NA, Gamba G y Lifton RP (2011). "WNK2 kinase is a novel regulator of essential neuronal cation-chloride cotransporters." *J Biol Chem* 286(34): 30171-30180.
- Ring, AM, Cheng SX, Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, Lalioti MD, Volkman HM, Wilson FH, Hebert SC y Lifton RP (2007). "WNK4 regulates activity of the epithelial Na⁺ channel in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10): 4020-4024.
- Riquelme, G, Sepulveda FV, Jorgensen F, Pedersen S y Hoffmann EK (1998). "Swelling-activated potassium currents of Ehrlich ascites tumour cells." *Biochim Biophys Acta* 1371(1): 101-106.
- Roman, R, Feranchak AP, Troetsch M, Dunkelberg JC, Kilic G, Schlenker T, Schaack J y Fitz JG (2002). "Molecular characterization of volume-sensitive SK(Ca) channels in human liver cell lines." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(1): G116-122.
- Rust, MB, Alper SL, Rudhard Y, Shmukler BE, Vicente R, Brugnara C, Trudel M, Jentsch TJ y Hubner CA (2007). "Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice." *J Clin Invest* 117(6): 1708-1717.
- Sabirov, RZ, Prenen J, Droogmans G y Nilius B (2000). "Extra- and intracellular proton-binding sites of volume-regulated anion channels." *J Membr Biol* 177(1): 13-22.
- Sabirov, RZ, Prenen J, Tomita T, Droogmans G y Nilius B (2000). "Reduction of ionic strength activates single volume-regulated anion channels (VRAC) in endothelial cells." *Pflugers Arch* 439(3): 315-320.

- Sengupta, S, Tu SW, Wedin K, Earnest S, Stippec S, Luby-Phelps K y Cobb MH (2012). "Interactions with WNK (With No Lysine) Family Members Regulate Oxidative Stress Response 1 and Ion Co-transporter Activity." *J Biol Chem* 287(45): 37868-37879.
- Shaharabany, M, Holtzman EJ, Mayan H, Hirschberg K, Seger R y Farfel Z (2008). "Distinct pathways for the involvement of WNK4 in the signaling of hypertonicity and EGF." *FEBS J* 275(8): 1631-1642.
- Shekarabi, M, Girard N, Riviere JB, Dion P, Houle M, Toulouse A, Lafreniere RG, Vercauteren F, Hince P, Laganier J, Rochefort D, Faivre L, Samuels M y Rouleau GA (2008). "Mutations in the nervous system--specific HSN2 exon of WNK1 cause hereditary sensory neuropathy type II." *J Clin Invest* 118(7): 2496-2505.
- Shennan, DB, McNeillie SA y Curran DE (1994). "The effect of a hyposmotic shock on amino acid efflux from lactating rat mammary tissue: stimulation of taurine and glycine efflux via a pathway distinct from anion exchange and volume-activated anion channels." *Exp Physiol* 79(5): 797-808.
- Shennan, DB, Thomson J, Davidson J y Gow IF (2006). "Properties of volume-activated taurine efflux from human breast cancer cells." *Adv Exp Med Biol* 583: 109-116.
- Sterling, D y Casey JR (2002). "Bicarbonate transport proteins." *Biochem Cell Biol* 80(5): 483-497.
- Stipanuk, MH (1986). "Metabolism of sulfur-containing amino acids." *Annu Rev Nutr* 6: 179-209.
- Strange, K, Emma F y Jackson PS (1996). "Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels." *Am J Physiol* 270(3 Pt 1): C711-730.
- Su, G, Kintner DB, Flagella M, Shull GE y Sun D (2002). "Astrocytes from Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release." *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5): C1147-1160.
- Sun, X, Gao L, Yu RK y Zeng G (2006). "Down-regulation of WNK1 protein kinase in neural progenitor cells suppresses cell proliferation and migration." *J Neurochem* 99(4): 1114-1121.
- Taouil, K y Hannaert P (1999). "Evidence for the involvement of K⁺ channels and K⁽⁺⁾-Cl⁻ cotransport in the regulatory volume decrease of newborn rat cardiomyocytes." *Pflugers Arch* 439(1-2): 56-66.
- Tatum, R, Zhang Y, Lu Q, Kim K, Jeansonne BG y Chen YH (2007). "WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl⁽⁻⁾ permeability." *FEBS Lett* 581(20): 3887-3891.
- Ternovsky, VI, Okada Y y Sabirov RZ (2004). "Sizing the pore of the volume-sensitive anion channel by differential polymer partitioning." *FEBS Lett* 576(3): 433-436.
- Thastrup, JO, Rafiqi FH, Vitari AC, Pozo-Guisado E, Deak M, Mehellou Y y Alessi DR (2012). "SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation." *Biochem J* 441(1): 325-337.
- Thornhill, WB y Laris PC (1984). "KCl loss and cell shrinkage in the Ehrlich ascites tumor cell induced by hypotonic media, 2-deoxyglucose and propranolol." *Biochim Biophys Acta* 773(2): 207-218.

- Tomassen, SF, Fekkes D, de Jonge HR y Tilly BC (2004). "Osmotic swelling-provoked release of organic osmolytes in human intestinal epithelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(6): C1417-1422.
- Tsumura, T, Oiki S, Ueda S, Okuma M y Okada Y (1996). "Sensitivity of volume-sensitive Cl⁻ conductance in human epithelial cells to extracellular nucleotides." *Am J Physiol* 271(6 Pt 1): C1872-1878.
- Tuz, K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O y Pasantes-Morales H (2001). "Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons." *J Neurochem* 79(1): 143-151.
- Ullrich, KJ (1976). "Renal tubular mechanisms of organic solute transport." *Kidney Int* 9(2): 134-148.
- Urbach, V, Leguen I, O'Kelly I y Harvey BJ (1999). "Mechanosensitive calcium entry and mobilization in renal A6 cells." *J Membr Biol* 168(1): 29-37.
- Valverde, MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC y Higgins CF (1992). "Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein." *Nature* 355(6363): 830-833.
- Verbalis, JG y Gullans SR (1991). "Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats." *Brain Res* 567(2): 274-282.
- Verissimo, F, Silva E, Morris JD, Pepperkok R y Jordan P (2006). "Protein kinase WNK3 increases cell survival in a caspase-3-dependent pathway." *Oncogene* 25(30): 4172-4182.
- Vitari, AC, Deak M, Morrice NA y Alessi DR (2005). "The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases." *Biochem J* 391(Pt 1): 17-24.
- Waldegger, S, Steuer S, Risler T, Heidland A, Capasso G, Massry S y Lang F (1998). "Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation." *Nephrol Dial Transplant* 13(4): 867-874.
- Wang, GL, Wang GX, Yamamoto S, Ye L, Baxter H, Hume JR y Duan D (2005). "Molecular mechanisms of regulation of fast-inactivating voltage-dependent transient outward K⁺ current in mouse heart by cell volume changes." *J Physiol* 568(Pt 2): 423-443.
- Wang, J, Morishima S y Okada Y (2003). "IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 284(1): C77-84.
- Wehner, F (2006). "Cell volume-regulated cation channels." *Contrib Nephrol* 152: 25-53.
- Wehner, F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E y Kinne RK (2003). "Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148: 1-80.
- Wilson, FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X y Lifton RP (2001). "Human hypertension caused by mutations in WNK kinases." *Science* 293(5532): 1107-1112.

- Williams, JR y Payne JA (2004). "Cation transport by the neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2: thermodynamics and kinetics of alternate transport modes." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4): C919-931.
- Xu, B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ y Cobb MH (2000). "WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II." *J Biol Chem* 275(22): 16795-16801.
- Xu, BE, Stippec S, Lenertz L, Lee BH, Zhang W, Lee YK y Cobb MH (2004). "WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism." *J Biol Chem* 279(9): 7826-7831.
- Yang, CL, Liu X, Paliege A, Zhu X, Bachmann S, Dawson DC y Ellison DH (2007). "WNK1 and WNK4 modulate CFTR activity." *Biochem Biophys Res Commun* 353(3): 535-540.
- Yang, H, Yang JC y Guan YF (2010). "[Response of renal medullary cells to hypertonic stress]." *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 41(4): 287-291.
- Zhang, W, Na T y Peng JB (2008). "WNK3 positively regulates epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6 via a kinase-dependent pathway." *Am J Physiol Renal Physiol* 295(5): F1472-1484.
- Zhuang, J, Zhang X, Wang D, Li J, Zhou B, Shi Z, Gu D, Denson DD, Eaton DC y Cai H (2011). "WNK4 kinase inhibits Maxi K channel activity by a kinase-dependent mechanism." *Am J Physiol Renal Physiol* 301(2): F410-419.

X. APENDICE I

Pflugers Arch - Eur J Physiol (2012) 464:317–330
DOI 10.1007/s00424-012-1137-4

SIGNALING AND CELL PHYSIOLOGY

Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells

Silvia Cruz-Rangel · Gerardo Gamba · Gerardo Ramos-Mandujano · Herminia Pasantes-Morales

Received: 6 June 2012 / Revised: 6 July 2012 / Accepted: 7 July 2012 / Published online: 3 August 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract The involvement of WNK3 (with no lysine [K] kinase) in cell volume regulation evoked by anisotonic conditions was investigated in two modified stable lines of HEK293 cells: WNK3+, overexpressing WNK3 and WNK3-KD expressing a kinase inactive by a punctual mutation (D294A) at the catalytic site. This different WNK3 functional expression modified intracellular Cl⁻ concentration with the following profile: WNK3+>control>WNK3-KD cells. Stimulated with 15 % hypotonic solutions, WNK3+ cells showed less efficient RVD (13.1 %), lower Cl⁻ efflux and decreased (94.5 %) KCC activity. WNK3-KD cells showed 30.1 % more efficient RVD, larger Cl⁻ efflux and 5-fold higher KCC activity, increased since the isotonic condition. Volume-sensitive Cl⁻ currents were similar in controls, WNK3+ cells, and WNK3-KD cells. Taurine efflux was not evoked at H15%. These results show a WNK3 influence on RVD in HEK293 cells via increasing KCC activity. Hypertonic medium induced cell shrinkage and RVI. In both WNK3+ and WNK3-KD cells, RVI and NKCC activity were increased, in WNK3+ cells presumably by enhanced NKCC phosphorylation, and in WNK3-KD

cells via the [Cl⁻]_i reduction induced by the higher KCC activity in characteristic of these cells. These results support the role of WNK3 in modulation of intracellular Cl⁻ concentration, in RVD, and indirectly on RVI, via its effects on KCC and NKCC activity. WNK3 in HEK293 cells is expressed as *puncta* at the intercellular junctions and diffusely at the cytosol, while the inactive kinase was found concentrated at the Golgi area. Cells with inactive WNK3 exhibited a marked change of cell phenotype.

Keywords RVI · RVD · NKCC · KCC · Osmolarity · Kinase · SPAK

Introduction

Each cell lineage has a characteristic volume that is maintained within narrow ranges of variation along the cell life. This ability to maintain a constant volume is present in most cell types and has been preserved through evolution. In terrestrial species, the osmolarity of the external milieu is strictly regulated and most cells are not exposed to changes in external osmolarity. Exceptions are intestinal cells and some cells from the renal system, which are physiologically exposed to broad variations in osmolarity. Adaptive mechanisms for cell volume regulation facing a variation in external osmolarity are based on increasing water fluxes in the necessary direction to restore the osmotic equilibrium. The cell decrease facing hypotonic swelling is known as regulatory volume decrease (RVD), and the cell volume gain after hypertonic shrinkage is the regulatory volume increase (RVI). Volume regulation is an active process which occurs even if the external anisotonic condition persists, and is achieved in most cases by translocation of osmotically active solutes between the extracellular and intracellular compartments, modifying the water potential.

S. Cruz-Rangel · G. Ramos-Mandujano ·
H. Pasantes-Morales (✉)
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad Universitaria, Circuito Exterior,
04510 Mexico, DF, Mexico
e-mail: hpasante@ifc.unam.mx

G. Gamba
Departamento de Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico City, Mexico

G. Gamba
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán,
Mexico City, Mexico

Osmolytes involved are those present in concentrations sufficiently high as to make a significant contribution to water potential. The ions Na^+ , K^+ , and Cl^- , and the organic osmolytes, amino acids, polyalcohols, urea, and creatinine, are the main osmolytes involved in volume regulation, Na^+ and Cl^- for RVI and K^+ and Cl^- for RVD. Cotransporters or/and channels accomplish the osmolyte translocation [14, 31].

The electroneutral *cation-chloride coupled* cotransporters (SLC12A family) involved in volume regulation are the NCC and NKCC1/2 for RVI and KCCs for RVD [9, 42]. Volume-responsive K^+ and Cl^- channels also participate, particularly during RVD. Organic osmolytes are translocated by Na^+ -dependent cotransporters during RVI and by diffusion pathways in RVD [14, 34, 35]. Cell volume sensors and the signaling chains activating the regulatory cotransporters are poorly known. It has been proposed that WNKs may be part of these transduction mechanisms [32]. WNKs are a family of serine-threonine protein kinases widely distributed in mammalian cells and tissues, regulating the activity of ion channels and cotransporters [19, 26, 46]. Four members of the WNK family, WNK1–4, have been identified [18, 19]. WNK1 and WNK4 are responsive to hypertonicity [23, 43, 46, 47] and regulate the activity of the ion cotransporters [18, 19, 46]. WNK1 increases NKCC1 activity [1] and WNK4 decreases the activity of KCCs [8, 10]. WNK3 is of particular interest because it reciprocally regulates the activity of both NKCCs and KCCs. In the heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocytes, WNK3 activates NKCC1, NKCC2, and NCC and inactivates the KCCs [5, 18, 37, 39]. The catalytically inactive version of WNK3 obtained by substitution of the aspartate 294 for alanine (WNK3-D294A) does the opposite: inhibition of NKCCs and activation of KCCs under isotonic conditions, with lower activation by changes in external osmolarity [32]. The known contribution of these transporters on volume regulation, prompted us to investigate the influence of WNK3 on RVD and RVI in a mammalian cell system, the embryonic renal cell line HEK293. For this purpose, two stable transformed cell lines were created that either overexpress the wild-type WNK3 or a catalytically inactive form, the WNK3-D294A. The activity of KCC, the volume-sensitive Cl^- currents, the intracellular Cl^- levels, and RVD were examined in the two cell lines. NKCC1 activity and RVI were also investigated. The cell localization and translocation of WNK3 in response to changes in cell volume were examined.

Materials and methods

Stable cell lines and cell culture

The full-length human WNK3 cDNA was subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1/NT-GFP TOPO

(Invitrogen) with 5' KpnI and 3' NotI restriction sites. WNK3 was fused in frame to the 3' end of the GFP. Site-directed mutagenesis was performed on WNK3 cDNA to generate kinase dead WNK3-KD using the QuikChange Mutagenesis kit (Stratagene). All constructs were verified by automatic DNA sequencing. To generate the stable cell lines, HEK293 cells grown on 35-mm diameter dishes (90% confluence) were transfected with 1 μg of each construct (pCDNA-WNK3, pCDNA-WNK3-KD, or empty vector) using Lipofectamine 2000[®] (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After 24 h, transfected cells were selected in a medium supplemented with 3 mg/ml G418 (Calbiochem, Merck Millipore), and the culture medium was replaced every 36 h maintaining the antibiotic. After 2 weeks, fluorescent single clones were isolated and subcultured in selection media (1 mg/ml G418). The presence of the endogenous and overexpressed WNK3-GFP protein was detected by immunoblotting assay.

HEK293, empty vector (V), overexpressing WNK3 (WNK3+), and WNK3-KD cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% FBS, 50 U/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (all from GIBCO), in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and 95% air at 37 °C. Cells were plated on 35-mm dishes at 1.5×10^5 cells/dish for ^3H -taurine release and Rubidium-86 (^{86}Rb) uptake (American Radiolabeled Chemicals and PerkinElmer, respectively), and at 25×10^3 cells/dish for intracellular Cl^- assays and for electrophysiological recordings. Cells were used after 2–3 days of plating.

Western blot analysis

For immunoblotting assays, cells cultured on 60-mm dishes were washed, and then scraped into lysis buffer containing 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5 mM Na_3VO_4 , and 1 mM 2-glycerophosphate. Cell homogenates were sonicated and clarified by centrifugation for 5 min at $11,000 \times g$ and protein concentration determined by the Bradford method. Then, 80 μg of protein was separated by SDS-PAGE (7.5% acrylamide gel) and transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with TBS-T (Tris-buffered saline/Tween 20; 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 5% (w/v) non-fat dried milk and incubated (1:1,000) overnight at 4 °C, with the rabbit primary antibodies anti-WNK3 (Alpha Diagnostic International), anti-GFP or anti- β actin (Santa Cruz Biotechnology). After further washing, blots were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:7,500; Zymed) for 1 h at room temperature. Chemoluminescent reaction was assayed using ECL[®]-Plus Western Blot Detection Reagents (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations, and bands were visualized with exposition to Kodak BioMax light films (Sigma).

Immunocytochemistry

Cells cultured on round cover glasses (25×10^3 cells in 35-mm dishes) were fixed with 4 % paraformaldehyde (15 min), washed (three times, 5 min each) with PBS+0.1 % BSA, permeabilized/blocked with PBS+0.1 % BSA+10 % goat serum+0.3 % Triton 100 \times , during 1 h, at room temperature. Cover glasses were incubated with the antibodies rabbit anti-WNK3 (1:100, Alpha Diagnostic International), mouse anti-occludin (1:100, Zymed), or mouse anti-golgin-97 (1:60, Molecular Probes) overnight at 4 °C. After incubation, cells were washed and incubated with the secondary antibodies FITC conjugated goat anti-rabbit IgG (1:250, Zymed) or CY5-conjugated goat anti-mouse IgG (1:250, Molecular Probes) at room temperature for 1 h and washed. The coverslips were mounted on glass slides containing 20 μ l Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories). Microphotographs were obtained on a confocal microscope (Olympus FluoView FV1000).

Measurement of changes in cell volume

Cell volume changes in the experimental conditions were measured as the cell volume decrease or increase relative to volume in isotonic conditions. Isotonic medium contained (in mM): 160 NaCl, 5 KCl, 1.17 MgSO₄, 1 CaCl₂, 10 glucose, and 10 HEPES, pH 7.4, with an osmolarity of 350 mOsm. The composition of this medium was made to match the osmolarity of the culture medium (345 \pm 5 mOsm) in which the cells are grown. Osmolarities of media and solutions were determined with a freezing point osmometer (Osmette A, Precision Systems Inc, Natick, MA). Volume measurements were carried out using a large angle light scattering system according to [36]. Cells were cultured on rectangular cover glasses (10 \times 50 mm) at 90 % confluence at the time of experiments. Cover glasses were placed at a 50° angle relative to the incident light in a cuvette with 1 ml of isotonic medium in a Fluoromax-3 Horiba luminescence spectrometer. Cells were excited at 585 nm with an argon arc lamp and light scattering was detected at the same wavelength. Cells were maintained during 100 s in isotonic solution (2 ml). The hypotonic solution (298 mOsm) was obtained by adding to the cuvette 1 ml of a solution containing the reduced NaCl concentration required to reach 298 mOsm, i.e., 15 % hypotonic. The hypertonic (600 mOsm) solution was obtained by addition to the cuvette of 1 ml of the isotonic medium plus 500 mM sorbitol, to reach a final osmolarity of 600 mOsm. Results are expressed as the inverse of the emission signal as light intensity inversely correlates with cell volume, according to the equation I_0/I_t (where I_0 is the emission signal average when basal signal has been reached just before the stimulus; I_t is the emission signal at time t).

Electrophysiological recordings and data analysis

Electrophysiological recording was carried out on cells seeded on 35-mm dishes. Currents were measured with an Axopatch 200 patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices, Ontario, Canada) using the whole-cell patch clamp configuration. All recordings were performed at room temperature (25 °C). Patch electrodes were prepared from 1.5-mm OD, 1.0-mm ID borosilicate glass (World Precision Instruments, FL, USA), and had resistances between 3 and 5 M Ω when filled with the pipette solution. The recorded signal was filtered at 10 kHz with a low-pass Bessel filter and transferred to a computer with the Digidata 1200 interface (Axon Instruments). All recordings were acquired and analyzed with pCLAMP6 software (Axon Instruments). Whole-cell currents were elicited by 300 ms duration voltage steps ranging from -100 to +100 mV in 20 mV increments, from a holding potential of 0 mV. The voltage protocol was carried out every 2 min and the current at 100 mV monitored to insure steady-state recordings. To express currents as current densities, the capacitance of the cell was measured at the beginning of the whole-cell recording by integrating the capacitive current transient. The standard pipette solution contained (in mM): 117.5 CsCl, 20 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 1 EGTA, 0.7 CaCl₂ (approximately 200 nM buffered calcium), 44 mannitol, and 5 Mg ATP, pH 7.4 and 335 mOsm. The bath solution had the following composition (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1.7 MgSO₄, 1 CaCl₂, 5 glucose, 10 HEPES, 50 mannitol, pH 7.4, and 350 mOsm. The hypotonic bath solution (298 mOsm) was prepared by omitting mannitol from the standard bath solution. This procedure did not alter the Cl⁻ reversal potential (0 mV). Solution changes were carried out using a peristaltic pump-based perfusion system. For experiments with blockers, DCPIB (10 μ M; Tocris Bioscience) or DIOA (20 μ M) (Sigma) were added in hypotonic medium after the volume-sensitive currents were developed.

Na⁺-K⁺-2Cl⁻ and K⁺-Cl⁻ cotransporters activity

Bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb uptake assays were used to measure the activity of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in hypotonic (298 mOsm) or hypertonic (600 mOsm) conditions. Cells were pre-incubated for 30 min in a Cl⁻-free medium (in mM: 150 Na⁺ gluconate, 10 K⁺ gluconate, 4.6 Ca²⁺ gluconate, 1 MgSO₄, 5 glucose, and 10 HEPES/Tris, pH 7.4) containing 0.1 mM ouabain (Sigma) and then transferred to the uptake medium (in mM: 160 NaCl, 10 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgSO₄, 5 glucose, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4) containing 0.1 mM ouabain plus 1 μ Ci ⁸⁶Rb/ml for 3 or 15 min. ⁸⁶Rb uptake due only to NKCC activity was calculated by subtraction of the uptake in the presence of 10 μ M bumetanide (Sigma).

K^+ - Cl^- cotransport was assessed by measuring Cl^- -dependent ^{86}Rb uptake under isotonic or hypotonic conditions (350 and 298 mOsm). Cells were pre-incubated in a Na^+ -free, Cl^- -free medium (in mM: 150 *N*-methyl-D-glucamine gluconate, 10 K^+ gluconate, 4.6 Ca^{2+} gluconate, 1 $MgSO_4$, 5 glucose, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4) containing 0.1 mM ouabain, during 30 min. Cells were then transferred to a Na^+ -free medium (in mM: 150 *N*-methyl-D-glucamine- Cl^- , 10 KCl, 1 $CaCl_2$, 1.7 $MgSO_4$, 5 glucose, and 10 HEPES/Tris, pH 7.4) containing 0.1 mM ouabain and ^{86}Rb 1 $\mu Ci/ml$ and uptake proceeded during 10 min. The extracellular Na^+ removal prevents ^{86}Rb uptake by the endogenous NKCC cotransporter. The Cl^- -dependent ^{86}Rb uptake due to KCCs was obtained by subtraction of uptake in Cl^- -free medium (Cl^- substituted by gluconate).

Determination of changes in intracellular Cl^- by epifluorescence

Changes in intracellular Cl^- were measured using the fluorescent Cl^- ion indicator, 6-methoxy-*N*-ethylquinolinium iodide (MEQ). MEQ was placed under a stream of N_2 adding the reducing agent, sodium borohydride (30 μM) to create the cell-permeable form dihydro-MEQ (diH-MEQ). Cells on 35 mm dishes were incubated during 10 min with freshly prepared diH-MEQ (25 μM). After loading, cells were washed and incubated 15 min at 37 °C to obtain a homogeneous intracellular distribution. The diH-MEQ loaded into cells is rapidly reoxidized to the cell-impermeant, Cl^- -sensitive fluorescent MEQ (absorption/emission maximal of 344/440 nm). Fluorescent cells were observed on an epifluorescence microscope Olympus IX71. A peristaltic pump-based perfusion system (1 ml/min) was used to measure the effect of hypotonicity on intracellular Cl^- concentration. Cells were perfused during 5 min with isotonic medium (basal recordings) and then perfused with the hypotonic medium during 15 min. Images of cells were captured every minute using a digital camera, and fluorescence brightness intensities were determined using an Image J software (ImageJ 1.36b NIH, USA). In order to calibrate MEQ fluorescence and estimate intracellular $[Cl^-]_i$ we used the Stern–Volmer equation $F_0/F_{Cl^-} = 1 + K_q [Cl^-]_i$. Amphotericin B (10 μM) was added in all solutions to equilibrate intracellular and extracellular Cl^- concentrations. Briefly, cells were placed in a free- Cl^- isotonic medium (140 mM of K^+ -gluconate and 4.6 mM of Ca^{2+} -gluconate, pH 7.4) by 5 min. Solutions containing three different Cl^- concentrations (20, 40, and 80 mM) were then sequentially added. Finally, the fluorescence was completely quenched by adding a KSCN 160 mM (background fluorescence). The total quenchable signal (F_0) was calculated by subtracting the fluorescence in the presence of KSCN from the fluorescence in the free- Cl^- medium. The ratio of F_0 to the fluorescence in the presence of

increasing $[Cl^-]$ (F_{Cl^-}) is given as F_0/F_{Cl^-} , where F_{Cl^-} is the fluorescence in the presence of a given Cl^- concentration. A plot of F_0/F_{Cl^-} versus $[Cl^-]$ provides a slope, from which the Stern–Volmer constant (K_q) is obtained to determine the Cl^- concentration in each experiment [13].

Results

Generation of stable HEK-293 cells lines overexpressing WNK3 and WNK3-KD

Two cell lines were generated to examine the influence of WNK3 on cell volume regulation. One of these exhibits WNK3 overexpression from a cDNA cloned in pcDNA3.1/NT-GFP vector as described in “Materials and methods”. This cell line is referred as WNK3+. The second cell line contains a cDNA of the catalytically inactive WNK3-D294A. These cells are referred in this study as WNK3-KD cells (from WNK3-kinase dead). A cell line containing the empty vector (V cell line) was used as control.

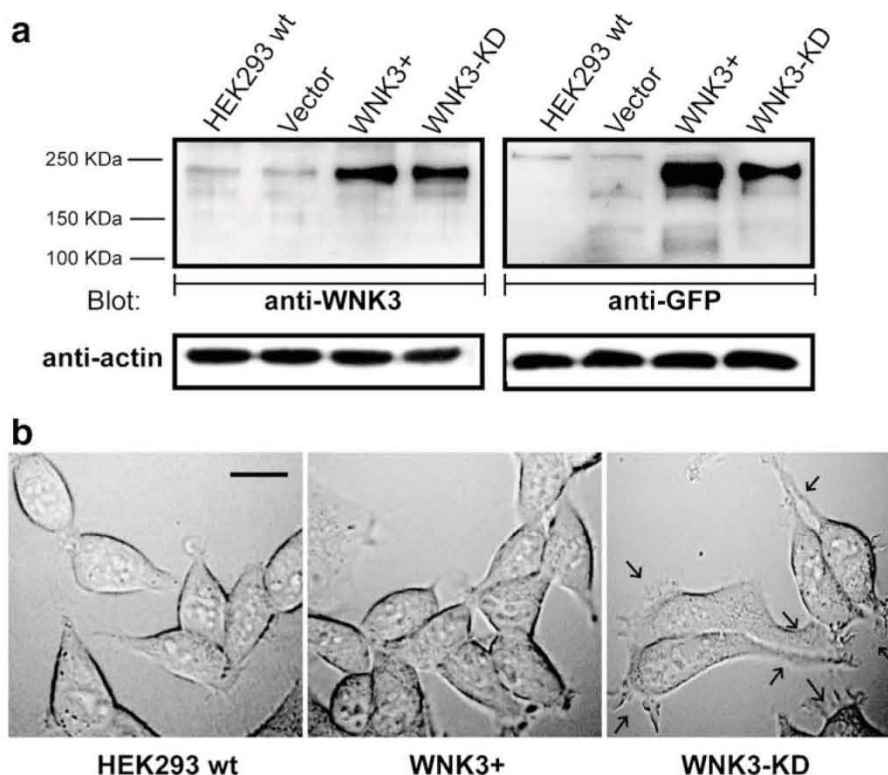
WNK3 expression in HEK293 detected by an anti-WNK3 antibody shows two bands in the Western blot. The signal of the upper band is higher in the transfected cells lines (Fig. 1a). This band co-migrates with the transfected pcDNA/GFP-WNK3, detected by the anti-GFP antibody. This confirms the expression of the WNK3 protein in both cell lines (Fig. 1a). Noteworthy, transfection of the catalytically inactive WNK3 (WNK3-KD) induced a remarkable change in the cell shape. Cells look flattened and show elongations and filopodia-like extensions (arrows). This morphology is not present in the wild-type (HEK293 WT) or in WNK3+ cells (Fig. 1b).

Cell localization and redistribution upon anisotonic stress

HEK293 WT cells contain endogenous WNK3 that in isotonic conditions was found localized in *puncta* at the intercellular junctions, and diffusely at the cytosol (Fig. 2a). This location was the same in cells overexpressing the kinase in WNK3+ cells (Fig. 2a, d, upper panel). The WNK3 localized at the cellular junctions partly co-localizes with an anti-occludin antibody (Fig. 2d, upper panel). The expression pattern of the inactive kinase was markedly different from that of WNK3. Localization at the cell junctions was notably lower and the signal was accumulated at the cytosol, at an area near the nucleus, which partly co-localizes with anti-golgin-97 antibody (Fig. 2a, d, lower panel).

Exposure of WNK3+ cells to hypotonic medium decreased WNK3 expression from the junction areas, without an evident increase at the cytosol (Fig. 2b and bars). Hypertonic medium (600 mOsm) also reduced the

Fig. 1 Expression of WNK3 in wild-type HEK293 (HEK293 WT) cells, in cells overexpressing WNK3 by transfection with cDNA WNK3 (WNK3+) or with the mutated cDNA, catalytically inactive WNK3-KD cells. **a** Stable cell lines were generated as described in “Materials and methods”. Cell lysates were separated on a 7.5 % SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane, and treated subsequently with anti-WNK3 antibody and anti-GFP antibody. Anti-actin demonstrates equal amounts of loaded protein. Representative blots of three separate determinations. **b** Representative images of the morphology of HEK293 WT, WNK3+, or WNK3-KD cells. Arrows indicate the elongations and filopodia-like extensions in WNK3-KD cells. Digital images were obtained in a confocal microscope using differential interference contrast illumination. Bar 10 μ m



number of *puncta* at the cell junctions and WNK3 now appears more concentrated at the cytosol (Fig. 2c and bars). In WNK3-KD cells, the response to either hypotonic or hypertonic conditions was rather similar, i.e., the kinase prominent expression at the near-nuclear site was reduced and new sites of expression were found at the intercellular junctions (Fig. 2b, c, and bars).

Regulatory volume decrease

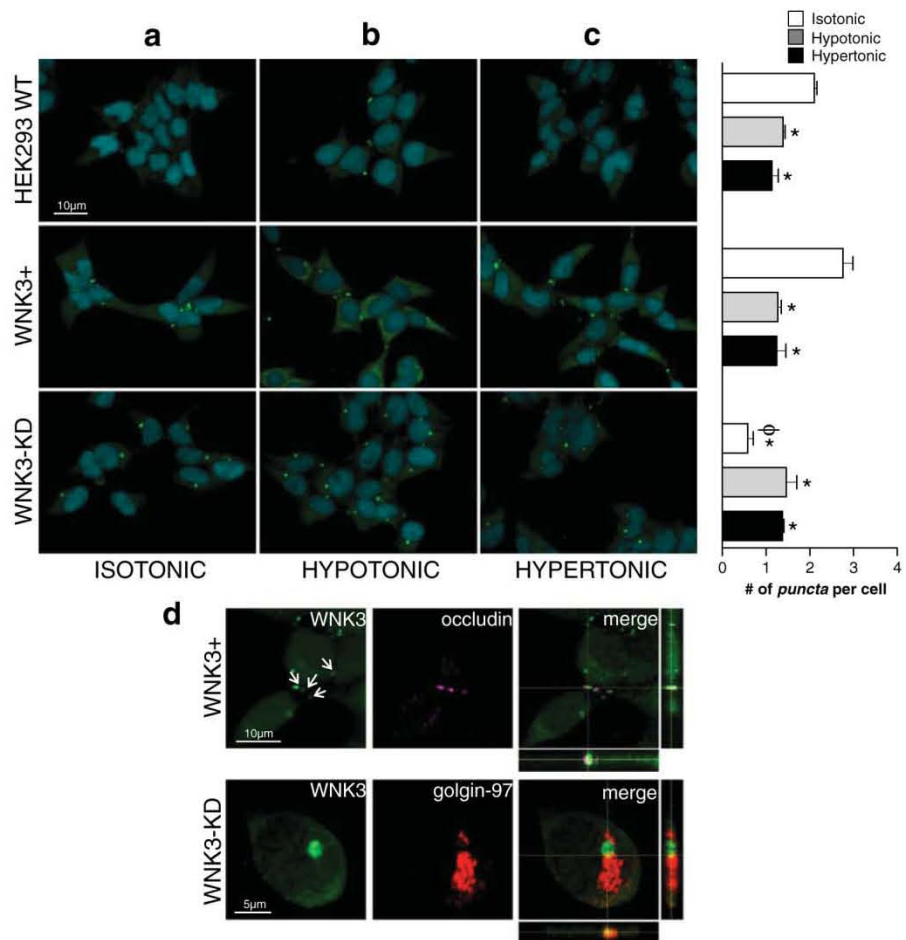
Swelling and volume regulation were examined in WNK3+ or in WNK3-KD cells. Cells with the empty vector (V) were used as controls. No significant differences on swelling or cell volume regulation were found between V and non-transfected HEK293 WT cells (Fig. 3a–c). Therefore, V cells were used as controls for most parameters throughout the study. Stimulation of V cells with hypotonic medium (15 % hypotonic solution, made by reducing NaCl; see “Materials and methods”) induced the typical fast swelling and RVD pattern. Maximal swelling occurred within 10–20 s, followed by the regulatory process to recover the original cell volume. Two phases were identified in the RVD curves, a fast phase lasting about 2 min after the peak of swelling, and a slow phase through the next 2–15 min (Fig. 3a). RVD efficiency was calculated as the percentage

of volume recovery at 15 min, the time of the experiment. In V cells, regulatory volume decrease was of 79.2 % (Fig. 3b).

RVD features were then investigated in WNK3+ and WNK3-KD cells. Figure 3a shows that cell swelling in WNK3+ or WNK3-KD was not significantly different from V cells. RVD at the end of the experiment in WNK3+ cells was mildly reduced (13.1 %), while it was 30.1 % increased in WNK3-KD cells (Fig. 3b). The less efficient RVD in WNK3+ cells was due to a lower rate of the first (2 min) regulatory phase, as shown by the rate constant values shown in Fig. 3c. At this time, RVD in WNK3+ cells is 27.1 % lower than in controls. The increased volume regulation found in WNK3-KD cells is the consequence of an accelerated cell volume decrease in the slow phase (Fig. 3c).

These differences on RVD between control and overexpressed or mutated WNK3, may be ascribed to an effect on one or several of the mechanisms responsible for the volume regulatory process, i.e., KCC, the volume-sensitive Cl^- channel and the organic osmolyte fluxes. The efficiency of these three mechanisms on V, WNK3+, and WNK3-KD cells was then examined. Taurine was selected as representative of organic osmolytes. ^3H -taurine release experiments were carried out as previously described [45]. However, in HEK293 cells, no taurine efflux was induced by a 15 % osmolarity decrease, as that used for RVD measurements (% ^3H -taurine efflux in 5 min, isotonic 1.24 ± 0.08 ; hypotonic

Fig. 2 Expression of WNK3 in HEK293 cells and its re-location by changes in extracellular osmolarity. HEK293 WT, WNK3+, and WNK3-KD cells were left unstimulated (isotonic, **a**) or stimulated with hypotonic (298 mOsm, H15%, **b**) or hypertonic (600 mOsm, **c**) solutions for 3 min, before fixation. *Bars* (means±SE) represent the number of *puncta* per cell, under the different conditions, counted in six images for each condition from different experiments. *Significantly different from isotonic condition in each cell line at $P<0.05$; ϕ significantly different from HEK293 WT cells in isotonic condition at $P<0.05$. **d** Upper panel WNK3 cells immunostained with anti-WNK3 (green), anti-occludin (magenta pseudocolor), and merge. Lower panel WNK3-KD cells immunostained with anti-WNK3 (green), anti-golgin-97 (red), and merge. Orthogonal views in merge show the *xy* image plane, *xz* image plane (bottom) and *yz* (right). Fluorescent imaging was performed using a confocal laser scanning microscope. Representative images of three separate experiments



15 %, 1.28 ± 0.11 ; 30 % 2.53 ± 0.14 ; 35 % 4.88 ± 0.36 ; 40 % 7.06 ± 0.7 ; $n=4$ for all experiments).

These results suggest that RVD must be supported by the efflux of ion osmolytes, among which Cl^- has a prominent role. WNK3 activity has been suggested to modulate intracellular Cl^- levels $[\text{Cl}^-]_i$ via its action on the electroneutral cotransporters [24]. This, though, has not been directly assessed. Changes in $[\text{Cl}^-]_i$ in V, WNK3+ and WNK3-KD under basal (isotonic) conditions were first examined.

The Stern–Volmer constant (Kq) in our experimental conditions (medium composition, temperature, and pH) was first determined from a calibration curve at Cl^- concentrations in the range of 0–80 mM (Fig. 4a). The obtained value of 32.3 M^{-1} was used to determine $[\text{Cl}^-]_i$ in isotonic medium for V, WNK3+, and WNK3-KD cells. Small but significant differences were found between WNK3+ and WNK3-KD cells, with respect to control V cells. Values found were, in mM, $34.2 (\pm 1.8)$, $41.6 (\pm 2.4)$, and $26.4 (\pm 1.4)$ for V, WNK3+, and WNK3-KD cells, respectively (table, Fig. 4a). These results show that the stable over-expression of functional WNK3 in cells, significantly

modifies $[\text{Cl}^-]_i$ in the expected direction, that is, wild-type WNK3 increases, whereas mutant WNK3-KD decreases $[\text{Cl}^-]_i$, consistent with their effects on the electroneutral cation coupled cotransporters. The hypotonic stimulus (H15%) induced a rapid decline of 24–28 % in $[\text{Cl}^-]_i$ in all cells, during the first 4 min, likely due to dilution by water influx. A second phase of gradual reduction in $[\text{Cl}^-]_i$ was next observed, attributable to the Cl^- efflux during RVD. Figure 4b shows that $[\text{Cl}^-]_i$ reduction, indicative of Cl^- efflux, was significantly lower in WNK3+ cells (12.1 %) and higher in WNK3-KD cells (23.9 %) as compared to control V cells (19.8 %). These values were calculated considering as 100 % the F_0/F_{Cl^-} after the dilution phase (min 4).

This Cl^- efflux might be carried either by the activation of volume-sensitive Cl^- channels ($\text{ICl}^-_{\text{swell}}$) or/and by the electroneutral cotransporter KCC. Cl^- currents ($\text{ICl}^-_{\text{swell}}$) were first examined in all cell lines, using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, as described in “Materials and methods”. To focus on the Cl^- currents, we used 73 mM CsCl and 20 mM TEA–Cl in the patch pipette

Fig. 3 Swelling and regulatory volume decrease (RVD) in wild-type HEK293, V, WNK3+, or WNK3-KD cells. Changes in cell volume were measured using a large-angle light-scattering system as described in “Materials and methods”. **a** Representative traces of changes in cell volume after exposure to 15% hypotonic (H15%) medium in each cell type. RVD curves are biphasic showing a fast component between 110–200 s and a slow component thereafter. Bars (**a**, inset) represent the cell volume recovery at the end of the experiment, expressed as percentage of maximal swelling. **b** RVD at the first component. **c** Rate constants from the slope calculated by fitting a linear regression to the logarithmically transformed data during the first 100 s after maximal swelling. Results are means±SE of 15–20 experiments. *Significantly different from control V cells at $P<0.05$

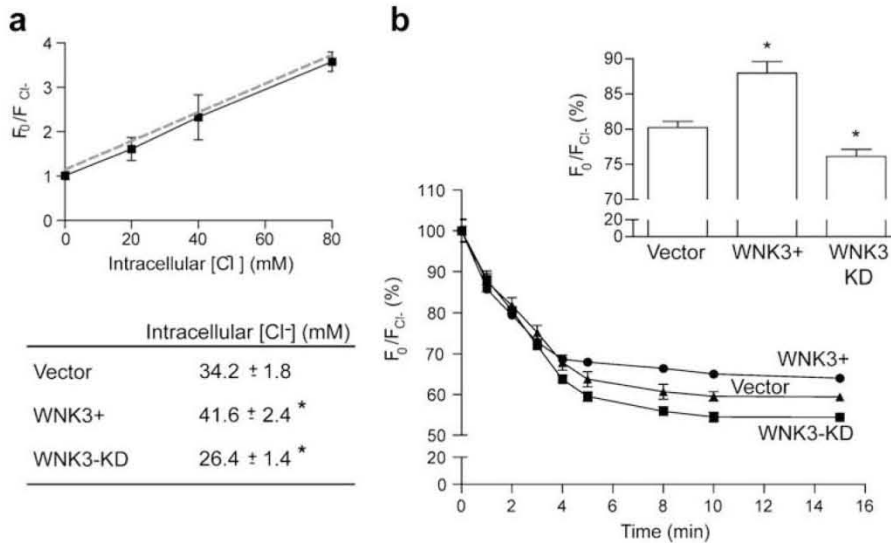
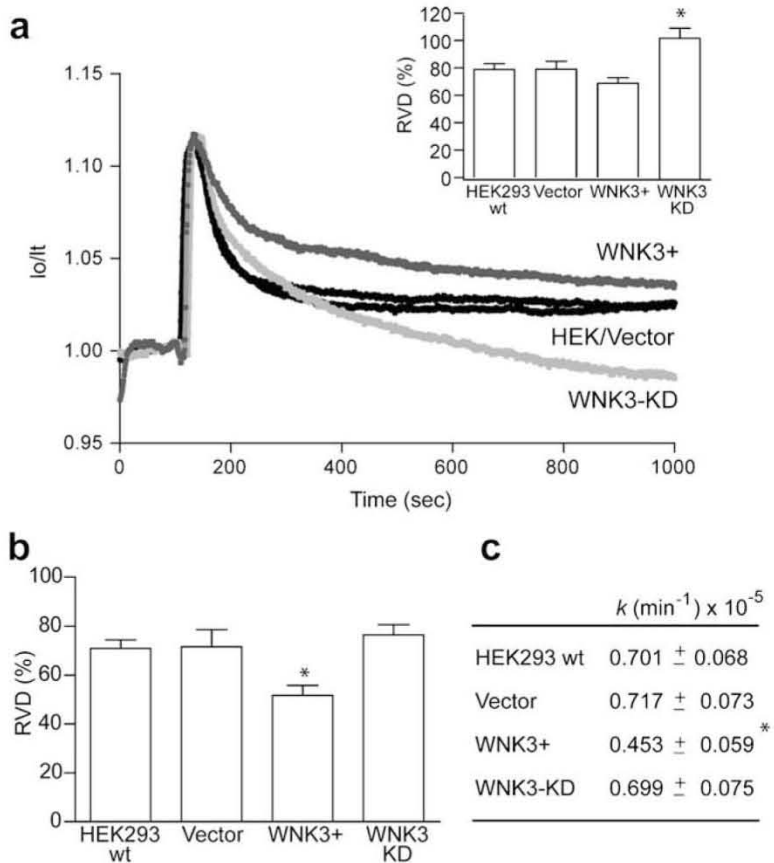
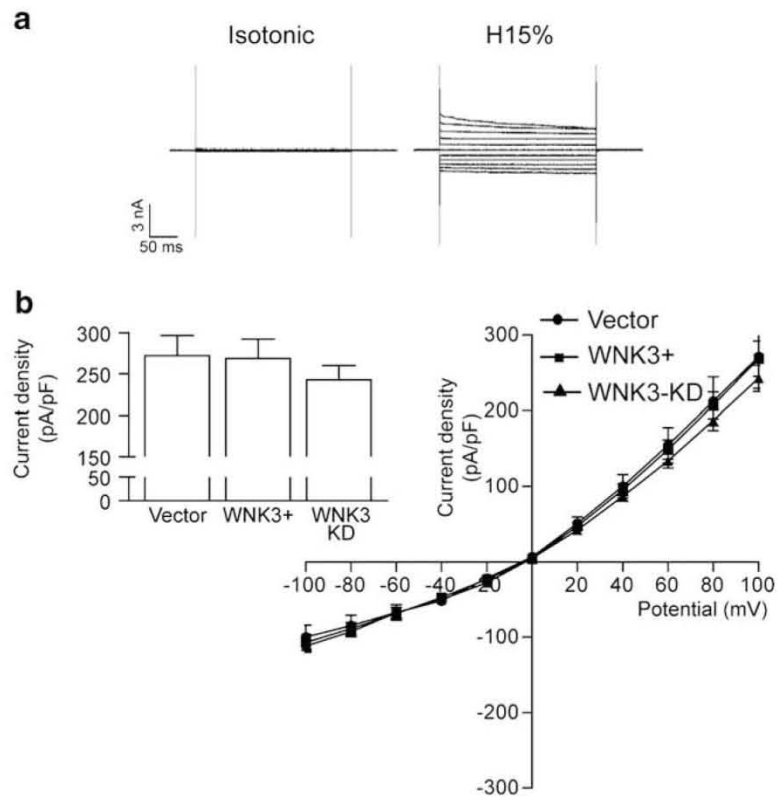


Fig. 4 Changes in intracellular chloride concentration $[Cl^-]_i$ in V, WNK3+, and WNK3-KD cells exposed to hypotonic (H15%) medium. Cells were loaded with diH-MEQ (25 μ M) for 10 min as described in “Materials and methods”. **a** Calibration plot used to calculate the Stern–Volmer constant (Kq) of 32.3 M^{-1} (regression line, dotted line, $r^2=0.99$). **b** Relative reduction of $[Cl^-]_i$ after hypotonic stimulus as

percentage of control in isotonic condition for each cell type. For simplicity in the graph, curves show only selected points, from measurements made every minute (**b**, inset). Bars represent the decrease (%) of $[Cl^-]_i$ from 4–15 min. Mean of three experiments±SEM. *Significantly different from V cells at $P<0.05$

Fig. 5 Whole-cell Cl^- currents activated by hypotonicity in V, WNK3+, and WNK3-KD cells. The holding potential was 0 mV. Currents were elicited by application of step pulses from -100 to $+100$ mV in 20 mV increments, during 300 ms. **a** Representative whole-cell current traces at the indicated experimental conditions. The figure shows currents obtained after a 10 min equilibration in the indicated solution. **b** Current density (pA/pF) vs voltage (mV) curves for V (circle), WNK3+ (square), and WNK3-KD (triangle) cells in hypotonic H15% medium. Bars represent the current density of each cell type at $+100$ mV. Results are means \pm SE of 7–15 experiments. Values were not significantly different at $P < 0.05$



to minimize the contribution of K^+ currents. After obtaining the whole-cell configuration, the isotonic medium was replaced by a 15 % hypotonic solution and evoked currents were registered during 15 min. Upon exposure to hyposmolar conditions, in all cells (V, WNK3+, and WNK3-KD cells) a large current was developed which exhibits the reported features characteristic of $\text{ICl}^-_{\text{swell}}$ [29]. It is an outwardly rectifying current, with inactivation kinetics at large positive voltages and a reversal potential of -3 mV, close to the reversal equilibrium potential of Cl^- predicted by our solutions of ~ 0.0 mV (Fig. 5a, b). The membrane current was normalized to the cell membrane capacitance (current density) to correct for different cell sizes. The current density activated by H15% at $+100$ mV was similar in V and WNK3+ cells (271.1 ± 41.6 pA/pF and 268.7 ± 23.4 pA/pF, respectively), and slightly lower in WNK3-KD cells (242.8 ± 8.6 pA/pF; Fig. 5b).

The KCC activity was measured as the Cl^- -sensitive intracellular accumulation of ^{86}Rb (see “Materials and methods”) under isotonic or 15 % hypotonic conditions. Basal Cl^- -sensitive ^{86}Rb uptake in control V cells was about 8 pmol/(μg protein \times min), and this uptake was increased by hypotonicity, raising ^{86}Rb accumulation by almost 2-fold (180 %; Fig. 6). In WNK3+ cells both basal and stimulated ^{86}Rb uptake were essentially abolished. Noteworthy, in WNK3-KD cells, ^{86}Rb

uptake was already extremely high in isotonic conditions, about 5-fold higher than uptake in V cells, and this was not further increased by hypotonicity (Fig. 6).

To evaluate the contribution of the volume-sensitive Cl^- channel and of KCC to RVD in HEK293 cells, attempts were made to reduce the efficiency of these two mechanisms

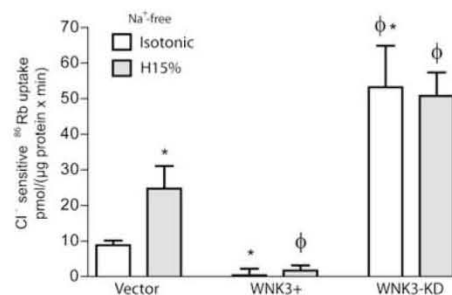


Fig. 6 Effect of hypotonic stimulus on the KCC electroneutral cotransporter activity in control V, WNK3+ or mutant WNK3-KD cells. KCC activity was measured as the Cl^- -dependent ^{86}Rb uptake as described in “Materials and methods”. KCC activity was measured in isotonic (clear bar) or hypotonic H15% (dark bar) conditions. Bars represent the mean \pm SE of 3 separate experiments. *Significantly different from control V cells in isotonic medium at $P < 0.01$. ϕ Significantly different from control V cells in H15% at $P < 0.05$

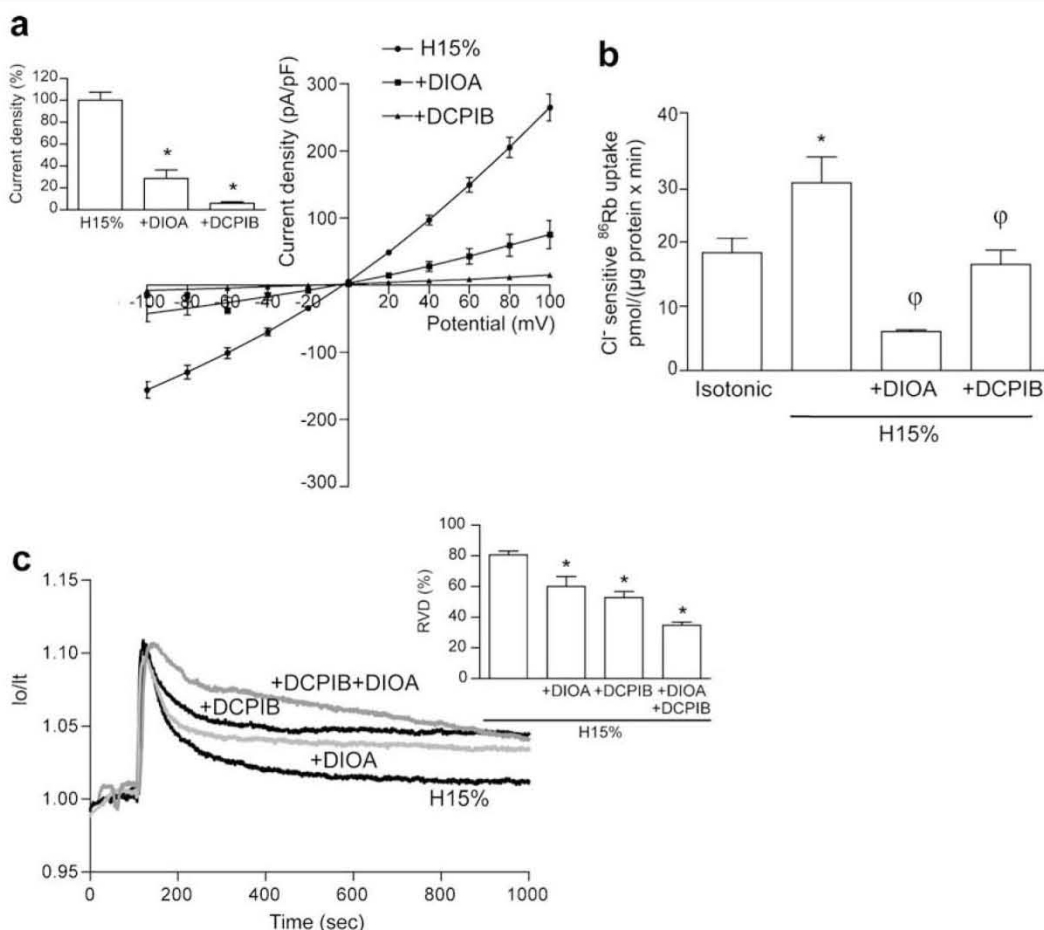


Fig. 7 Effects of DIOA and DCPIB on KCC, ICl_{swell}^- , and RVD in HEK293 cells exposed to H15%. **a** Current density vs voltage curves from HEK293 cells in the presence or absence of the blockers ICl_{swell}^- elicited by H15% were recorded as in Fig. 5. The blockers DIOA (20 μ M) or DCPIB (10 μ M) were added at the time of maximal ICl_{swell}^- current amplitude. Control (circle), plus DIOA (square), plus DCPIB (triangle). Bars represent the current density at +100 mV, expressed as 100 % for controls and the corresponding decrease in the presence of the blocker. Results are means \pm SE of 6–14 experiments. **b** Inhibitory effect of DCPIB and DIOA on the hypotonic-stimulated KCC activity. Cl^- -sensitive ^{86}Rb uptake measured as in Fig. 6. Cells were pre-incubated during 30 min

with DIOA or DCPIB in isotonic medium before the stimulus and were present throughout the experiment. *Significantly different from the isotonic condition at $P < 0.05$; ϕ significantly different from the hypotonic condition at $P < 0.05$. **c** RVD after hypotonic (H15%) swelling in HEK293 cells exposed to DIOA, DCPIB, and both. Cells were preincubated with the blockers 30 min before the stimulus and were present throughout the experiment. Results in bars (means \pm SE of 6–16 experiments) represent the cell volume recovery, expressed as percentage of maximal swelling at 300 s after the stimulus. *Significantly different from control H15% at $P < 0.05$

by a pharmacological approach. This could not be properly achieved, however, since the two agents commonly used to block KCC (DIOA) or Cl^- channel (DCPIB), exerted a potent inhibition on both the cotransporter and the channel. DIOA 20 μ M, had a strong inhibitory effect (71.5 %) on the H15%-stimulated Cl^- currents (Fig. 7a), and at the same concentration also reduced (79.3 %) the hypotonic KCC activity (Fig. 7b). Similarly, DCPIB (10 μ M) prevented the H15%-stimulated Cl^- currents and reduced by 43.4 % the hypotonic KCC activity (Fig. 7a, b). In accordance with these results, RVD was inhibited by the blockers. The effect was more evident at the first phase (300 s) of the volume

regulatory process, when DIOA and DCPIB reduced by RVD by 25.4 and 34.4 %, respectively, and these effects were additive (Fig. 7c).

Regulatory volume increase

Cells exposed to a medium made hypertonic by addition of sorbitol to reach a final osmolarity of 600 mOsm (see “Materials and methods”) initially shrink and immediately after, initiate the adaptive process of volume recovery, known as regulatory volume increase (RVI). Figure 8a shows RVI in WNK3+ and WNK3-KD cells as compared

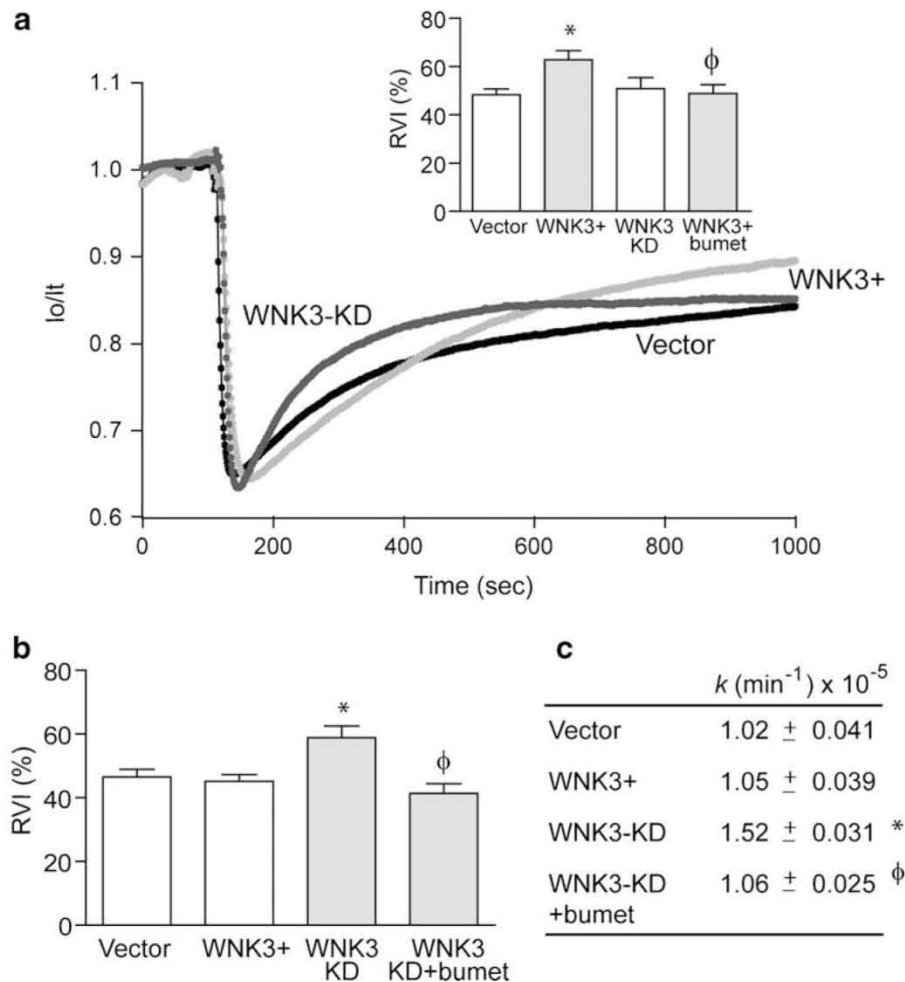


Fig. 8 Volume reduction and regulatory volume increase (RVI) after a hypertonic stimulus in control (V), WNK3+, or WNK3-KD cells. **a** Representative curves of changes in cell volume after hypertonic (600 mOsm) stimulus in each cell type. Cell shrinkage is followed by a biphasic process of RVI, with a first, fast component, evident at 110–300 s and a second slow component. Bars (inset) represent the cell volume recovery at the end of the experiment, calculated as percentage of maximal shrinkage. *Significantly different from RVI in control V cells at $P < 0.05$; ϕ significantly different from WNK3+ without

bumetanide at $P < 0.05$. **b** RVI at the first component. **c** Rate constants from the slope calculated by fitting a linear regression to the logarithmically transformed data during the first 100 s after maximal shrinkage. *Significantly different from control V cells at $P < 0.05$; ϕ significantly different from WNK3-KD without bumetanide at $P < 0.05$. Bars (**a**, inset) represent the cell volume recovery at the end of the experiment, expressed as percentage of maximal swelling. **b** RVI calculated after the fast component of the volume recovery process. **c** Rate constants for the first RVI phase calculated as in Fig. 3c

to control V cells. The RVI pattern in control cells showed two phases of different rate, an initial, rapid phase lasting 110–300 s and a slow, second phase occurring up to 15 min. RVI efficiency at the end of the experiments in V cells was 48 % (Fig. 8a, b). Bumetanide decreased RVI only by 10.3 ± 2.4 % (results not shown). In WNK3+ cells, RVI was 30 % higher, due to a more rapid regulation at the second phase of the regulatory process (Fig. 8a, b). This effect was prevented by bumetanide (Fig. 8b). In WNK3-KD cells no difference was found in total RVI as compared to controls (Fig. 8a, b); however, these cells showed a significantly faster volume

recovery at the initial phase, which was 26.2 % more rapid than in controls (Fig. 8a, c). This increased was abolished by bumetanide 10 μM (Fig 8a, c).

The effect of bumetanide preventing the increase in RVI in WNK3+ cells and the faster phase of the volume regulatory process in WNK-KD cells, suggest that the cotransporter NKCC is responsible for these differences. The activity of NKCC was then examined in controls and in the two experimental groups of cells, at the times corresponding to the two phases of RVI. Figure 9a shows that at short times (3 min) NKCC was not significantly increased by the hypertonic

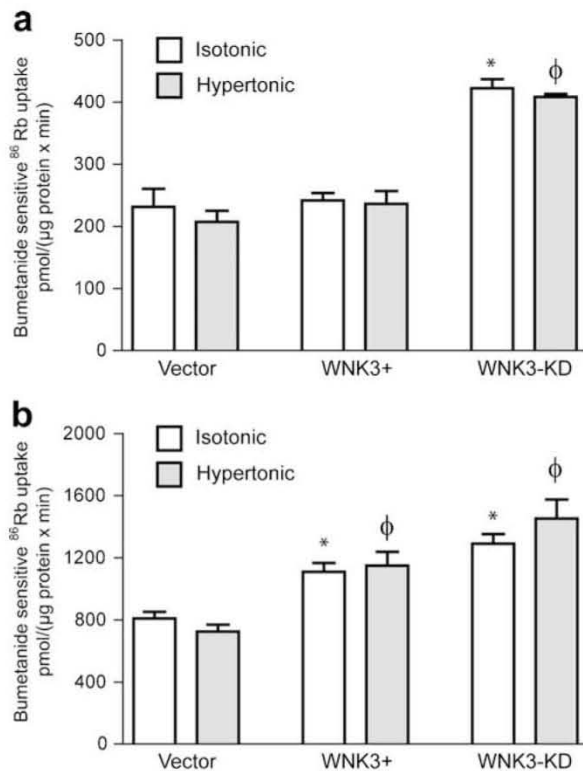


Fig. 9 NKCC activity in WNK3+ and WNK3-KD cells. Bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb uptake assays were used to measure the NKCC activity, as described in “Materials and methods”. **a** ⁸⁶Rb uptake at 3 min and **b** at 15 min. Experiments were performed in isotonic (clear bar) or hypertonic (dark bar) conditions. *Significantly different from isotonic control V cells at $P < 0.05$; ϕ significantly different from control V cells in hypertonicity at $P < 0.05$

condition in V cells, nor in WNK3+ cells, while in WNK3-KD cells, NKCC activity was markedly increased in isotonic conditions, and was not further enhanced by the hyperosmolar condition. This higher NKCC activity seems then responsible for the higher volume regulation in these cells at the fast initial phase shown in Fig. 8c. At longer times (15 min) NKCC activity in control cells was not increased by hypertonicity, but in WNK3+ or of WNK3-KD cells, NKCC activity significantly increased in isotonic conditions without further activity in hypertonic conditions (Fig. 9b). These results on the NKCC activity may explain the differences observed at the two phases of RVI in WNK3+ and WNK3-KD cells.

Discussion

In the present study in HEK293 cells, WNK3 was found localized at the intercellular junctions. This result confirms a report showing immunohistochemical expression of WNK3 at the cell junctions in a variety of epithelial tissue sections

[17, 40]. The functional kinase is required for its localization at the cell junctions, since in cells with a mutated catalytic site, WNK3 is relocated and found predominantly at a perinuclear area, partly the trans-Golgi network (Fig. 2b, lower panel). The structures and mechanisms which determine the WNK3 intracellular localization are so far unclear. In terms of function, the presence of WNK3 at the intercellular junctions suggests a role in parallel Cl^- fluxes, as has been proposed for WNK1 or WNK4 [16, 30]. In contrast to HEK293 cells, in human glioma cells in culture, WNK3 is localized prominently at the cytosol, and associated with vacuole-like subcellular structures [12]. More information is necessary to define whether the intracellular localization of WNK3 is cell specific.

Introduction of a catalytic inactive WNK3 in HEK293 cells as in the present study induced a remarkable change in cell shape. This effect, not previously described, suggests an interaction of the active WNK3 with cell structures, possibly elements of the cytoskeleton, related to maintain the characteristic shape of these epithelial cells. A difference is found again with glioma cells, in which silencing of WNK3 by siRNA did not induce a change in cell shape [12].

In response to osmotic stimuli, WNK3 translocates to the cytosol (Fig. 2). This mobilization may be required to establish the interactions with signal molecules or structures related to cotransporter trafficking or/and for the cytoskeleton adaptations necessary to face the change in cell volume. No translocation of WNK3 into the cell membrane was observed, suggesting that its effects on the cotransporters occur via intermediate signaling chains ultimately responsible for the cotransporter activation. This chain most likely involves the Ste20-like kinases SPAK and OSR1, whose functional interaction with WNKs including WNK3 is well documented [33, 38].

The present results in HEK293 cells showed that WNK3 activity has a clear influence on RVD. The volume regulatory efficiency is reduced in cells overexpressing WNK3 (WNK3+) and markedly increased in cells expressing the catalytically inactive WNK3 (WNK3-KD cells). These effects are related to WNK3 effect on the cotransporter KCC (compare Figs. 3 and 6). It is known that the phosphorylation status of the KCC molecule determines the functional activity of the transporter, which is reduced by phosphorylation and increased by dephosphorylation [2, 18]. Dephosphorylation of two key phosphorylation sites, threonine residues 991 and 1048 of KCC3 have been clearly shown to be associated with activation of the cotransporter [40]. The present results in HEK293 cells demonstrate that the observations done in the heterologous expression system of *Xenopus* oocytes [5, 17] also occur in a mammalian cell system, confirming that WNK3 has a profound influence on the KCC activity, decreasing or increasing the cotransporter efficiency according to the presence or absence of catalytic

activity of the kinase. HEK293 cells under isotonic conditions express endogenous WNK3 and basal KCC activity, which are both suppressed in cells overexpressing WNK3. Conversely, in cells stably transfected with the kinase inactive by intervention of the catalytic site, the KCC activity increases dramatically. These results point to an effect of the WNK3 in the control of the phosphorylation state of the cotransporter, which involves the catalytic site of the kinase. This influence of WNK3 in isotonic conditions affects the KCC response to hypotonicity. In control cells, a mild decrease in osmolarity activates KCC, and this response is prevented in WNK3+ cells, suggesting that KCC is inactive by the overexpressed WNK3 and is unable to respond to hypotonicity. In WNK3-KD cells, containing the catalytically inactive WNK3, the KCC activity is already maximal and cannot be further increased by hypotonicity (Fig. 6). These results can be interpreted as to mean that inactivation of WNK3 promotes maximal dephosphorylation of the transporter molecules, which cannot be further increased by other stimuli. In experiments in oocytes expressing WNK3-KD, KCC activity also markedly increases in isotonic conditions, but in contrast to the present results in HEK293 cells, hypotonicity is still able to increase KCC activity over the level found in the isomolar condition [5, 17]. This may occur because in the oocyte study KCC is overexpressed, and thus cells may have a surplus of transporters to be activated by hypotonicity, not present in HEK293 cells. Disparities in the magnitude of the hypotonic stimulus, 50 % in oocytes and 15 % in HEK cells, may also explain this difference.

The present results, though clearly supporting the involvement of WNK3/KCC in RVD, showed that a substantial volume regulation is still found in WNK3+ cells in which KCC activity is almost abolished (Figs. 3 and 6), stress the important contribution of mechanisms for RVD other than the transporter, and independent of WNK3. The volume-sensitive Cl^- channel ($\text{Cl}^-_{\text{swell}}$) is a strong candidate, as a robust Cl^- current activates in control cells exposed to 15 % osmolarity reduction. This channel seems not to be under the influence of WNK3 since no significant difference was found in our study between control cells and WNK3+ or WNK3-KD cells. Potassium fluxes are also key contributors to RVD in most cells. Interestingly, K^+ translocation during RVD occurs not always via volume-sensitive K^+ channels but rather through a number of other K^+ channels activated by factors concurrent with hypotonicity and swelling. This is the case of voltage-sensitive channels, Ca^{2+} -dependent K^+ channels, or stretch-activated K^+ channels [14]. In fact, K^+ channels strictly dependent on swelling have described only in few cell types [28]. To our knowledge, the K^+ channel(s) involved in RVD in HEK293 cells have not been so far identified. Heterologous expression of TASK-2 in HEK-293 cells generates osmosensitive K^+ currents which contribute to volume regulation [27], but the TASK channels are not influenced by WNKs [18, 19].

WNK4 inhibits the maxi- K^+ channel heterologously expressed in HEK293 cells [48], but there is as yet no evidence of its contribution to RVD in these cells. WNK1, WNK3, and WNK4 inhibit the ROMK1 [20, 22, 24], but these channels are not involved in RVD [14]. Clarifying the role of WNKs on K^+ channels related to volume regulation is an interesting subject to be pursued in future investigations.

The relative contribution to RVD of the cotransporter and the volume-sensitive Cl^- channel could not be accurately measured in HEK293 cells since as here shown (Fig. 7), DIOA and DCPIB, considered as potent blockers of KCC and $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$, respectively [6], interfere with both, the cotransporter and the channel activity. Also, the non-specific effect of DIOA, which inhibited the volume-sensitive K^+ fluxes has been previously reported [21]. These results should be taken into consideration when using these drugs as tools to evaluate the contribution of either one of these mechanisms to volume regulation [7, 44]. The contribution of KCC to RVD in HEK293 cells, where $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ was unaffected by WNK3, may be evaluated by the differences in RVD efficiency found between WNK3+, WNK3-KD, in which KCC activity is either suppressed (WNK3+) or markedly increased (WNK3-KD).

The influence of WNK3 in the cell response to hypertonic conditions was examined in the present study. In HEK293 cells, hypertonic stimulus evoked a fast cell shrinkage followed by cell volume recovery. This adaptive process in most cells occurs by the operation of several mechanisms, i.e., channels, exchangers, and transporters. The present results suggest that in HEK293 cells the cotransporter NKCC is not prominently involved in RVI. This conclusion is based, first, in the low effect on RVI of the specific NKCC blocker bumetanide, and second, because NKCC was not activated by increases in external osmolarity in these cells ([15] and present results, Fig. 9). Although presumably not involved in RVI in physiological conditions, WNK3 showed a marked influence on NKCC activity in HEK293 cells. These cells have a low NKCC activity, but it can be many-fold increased by overexpression of WNK3. This is in accordance with previous results in oocytes [17]. NKCC activity in most cells depends on the phosphorylation status of the molecule and the WNK3 overexpression may increase the phosphorylated, active transporters [18]. Surprisingly, NKCC activity was also enhanced in cells expressing the inactive form of WNK3 (Fig. 9). We propose that this is due to the effect of the inactive kinase strongly increasing the activity of the KCC transporter, leading to a decrease in $[\text{Cl}^-]$, which is then, the stimulus increasing NKCC activity [11, 25]. Besides, the activity of endogenous WNK1 and WNK2, which are expressed in HEK293 cells [12], may contribute to the NKCC activity observed in the WNK3-KD cells. Thus, even though via different mechanisms, NKCC is activated in cells overexpressing either the active or the inactive form of WNK3, and

RVI was increased in the two cell lines. Altogether, these results show that even if NKCC is not a significant contributor to RVI in HEK293 cells, this process may be influenced by WNK3 due to its dual role affecting both KCC and NKCC, and through this effect, regulating the cell Cl^- levels. It is worthy to notice that steady state $[\text{Cl}^-]_i$ in control, WNK3+, and WNK3-KD cells was significantly different, with the following profile: WNK3+>control>WNK3-KD, due to the inhibition and activation of KCCs by wild-type WNK3 and catalytically inactive WNK3-KD, respectively. Even when this role of WNK3 regulating $[\text{Cl}^-]_i$ has been suggested [32], this is the first time, to our knowledge, that this has been demonstrated by direct evidence and using a mammalian cell system. Our data thus support the proposal that WNK3 could be the Cl^- -sensitive kinase.

In contrast to HEK293 cells, RVI in glioma D54-MG cells is essentially dependent of NKCC, also under the influence of WNK3, since bumetanide at high concentrations, and silenced WNK3, abolished RVI in these cells [12]. Interestingly, WNK3 was not found expressed in normal glia [17] and there is essentially no information about the expression and activity of this kinase in other cell types.

WNK1 and WNK4 are also responsive to changes in external tonicity. WNK1 activates by hypertonicity and cell shrinkage and via the downstream signaling chain formed by the Ste20-kinases SPAK and OSR1, regulates the cotransporters NCC and NKCC, sustaining their functional activity [23, 43, 46, 47]. This sequence of events point to a role for WNK1 on the regulatory volume increase, although only few studies have effectively shown this action [4]. KCC3 is also subject of WNK1 influence, decreasing its activity upon phosphorylation. WNK1 also activates by hypotonicity though to a lower extent [23, 40]. WNK4 also regulates NCC, NKCC [3, 16], and KCCs ([8, 10], but its possible influence on volume regulation is so far unknown. A recent study in *X. laevis* oocytes revealed that WNK2, similar to WNK3, reciprocally activates NKCC1 and inactivates KCC2 in a kinase-dependent manner [41]. Thus, it may also contribute to volume regulation in those cells where it is expressed.

In summary, the present study in HEK293 cells which documented the implication of WNK3 in cell volume control as well as in the regulation of intracellular Cl^- levels, contributes to support the influence on WNKs on these two important elements of cell homeostasis.

Acknowledgments We acknowledge the valuable technical assistance of Gabriel Orozco Hoyuela with the confocal microscopy. We thank Dra. Lorenza González-Mariscal for providing the antibody anti-occludin and Dr. Luis Vaca for providing the antibody anti-golgin-97. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [grant number IN203410 to H.P.-M.], and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant number 98952 to H.P.-M and 165815 to G.G.]. This work is part of the requirements

for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Silva Cruz-Rangel at UNAM, with a CONACyT fellowship.

References

1. Anselmo AN, Earnest S, Chen W, Juang YC, Kim SC, Zhao Y, Cobb MH (2006) WNK1 and OSR1 regulate the Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10883–10888. doi:10.1073/pnas.0604607103
2. Bergeron MJ, Frenette-Cotton R, Carpentier GA, Simard MG, Caron L, Isenring P (2009) Phosphoregulation of K^+ - Cl^- cotransporter 4 during changes in intracellular Cl^- and cell volume. *J Cell Physiol* 219:787–796. doi:10.1002/jcp.21725
3. Cai H, Cebotaru V, Wang YH, Zhang XM, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB (2006) WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. *Kidney Int* 69:2162–2170. doi:10.1038/sj.ki.5000333
4. Choe KP, Strange K (2007) Evolutionarily conserved WNK and Ste20 kinases are essential for acute volume recovery and survival after hypertonic shrinkage in *Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C915–C927. doi:10.1152/ajpcell.00126.2007
5. de Los HP, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, Mount DB, Lifton RP, Hebert SC, Gamba G (2006) WNK3 bypasses the tonicity requirement for K^+ - Cl^- cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1976–1981. doi:10.1073/pnas.0510947103
6. Decher N, Lang HJ, Nilius B, Brüggemann A, Busch AE, Steinmeyer K (2001) DCPIB is a novel selective blocker of $\text{I}(\text{Cl}, \text{swell})$ and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br J Pharmacol* 134:1467–79. doi:10.1038/sj.bjp.0704413
7. Ernest NJ, Weaver AK, Van Duyn LB, Sontheimer HW (2005) Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1451–C1460. doi:10.1152/ajpcell.00503.2004
8. Gagnon KB, England R, Delpire E (2006) Volume sensitivity of cation- Cl^- cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C134–142. doi:10.1152/ajpcell.00037.2005
9. Gamba G (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85:423–93. doi:10.1152/physrev.00011.2004
10. Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, Delpire E, Gamba G (2007) WNK4 kinase is a negative regulator of K^+ - Cl^- cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1197–F1207. doi:10.1152/ajprenal.00335.2006
11. Gillen CM, Forbush B III (1999) Functional interaction of the K^+ - Cl^- cotransporter (KCC1) with the Na^+ - K^+ - Cl^- cotransporter in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 276:C328–C336
12. Haas BR, Cuddapah VA, Watkins S, Rohn KJ, Dy TE, Sontheimer H (2011) With-no-lysine kinase 3 (WNK3) stimulates glioma invasion by regulating cell volume. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C1150–C1160. doi:10.1152/ajpcell.00203.2011
13. Hayashi H, Suruga K, Yamashita Y (2009) Regulation of intestinal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger SLC26A3 by intracellular pH. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C1279–C1290. doi:10.1152/ajpcell.00638.2008
14. Hoffmann EK, Pedersen SF (2011) Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways. *Acta Physiol* 202:465–485. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02190.x
15. Isenring P, Jacoby SC, Payne JA, Forbush B 3rd (1998) Comparison of Na^+ - K^+ - Cl^- cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na^+ - Cl^- cotransporter. *J Biol Chem* 273:11295–301. doi:10.1074/jbc.273.18.11295

16. Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS, Lifton RP (2004) WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2064–2069. doi:10.1073/pnas.0308434100
17. Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP (2005) WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16783–16788. doi:10.1073/pnas.0508307102
18. Kahle KT, Rinehart J, Lifton RP (2010) Phosphoregulation of the Na–K–2Cl and K–Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim Biophys Acta* 1802:1150–1158. doi:10.1016/j.bbdis.2010.07.009
19. Kahle KT, Ring AM, Lifton RP (2008) Molecular physiology of the WNK kinases. *Annu Rev Physiol* 70:329–355. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100651
20. Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC, Lifton RP (2003) WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. *Nat Genet* 35:372–376. doi:10.1038/ng1271
21. Lauf PK, Misri S, Chimote AA, Adragna NC (2008) Apparent intermediate K conductance channel hyposmotic activation in human lens epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C820–C832. doi:10.1152/ajpcell.00375.2007
22. Lazrak A, Liu Z, Huang CL (2006) Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1615–1620. doi:10.1073/pnas.0510609103
23. Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, Goldsmith EJ, Cobb MH (2005) Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem* 280:26653–26658. doi:10.1074/jbc.M502598200
24. Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, MacGregor GG, Wilson FH, Canessa CM, Lifton RP, Hebert SC (2006) WNK3, a kinase related to genes mutated in hereditary hypertension with hyperkalaemia, regulates the K⁺ channel ROMK1 (Kir1.1). *J Physiol* 571:275–286. doi:10.1113/jphysiol.2005.102202
25. Lytle C, McManus T (2002) Coordinate modulation of Na–K–2Cl cotransport and K–Cl cotransport by cell volume and chloride. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1422–C1431. doi:10.1152/ajpcell.00130.2002
26. McCormick JA, Ellison DH (2011) The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev* 91:177–219. doi:10.1152/physrev.00017.2010
27. Niemeyer MI, Cid LP, Barros LF, Sepúlveda FV (2001) Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem* 276:43166–43174. doi:10.1074/jbc.M107192200
28. Niemeyer MI, Hougaard C, Hoffmann EK, Jørgensen F, Stutzin A, Sepúlveda FV (2000) Characterisation of a cell swelling-activated K⁺-selective conductance of Ehrlich mouse ascites tumour cells. *J Physiol* 524:757–767. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00757.x
29. Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulos V, Droogmans G (1997) Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol* 68:69–119. doi:10.1016/S0079-6107(97)00021-7
30. Ohta A, Yang SS, Rai T, Chiga M, Sasaki S, Uchida S (2006) Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. *Biochem Biophys Res Commun* 349:804–808. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.101
31. Okada Y (2004) Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 41:233–258. doi:10.1385/CBB:41:2:233
32. Pacheco-Alvarez D, Gamba (2011) WNK3 is a putative chloride sensitive kinase. *Cell Physiol Biochem* 28:1123–1134. doi:10.1159/000335848
33. Pacheco-Alvarez D, Vázquez N, Castañeda-Bueno M, de-Los-Heros P, Cortes-González C, Moreno E, Meade P, Bobadilla NA, Gamba G (2012) WNK3-SPAK interaction is required for the modulation of NCC and other members of the SLC12 family. *Cell Physiol Biochem* 29:291–302. doi:10.1159/000337610
34. Pasantes-Morales H (2007) Amino acids and brain volume regulation. In: Oja S, Schousboe A, Saraansari P (eds) *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*, 3rd edn. Springer, New York, pp 225–248
35. Pasantes-Morales H, Cruz-Rangel S (2010) Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives. *Neuroscience* 168:871–84. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.074
36. Pedersen SF, Beisner KH, Hougaard C, Willumsen BM, Lambert IH, Hoffmann EK (2002) Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Physiol* 541:779–796. doi:10.1113/jphysiol.2002.018887
37. Ponce-Coria J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de Los Heros P, Juarez P, Munoz E, Michel G, Bobadilla NA, Gimenez I, Lifton RP, Hebert SC, Gamba G (2008) Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8458–8463. doi:10.1073/pnas.0802966105
38. Richardson C, Alessi DR (2008) The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci* 121:3293–304. doi:10.1242/jcs.029223
39. Rinehart J, Kahle KT, de Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G, Lifton RP (2005) WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation–Cl cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16777–16782. doi:10.1073/pnas.0508303102
40. Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, Risinger M, Pan W, Wu D, Colangelo CM, Forbush B, Joiner CH, Gulcicek EE, Gallagher PG, Lifton RP (2009) Sites of regulated phosphorylation that control K–Cl cotransporter activity. *Cell* 138:525–536. doi:10.1016/j.cell.2009.05.031
41. Rinehart J, Vázquez N, Kahle KT, Hodson CA, Ring AM, Gulcicek EE, Louvi A, Bobadilla NA, Gamba G, Lifton RP (2011) WNK2 kinase is a novel regulator of essential neuronal cation–chloride cotransporters. *J Biol Chem* 286:30171–30180. doi:10.1074/jbc.M111.222893
42. Russell JM (2000) Sodium–potassium–chloride cotransport. *Physiol Rev* 80:211–276
43. Shaharabany M, Holtzman EJ, Mayan H, Hirschberg K, Seger R, Farfel Z (2008) Distinct pathways for the involvement of WNK4 in the signaling of hypertonicity and EGF. *FEBS J* 275:1631–1642. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06318.x
44. Taouil K, Hannaert P (1999) Evidence for the involvement of K⁺ channels and K(+)-Cl⁻ cotransport in the regulatory volume decrease of newborn rat cardiomyocytes. *Pflugers Arch* 439:56–66. doi:10.1007/s004240051128
45. Vázquez-Juárez E, Ramos-Mandujano G, Lezama RA, Cruz-Rangel S, Islas LD, Pasantes-Morales H (2008) Thrombin increases hyposmotic taurine efflux and accelerates ICI-swell and RVD in 3 T3 fibroblasts by a src-dependent EGFR transactivation. *Pflugers Arch* 455:859–872. doi:10.1007/s00424-007-0343-y
46. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH (2000) WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275:16795–16801. doi:10.1074/jbc.275.22.16795
47. Zagorska A, Pozo-Guisado E, Boudeau J, Vitari AC, Rafiqi FH, Thastrup J, Deak M, Campbell DG, Morrice NA, Prescott AR, Alessi DR (2007) Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hypertonic stress. *J Cell Biol* 176:89–100. doi:10.1083/jcb.200605093
48. Zhuang J, Zhang X, Wang D, Li J, Zhou B, Shi Z, Gu D, Denson DD, Eaton DC, Cai H (2011) WNK4 kinase inhibits Maxi K channel activity by a kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 301:F410–F419. doi:10.1152/ajprenal.00518.2010

Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters

Silvia Cruz-Rangel,^{1*} Zesergio Melo,^{2*} Norma Vázquez,² Patricia Meade,² Norma A. Bobadilla,² Herminia Pasantes-Morales,¹ Gerardo Gamba,^{2,3} and Adriana Mercado^{2,3}

¹Departamento de Fisiología y Desarrollo Neural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacan, Mexico City, Mexico; ²Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; and ³Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

Submitted 10 March 2011; accepted in final form 20 May 2011

Cruz-Rangel S, Melo Z, Vázquez N, Meade P, Bobadilla NA, Pasantes-Morales H, Gamba G, Mercado A. Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C601–C608, 2011. First published May 25, 2011; doi:10.1152/ajpcell.00070.2011.—With-no-lysine kinase 3 (WNK3) is a member of a subfamily of serine/threonine kinases that modulate the activity of the electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. WNK3 activates NKCC1/2 and NCC and inhibits the KCCs. Four splice variants are generated from the *WNK3* gene. Our previous studies focused on the WNK3–18a variant. However, it has been suggested that other variants could have different effects on the cotransporters. Thus, the present study was designed to define the effects of all WNK3 variants on members of the SLC12 family. By RT-PCR from a fetal brain library, exons 18b and 22 were separately amplified and subcloned into the original WNK3–18a or catalytically inactive WNK3-D294A to obtain all four potential combinations with and without catalytic activity (18a, 18a+22, 18b, and 18b+22). The basal activity of the cotransporters and the effects of WNK3 isoforms were assessed in *Xenopus laevis* oocytes coinjected with each of the WNK3 variant cRNAs. In isotonic conditions, the basal activity of NCC and NKCC1/2 were increased by coinjection with any of the WNK3. The positive effects occurred even in hypotonic conditions, in which the basal activity of NKCC1 is completely prevented. Consistent with these observations, when expressed in hypotonicity, all KCCs were active, but in the presence of any of the WNK3 variants, KCC activity was completely reduced. That is, NKCC1/2 and NCC were inhibited, even in hypertonicity, while KCCs were activated, even in isotonic conditions. We conclude that the effects of all WNK3 variants toward SLC12 proteins are similar.

cotransporter; kinases; osmolarity; phosphorylation; SPAK

EUKARYOTIC CELLS REGULATE their volume in the long term through the coordinated function of the Na⁺-coupled chloride (NKCC1/2 and NCC) and K⁺-coupled chloride (KCC1–4) cotransporters, which encompass two branches of the SLC12 gene family of solute transporters (12). Under hypotonic conditions, cell volume increases because water enters the cell. In this state, the coordinated activation of KCCs and inhibition of NKCCs helps to return the cell volume to normal by increasing Cl[−] exit along with water. Under hypertonic conditions, cell volume decreases because water leaves the cell, and to reestablish cell volume, KCCs are inhibited while NKCCs are activated. In this way, the cell increases chloride entry along with water. Given that the long-term activity of SLC12 cotransporters changes the intracellular chloride concentration

[Cl[−]]_i, the coordinated function of these cotransporters is also important for essential neurological functions because the way that postsynaptic cells respond to neurotransmitters that act on chloride channel-coupled receptors, such as γ-aminobutyric acid (GABA), is defined by [Cl[−]]_i (11). Finally, the activity of the SLC12 cotransporters is also important to the regulation of transcellular ion transport in many epithelial cells, including the nephron, and thus is critical for blood pressure control (4).

The K⁺-Cl[−] cotransporters move chloride outside the cell, are inhibited by phosphorylation, and are activated by dephosphorylation. In contrast, the Na⁺-K⁺-2Cl[−] cotransporters introduce chloride into the cell, are inhibited by dephosphorylation, and are activated by phosphorylation (4). It has been proposed that KCCs/NKCCs must be tightly regulated by cell volume and/or [Cl[−]]_i by a kinase/phosphatase pair. We have shown that with-no-lysine kinase 3 (WNK3) possesses several properties that suggest it could be the Cl[−]/volume-sensitive regulatory kinase that, in association with protein phosphatases, reciprocally modifies the phosphorylation/dephosphorylation states of the SLC12 proteins and thus their activities (for review, see Ref. 10). WNK3 activates NKCCs by increasing their phosphorylation, even when cells are incubated in hypotonic medium, where normally they are inactivated (9, 10, 20, 21). In contrast, the coexpression of KCCs with WNK3 completely inhibits KCC function, even when cells are exposed to a hypotonic medium, in which the KCCs are normally active and dephosphorylated (2, 22). Interestingly, due to a D294A substitution, the catalytically inactive form of WNK3 not only loses its activating and inhibitory properties against the NKCCs and KCCs, respectively, but acquires the opposite properties. WNK3-D294A becomes a potent inhibitor of the Na⁺-coupled chloride cotransporters, inducing dephosphorylation even in hypertonic conditions in which NKCCs are activated, while it becomes a potent activator of KCCs, even in isotonic conditions in which they are usually inactive (2, 9, 10, 21). Under isotonic conditions, activation of the KCCs by the kinase-dead WNK3 can be reversed by calyculin or cyclosporine, implying the involvement of protein phosphatases in the process.

Four WNKs have been identified, two of which when mutated (WNK1 and WNK4) cause a form of salt-sensitive hypertension in humans known as pseudohypoaldosteronism type II or familial hyperkalemic hypertension (30). The mechanism by which WNKs affect blood pressure is, at least in part, due to their ability to modulate the activity of the renal thiazide-sensitive Na⁺-Cl[−] cotransporter, NCC (5, 6). As indicated above, WNK3 is an activator and WNK3-D294A is an inhibitor of NCC (21). In addition to several epithelial tissues, WNK3 is present in the brain, in which it is coexpressed with

* S. Cruz-Rangel and Z. Melo contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: G. Gamba, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico (e-mail: gamba@biomedicas.unam.mx).

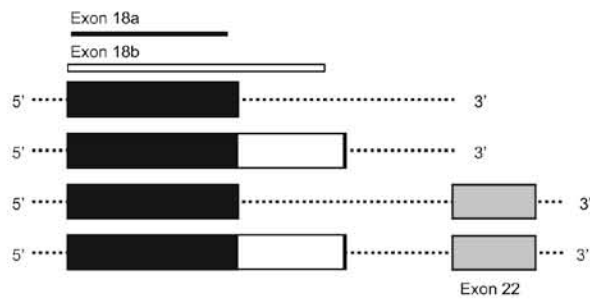


Fig. 1. Four potential variants of with-no-lysine kinase 3 (WNK3) are produced by alternative splicing. Exons 18b and 22 are exclusively present in central nervous system.

NKCC1/KCC2 in GABAergic neurons (9), positioning it as an important kinase for modulating neuronal activity. The *WNK3* gene encodes four putative alternatively spliced variants that are generated by the combination of two mutually exclusive exons 18 (18a and 18b), with the presence or absence of exon 22. As shown in Fig. 1, the potential isoforms are WNK3-18a, WNK3-18b, WNK3-18a+22, and WNK3-18b+22. Interestingly, exon 18b appears to be exclusively expressed in the central nervous system (CNS), while WNK3-18a is present in epithelial tissues (8). All functional studies discussed above were performed using the WNK3-18a epithelial variant (2, 9, 10, 21). However, a recent study suggested that the effects of WNK3-18a and WNK3-18b toward NCC are opposite; that is, activation by WNK3-18a and inhibition by WNK3-18b (7). This observation is probably irrelevant to NCC, because WNK18-b is not present in the kidney and NCC is not expressed in the CNS. However, if the WNK3-18a and WNK3-18b isoforms also produce opposite effects in the SLC12 members present in the CNS, these variants could represent a key regulatory kinase system for the excitability of GABAergic neurons. Thus, the present study was designed to investigate the functional differences of the four potential WNK3 variants on all members of the SLC12 gene family.

MATERIALS AND METHODS

Clones, Cloning, and Sequencing

The human *WNK3* cDNA clone containing exon 18a without exon 22 (isoform 3) used in this study was previously described (9, 21). A fragment of *WNK3* containing the 18b exon was amplified from a human fetal brain cDNA library (Clontech) using the Expand High Fidelity Plus PCR System (Roche) and pasted into the original human

WNK3 cDNA isoform 3. To this end, custom primers were designed beyond the unique restriction sites *Sru* I and *Dra* III flanking exon 18 of *WNK3* cDNA. The amplified fragment was digested with *Sru* I and *Dra* III and pasted into *WNK3* cDNA. Several cDNA colonies were obtained, and clones containing exon 18a or 18b were identified by automatic DNA sequencing. Then, by double-step PCR, the exon 22 sequence was inserted into both 18a and 18b cDNA clones. To obtain exon 22, double-step PCR was performed using the *WNK3* cDNA as template with the primers forward 5'-TCCTCAGATGCTTC-ACTTCCA-3' and reverse 5'-ATTTTCCAACATTTATAA-GGCAGCTTTCCCTGTAGCAACTATGCCATTGTCCACATGT-GTC-3' to amplify fragment A-B (1,188 and 1,325 bp) and the primers forward 5'-GGGAAAAGCTGCCTTATAAAATGAGTTGGAAAA-TCCACTGTGTGTGGAGAGTAATGCAGCATCATGC-3' and reverse 5'-GTGTAAGTTGGTATTATG-3' to amplify fragment C-D (759 and 793 bp). The second round of PCR was done using purified fragments A-B and C-D as templates, with external primers forward 5'-TCCTCAGATGCTTCACTTCCA-3' and reverse 5'-GTGTAAGTTG-TTATTATG-3' (1,947 and 2,118 bp) to obtain the A-D fragment containing exon 22. With a cut and paste, this fragment was inserted into the original *WNK3* cDNA harboring exon 18a or 18b. All the amplified fragments were sequenced to rule out unwanted mutations. Finally, the exon 18b and exon 22 cDNA fragments were also inserted into human *WNK3* cDNA in which aspartate 294 had previously been substituted to alanine (D294A) to render WNK3 catalytically inactive (9, 21).

The following cDNA clones of the SLC12A family used in this study were previously reported: NCC (3), NKCC1 (9), NKCC2 (3), KCC1 and KCC4 (17), KCC2b (24), KCC3a and KCC3b (18), KCC2a (26) was obtained by cutting and pasting KCC2 exon 1a amplified from the human fetal brain cDNA library in a process similar to that described above. KCC2a construction was verified by DNA sequencing.

In Vitro cRNA Translation

To prepare cRNA for microinjection, each of the wild-type or mutant cDNAs was linearized at the 3'-end with *Not* I, *Nhe* I, or *Xba* I from New England Biolabs (Carlsbad, CA) and transcribed in vitro, using the T7 RNA polymerase mMESSAGE mMACHINE (Ambion, Austin, TX) transcription system. cRNA product integrity was confirmed on agarose gels. cRNA concentration was determined by the absorbance reading at 260 nm (DU 640, Beckman, Fullerton, CA). cRNAs were stored in aliquots at -80°C until use.

Preparation of *Xenopus laevis* Oocytes

Adult female *Xenopus laevis* frogs were purchased from NASCO (Fort Atkinson, MI) and maintained under controlled light conditions at a water temperature of 18°C . The use of frogs as described was approved by the Institutional Committee for Animal Research. Oocytes were surgically collected from animals anesthetized by 0.17% tricaine immersion, incubated for 1 h with vigorous shaking in

Table 1. Effect of all wild-type-WNK3 variants on members of the SLC12 family

	Control	+WNK3-18a	Control	+WNK3-18b	Control	+WNK3-18a +22	Control	+WNK3-18b +22
NKCC1	195 ± 42	5,116 ± 551	208 ± 71	7,560 ± 767	139 ± 48	7,430 ± 907	275 ± 64	4,756 ± 282
NKCC2	4,160 ± 373	9,721 ± 708	4,160 ± 373	7,622 ± 419	5,342 ± 369	7,324 ± 740	5,342 ± 369	7,001 ± 519
NCC	2,379 ± 159	9,310 ± 473	2,016 ± 193	5,690 ± 595	1,353 ± 212	4,246 ± 325	2,513 ± 313	7,446 ± 701
KCC1	3,821 ± 372	518 ± 113	4,053 ± 294	933 ± 144	2,635 ± 354	2,752 ± 263	3,631 ± 372	1,077 ± 237
KCC2a	15,085 ± 943	1,038 ± 179	10,498 ± 656	2,975 ± 330	15,085 ± 943	3,967 ± 1,050	8,201 ± 567	3,253 ± 216
KCC2b	5,192 ± 365	1,617 ± 198	7,771 ± 606	1,305 ± 95	4,185 ± 619	2,455 ± 229	9,117 ± 576	3,650 ± 678
KCC3a	7,777 ± 859	1,398 ± 263	10,547 ± 972	1,129 ± 194	5,811 ± 565	2,894 ± 326	11,448 ± 1,391	848 ± 199
KCC3b	14,229 ± 1,399	38 ± 27	14,229 ± 1,399	164 ± 34	NA	NA	NA	NA
KCC4	10,724 ± 603	3,052 ± 232	11,327 ± 535	2,752 ± 193	10,264 ± 679	3,168 ± 280	12,120 ± 536	3,016 ± 320

Values are means ± SE. WNK3, with-no-lysine kinase 3; SLC12, solute carrier family 12; NKCC, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -coupled chloride cotransporter; NCC, Na^+ -coupled chloride cotransporter; KCC, K^+ -coupled chloride cotransporter; NA, not assessed.

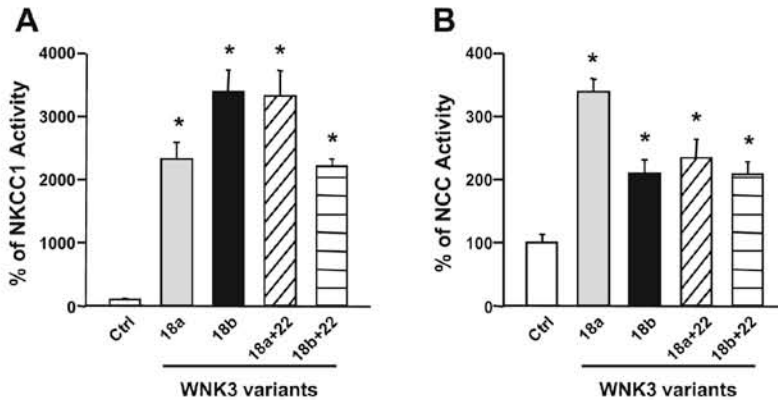


Fig. 2. Effects of wild-type WNK3 variants on the activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -coupled chloride cotransporter (NKCC1; A) and Na^+ -coupled chloride cotransporter (NCC; B). For this and the rest of the figures, basal activity in the absence of WNK3 was taken as 100%, and all data were normalized accordingly. Experiments for NKCC1 were performed in hypotonic conditions, hence, the very low activity in the control conditions. NKCC1- or NCC-expressing oocytes were coinjected with each of the WNK3 variant cRNAs, as indicated. * $P < 0.001$ vs. control (Ctrl).

a Ca^{2+} -free ND96 medium (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl_2 , and 5 HEPES/Tris, pH 7.4, plus 2 mg/ml collagenase A), washed four times in regular ND96, defolliculated by hand, and incubated overnight in ND96 at 16°C . On the next day, mature oocytes were injected with 50 nl of water or with water containing 0.1–0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of cRNA transcribed *in vitro* from the various constructs. Oocytes were incubated for 2–3 days before transport assays in ND96 at 16°C supplemented with 2.5 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin; this incubation medium was changed every 24 h. On the day of the experiment, oocytes were switched to Cl^- -free ND96 (in mM: 96 Na^+ isethionate, 2 K^+ gluconate, 6 Ca^{2+} gluconate, 1 Mg^{2+} gluconate, 5 HEPES/Tris, 2.5 sodium pyruvate, and 5 mg/100 ml gentamicin, pH 7.4) 2 h before the uptake assay.

Functional Assays with Cation/ Cl^- Cotransporters

Xenopus laevis oocytes were injected with cRNA of NCC, NKCC1, NKCC2, KCC1, KCC2a, KCC2b, KCC3a, KCC3b, or KCC4 alone or together with cRNA of wild-type or kinase-dead WNK3 isoforms. After 2–3 days of incubation, metolazone-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ (for NCC), bumetanide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ (for NKCC1

and NKCC2), or Cl^- -dependent $^{86}\text{Rb}^+$ uptake (for KCCs) was determined following our standard procedures (1, 2, 17, 20). In brief, NCC measurements were performed under isotonic conditions. NKCC1 and NKCC2 uptake experiments were done in two different osmolar conditions: hypotonicity (160 mosM/kg H_2O) and hypertonicity (260 mosM/kg H_2O) for inhibition and activation of the cotransporters, respectively. KCC activity was also performed in two different conditions: hypotonicity (110 mosM/kg H_2O) and isotonicity (200 mosM/kg H_2O) for activation and inhibition, respectively. Sucrose was used to increase the osmolarity of the solutions while maintaining ionic strength and ion concentrations (see below).

Throughout the experiments, ouabain was used to inhibit the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, amiloride to block the Na^+ channels, bumetanide to prevent activity of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter, and metolazone to inhibit the $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter. The desired concentration of the inhibitor was present during both the incubation and uptake periods, except when noted.

Bumetanide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ uptake assays. Bumetanide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ uptake assays were used to measure the activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -

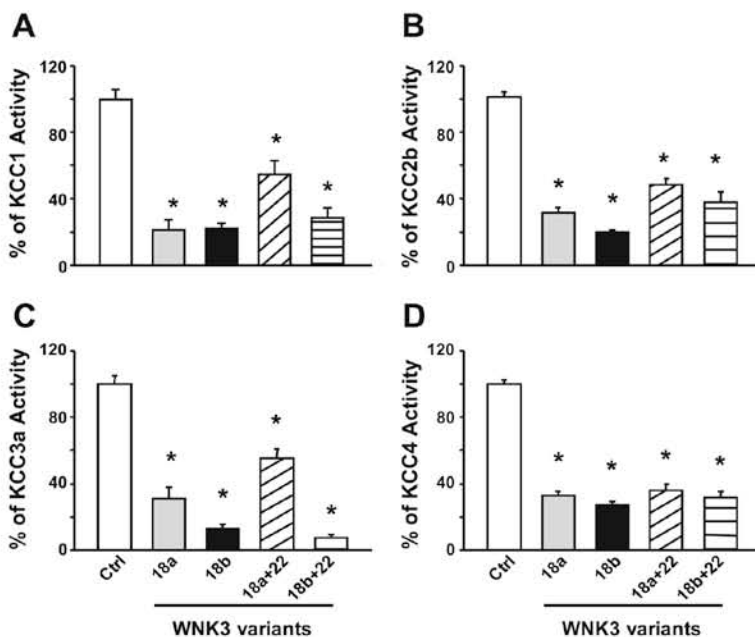


Fig. 3. Effects of wild-type WNK3 variants on the activities of K^+ -coupled chloride cotransporter KCC1 (A) KCC2b (B), KCC3a (C), and KCC4 (D). Experiments were performed in hypotonic conditions. KCC cRNAs were injected alone or together with each of the WNK3 variant cRNAs, as indicated. * $P < 0.001$ vs. control.

Table 2. Effect of all catalytically inactive forms of WNK3 variants on members of the SLC12 family

	Control	+ WNK3-18a	Control	+ WNK3-18b	Control	+ WNK3-18a +22	Control	+ WNK3-18b +22
NKCC1	8,518 ± 880	2,839 ± 310	7,048 ± 425	3,294 ± 218	10,263 ± 1,793	1,260 ± 175	7,858 ± 681	3,440 ± 166
NKCC2	6,190 ± 328	1,800 ± 183	6,190 ± 328	1,864 ± 433	NA	NA	NA	NA
NCC	3,505 ± 461	124 ± 155	1,145 ± 176	724 ± 120	2,557 ± 262	1,010 ± 181	6,289 ± 658	1,897 ± 482
KCC1	156 ± 21	627 ± 120	150 ± 16	542 ± 156	22 ± 27	786 ± 207	106 ± 16	139 ± 30
KCC2a	1,881 ± 291	6,235 ± 1,056	1,282 ± 174	1,162 ± 154	2,257 ± 476	7,289 ± 1,589	1,282 ± 174	1,207 ± 201
KCC2b	544 ± 39	1,529 ± 165	418 ± 30	374 ± 36	635 ± 78	2,994 ± 587	353 ± 37	239 ± 42
KCC3a	363 ± 58	714 ± 172	178 ± 27	278 ± 78	477 ± 104	795 ± 151	199 ± 50	62 ± 37
KCC4	546 ± 99	1,554 ± 285	558 ± 109	645 ± 176	928 ± 180	5,686 ± 1,556	895 ± 221	1,186 ± 370

Values are means ± SE. NA, not assessed.

2Cl^- cotransporters (NKCC1/2) expressed in *Xenopus laevis* oocytes in slightly hypotonic (160 mosM, basal NKCC1/2 activity) or hypertonic (260 mosM, maximally stimulated NKCC1/2 activity) conditions. Oocytes were incubated for 30 min in a Cl^- -free medium (in mM: 62 Na^+ gluconate, 10 K^+ gluconate, 4.6 Ca^{2+} gluconate, 1 Mg^{2+} gluconate, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and either 160 or 260 mosM/kgH₂O) containing 1 mM ouabain and then transferred to the uptake medium (in mM: 63 NaCl, 10 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and either 160 or 260 mosM/kgH₂O) containing 1 mM ouabain plus 1 μCi $^{86}\text{Rb}^+$ /ml for 1 h. To determine the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake due to NKCC1/2, parallel groups of oocytes were exposed to the same uptake medium, but in the presence of 0.1 mM bumetanide.

Tracer of metolazone-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake. Tracer of metolazone-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake was used to assess the Na^+ - Cl^- cotransporter (NCC) activity in isotonic conditions. A 30-min preincubation period in a Cl^- -free medium (in mM: 96 Na^+ isethionate, 2 K^+ gluconate, 1.8 Ca^{2+} gluconate, 1 Mg^{2+} gluconate, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and 210 mosM/kgH₂O) supplemented with 1 mM ouabain, 0.1 mM amiloride, and 0.1 mM bumetanide was followed by a 60-min uptake period in a K^+ -free medium (in mM: 40 NaCl, 56 *N*-methyl-D-glucamine-chloride, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and 210 mosM/kgH₂O) containing 1 mM ouabain, 0.1 mM amiloride, and 0.1 mM bumetanide plus 2 μCi of $^{22}\text{Na}^+$ /ml. To determine the $^{22}\text{Na}^+$ uptake due to NCC, parallel groups of oocytes were exposed to the same uptake medium, but in the presence of 0.1 mM metolazone.

K^+ - Cl^- cotransport assessment by measuring Cl^- -dependent $^{86}\text{Rb}^+$ uptake. K^+ - Cl^- cotransport was assessed by measuring Cl^- -dependent $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in oocytes under both isotonic and hypotonic conditions. A 30-min incubation period in a Na^+ -free, Cl^- -free medium (in mM: 50 *N*-methyl-D-glucamine gluconate, 10 K^+ gluconate, 4.6 Ca^{2+} gluconate, 1 Mg^{2+} gluconate, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4) containing 1 mM ouabain was followed by a 60-min uptake period in a Na^+ -free medium (in mM: 50 *N*-methyl-D-glucamine-Cl, 10 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4) supplemented with 1 mM ouabain and 1 μCi of $^{86}\text{Rb}^+$ /ml. The removal of

extracellular Na^+ prevented $^{86}\text{Rb}^+$ uptake via the endogenous Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake due to the KCCs was determined by exposing groups of oocytes to Cl^- -free uptake medium in which Cl^- was substituted with gluconate.

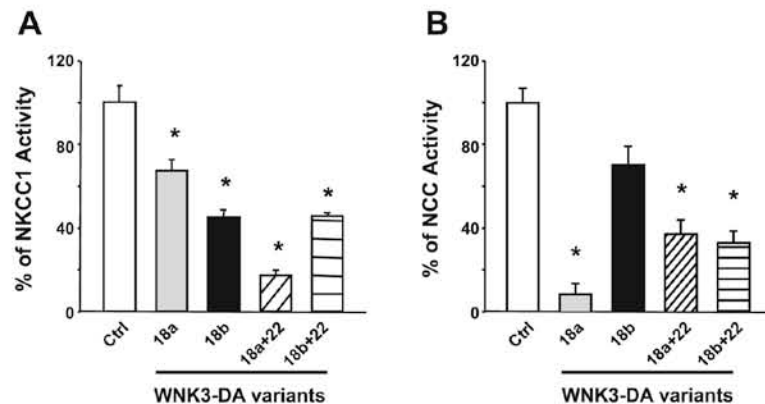
All uptake measurements were performed at 32°C. At the end of the uptake period, oocytes were washed three times in ice-cold uptake solution without isotope to remove extracellular fluid tracer. Oocytes were dissolved in 10% SDS, and tracer activity was determined for each oocyte by β -scintillation counting. All uptake experiments were performed at least three times and included at least 10 oocytes in each experimental group; statistical significance was defined as two-tailed $P < 0.05$, and results are reported as means ± SE. The uptake observed in control groups was taken as 100%, and experimental groups were normalized accordingly. The significance of the differences between groups was tested by one-way ANOVA with multiple comparisons using Bonferroni corrections.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of WNK3 Variants on the Sodium-Coupled Chloride Cotransporters

We have previously shown that WNK3-18a is a potent activator of all three sodium-coupled chloride cotransporters: NKCC1 (9), NKCC2, and NCC (21). The activation of NCC by WNK3-18a has been corroborated by other groups (7, 32). In the present study, we tested the effects of all potential WNK3 variants on the activity of these cotransporters. For NKCC1, we performed the experiments using hypotonic conditions, in which this cotransporter is maximally inhibited (9). Three experiments were performed for each of the WNK3 isoforms' effects on NKCC1. The bumetanide-sensitive basal uptake for NKCC1 in control conditions and in the presence of each of the WNK3 variants are depicted in Table 1. While the

Fig. 4. Effects of catalytically inactive WNK3-D294A (DA) variants on the activities of NKCC1 (A) and NCC (B). Experiments for NKCC1 were performed in hypertonic conditions, hence, the high activity in the control group. NKCC1- or NCC-expressing oocytes were coinjected with each of the WNK3 variant cRNAs, as indicated. * $P < 0.001$ vs. control.



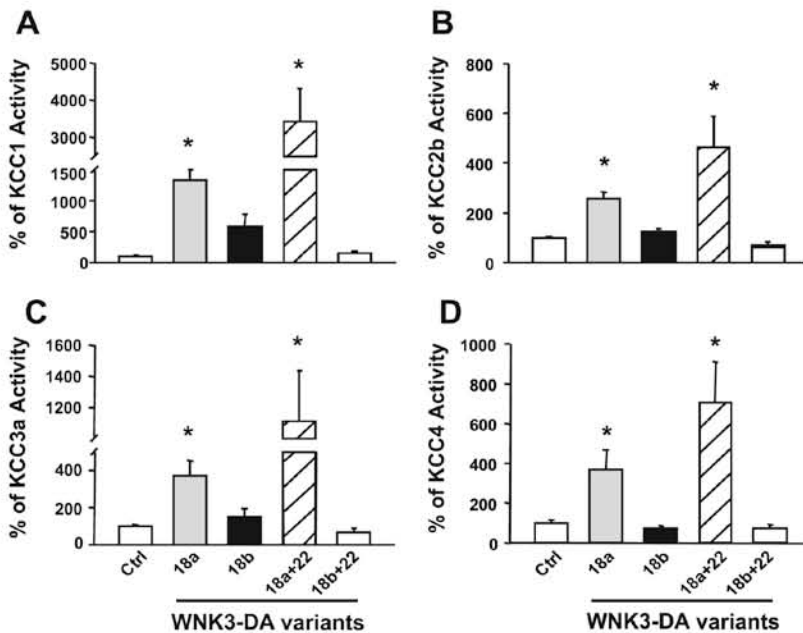


Fig. 5. Effects of catalytically inactive WNK3-D294A variants on the activities of KCC1 (A), KCC2b (B), KCC3a (C), and KCC4 (D). Experiments were performed in isotonic conditions. KCC cRNAs were injected alone or together with each of the WNK3 variant cRNAs, as indicated. * $P < 0.001$ vs. control.

uptake through NKCC1 in control conditions varied from 139 to 275 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, in the presence of any of the WNK3 variants, the uptake increased above 1,500 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹. As shown in Fig. 2A, the percentage increase for NKCC1 in the presence of WNK3-18a was 2,330 ± 255, of WNK3-18b was 3,383 ± 244, of WNK3-18a+22 was 3,320 ± 405, and of WNK3-18b+22 was 2,217 ± 567. Although WNK3-18b+22 was the variant that induced the weakest activation of NKCC1, it still increased activity by 1,500% when compared with control.

A similar situation occurred for NCC activation by the WNK3 variants. At least three experiments were performed for NCC with each of the WNK3 constructs. Table 1 shows the thiazide-sensitive ²²Na⁺ uptake obtained in experiments using each isoform. As shown in Fig. 2B, the activity of NCC was significantly increased by any isoform. The NCC activity was increased to 337 ± 21%, 209 ± 21%, 234 ± 30%, and 208 ± 19% by WNK3 variants 18a, 18b, 18a+22, and 18b+22, respectively. Note that isoform WNK3-18b+22, previously suggested to inhibit the activity of NCC (7), induced a similar level of activation as the other variants. Finally, we tested the effects of isoforms WNK3-18a and WNK3-18b on the ⁸⁶Rb⁺ uptake induced by NKCC2 in *Xenopus laevis* oocytes under hypotonic conditions. As shown in Table 1, similar to the observations for NKCC1, WNK3-18a or WNK3-18b significantly increased the activity of NKCC2.

There is no clear explanation for the discrepancies between our observations with WNK3-18b or WNK3-18b+22 and NCC and those of Glover et al. (7). WNKs are complex kinases that are still poorly understood, but it seems that minimal disruption of their primary structures can prevent or switch their mode of action toward a particular target (13, 23, 29, 32). For instance, although the effect of WNK3-18a on NCC is clearly dependent on its kinase activity, Yang et al. (32) have shown that a similar effect can be obtained by

the WNK3 carboxyl terminal domain in the complete absence of the kinase domain. For this reason, all WNK variants used in this study were completely sequenced to avoid any unwanted mutations that could result in truncated or altered proteins. In addition, our data on WNK3-18b activation of NCC are fully supported by the fact that we observed the corresponding behavior of this variant toward NKCC1 and all other members of the SLC12A family (see below). Thus, our data reveal that WNK3 is a potent activator of the sodium-coupled chloride cotransporters of the SLC12A family, regardless of the type of exon 18 and/or of the presence or absence of exon 22.

Effects of WNK3 Variants on the Potassium-Coupled Chloride Cotransporters

We have previously observed that WNK3-18a is a powerful inhibitor of all four K⁺-Cl⁻ cotransporters, even when oocytes are incubated in hypotonic conditions in which KCCs are maximally activated (2, 9, 10). In the present study, we analyzed the effects of the four WNK3 variants on all KCCs in simultaneous experiments, including the two known variants of KCC2 and KCC3. The chloride-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake for each group, in the absence or presence of WNK3 isoforms, is shown in Table 1. Consistent with our conclusion that WNK3 isoforms activate all sodium-coupled chloride cotransporters, we observed that when coinjected in *Xenopus laevis* oocytes, all four WNK3 isoforms induced a significant decrease of KCC activity. As shown in Fig. 3, the percentage of KCC inhibition varied between 60 and 90%. The weakest effect was observed for WNK3-18a+22 on KCC1, in which the degree of inhibition was ~50%. Thus, the type of exon 18 or the absence or presence of the exon 22 sequence does not affect the inhibitory effect of WNK3 on the K⁺-Cl⁻ cotransporters.

Effects of the Catalytically Inactive WNK3 Variants on the Cation-Coupled Chloride Cotransporters

Elimination of the catalytic activity of WNK3 by substituting aspartate 294 to alanine within the kinase domain (WNK3-D294) has interesting consequences on the effects of WNK3 on SLC12 family members. We have shown using WNK3-18a that the D294A substitution not only prevents the positive or negative effects of WNK3 on NKCCs or KCCs, respectively, but completely reverses these effects of WNK3 (2, 9, 20, 21). In the present study, we assessed the consequences of eliminating the catalytic activity in all WNK3 isoforms on their effects on the cotransporters. As shown in Table 2 and Fig. 4A, coinjection of NKCC1 and catalytically inactive WNK3-D294A isoforms resulted in significant inhibition of NKCC1 activity. These experiments were performed in hypertonic conditions in which NKCC1 is maximally activated. The bumetanide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ uptake induced by NKCC1 in control conditions varied from $7,048 \pm 425$ to $10,263 \pm 1,793$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. The uptake was reduced by WNK3-D294A isoforms as follows: $2,839 \pm 310$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ by WNK3-18a ($P < 0.001$); $3,294 \pm 218$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ by WNK3-18b ($P < 0.001$); $1,260 \pm 175$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ by WNK3-18a+22 ($P < 0.001$); and $3,440 \pm 166$ pmol-oocyte $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ by WNK3-18b+22 ($P < 0.001$). Thus, even in conditions that normally maximally increase the activity of the NKCC1 cotransporter, any of the WNK3-D294A isoforms was able to reduce its function. Similar observations were made for NCC (Fig. 4B). The basal activity of NCC in isotonic conditions was decreased by all WNK3-D294A isoforms, although the weakest effect was observed with WNK3-18b.

Figure 5 depicts the effects of WNK3-D294A isoforms on all four $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporters. As shown before (2, 9, 10), elimination of the catalytic activity in WNK3-18a or WNK3-18b resulted in significant activation of the KCCs in isotonic conditions. When expressed in *Xenopus laevis* oocytes under isotonic conditions, KCCs are usually completely inactive [with the exception of a slight basal activity of KCC2 (24)], and KCC activation due to exposure of cells to hypotonicity is caused by dephosphorylation of the cotransporter (22). Our observation that catalytically inactive WNK3 activates the KCCs in isotonic conditions strongly suggests that the presence of the inactive kinase dephosphorylates the KCCs, thus activating them. Evidence suggests that this involves protein phosphatases 1 and/or 2B (2). Interestingly, this is the only effect of WNK3 variants in which we found a difference between isoforms because, as shown in Fig. 5, the presence of exon 22 precluded the activation of the KCCs by the catalytically inactive WNK3-D294A variants.

Although all WNK3 variants increased the activity of NKCC1 or NCC, it is worth notice that the degree of the effect is different among isoforms and cotransporters. Figure 6 illustrates this issue. In the absence of exon 22, it is evident that wild type and catalytically inactive isoforms 18a and 18b exhibits opposite pattern when NKCC1 and NCC are compared. For NKCC1, the activating effect of WNK3-18b or the inhibitory effect of its catalytically inactive version was significantly higher than corresponding 18a variants (Fig. 6A). In contrast, in the case of NCC, the 18a variants were higher than the 18b isoforms (Fig. 6B). Interestingly, these

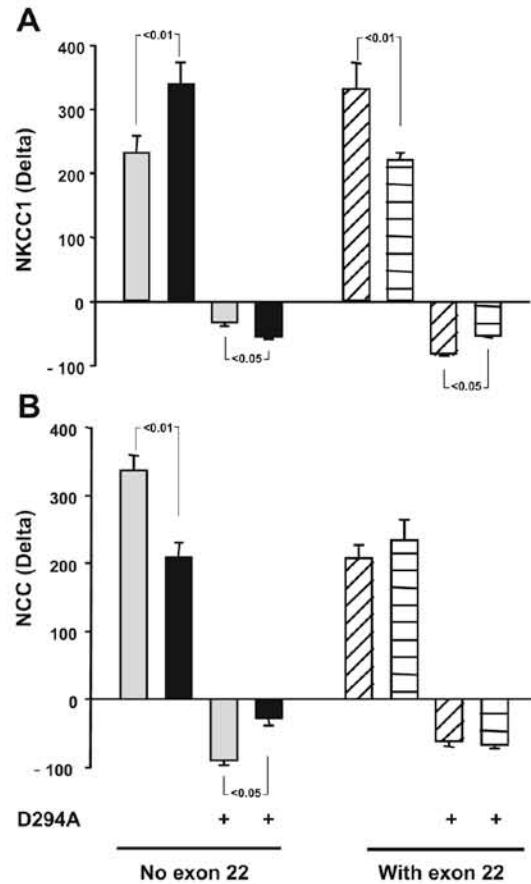


Fig. 6. Difference in the pattern of effect of WNK3 variants between NKCC1 and NCC. Shown is delta of effect on NKCC1 (A) or NCC (B) by WNK3-18a (gray bars) or WNK3-18b (black bars) with or without catalytic activity, as stated, and by WNK3-18a+22 (diagonal dashed bars) or WNK3-18b+22 (horizontal dashed bars), with or without catalytic activity, as stated.

differences are changed or eliminated by the presence of exon 22. In the case of NKCC1, the presence of exon 22 makes more prominent the effect of the variant 18a than 18b (with or without catalytic activity), while the differences observed for NCC, in the absence of exon 22, disappeared in its presence. These observations suggest that sequences within WNK3 can enhance or decrease the interaction with the cotransporters, which could end up in modulating the degree of the final effect. The relevance of this behavior will depend on the expression of each isoform in the cell of interest. For instance, the differences observed for NKCC1 could be of relevance since this cotransporter is present in CNS where both WNK3-18a and WNK3-18b, as well as the exon 22 variants, are expressed (8).

Taken together, the data from Tables 1 and 2 and Figs. 2 through 5 clearly show that all WNK3 isoforms are potent regulators of all members of the SLC12A family, and as such, WNK3 bypasses the tonicity requirements for the cotransporter's activation/inhibition. When NKCC1 or KCCs should be maximally active (hypertonicity and hypotonicity, respectively) the presence of the inactive WNK3s for NKCC1 and the

wild-type WNK3s for KCCs results in almost complete inhibition of the cotransporters. In contrast, under conditions in which NKCC1 or KCCs are maximally inhibited (hypotonicity and isotonicity, respectively), the presence of wild-type WNK3s for NKCC1 and inactive WNK3s for KCCs results in activation of the cotransporters. For these reasons, we have proposed that WNK3 could be a cell volume-regulated kinase that, by modulating the activities of the cation-coupled chloride cotransporters, permits the appropriate response to a change in the osmolar environment.

WNKs have been proposed to have many functions besides the modulation of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters, including regulating basic cellular processes such as mitosis (25), apoptosis (27) and neoplastic transformation (19), regulating synaptotagmin 2 (15), and interacting with many other kinases, like TGF- β (14), MAP kinases (31), and the STE20-related alanine/proline-rich kinases SPAK and OSR1 (28) (for an excellent review, see Ref. 16). Thus, there are several possibilities for functional differences among WNK3 isoforms besides their effects on the SLC12 transporters that should be explored.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all members of the Molecular Physiology Unit for suggestions and stimulating discussion.

GRANTS

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Grants 59992 and 132503 (to G. Gamba and A. Mercado, respectively). S. Cruz-Rangel and Z. Melo were supported by a scholarship from CONACYT-Mexico and are graduate students in the Biomedical Science and Biochemical Science PhD programs, respectively, of the Universidad Nacional Autónoma de México.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

- Castaneda-Bueno M, Vazquez N, Bustos-Jaimés I, Hernández D, Rodríguez-Lobato E, Pacheco-Alvarez D, Carino-Cortés R, Moreno E, Bobadilla NA, Gamba G. A single residue in transmembrane domain 11 defines the different affinity for thiazides between mammalian and flounder NaCl transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1111–F1119, 2010.
- De Los Heros P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, Mount DB, Lifton RP, Hebert SC, Gamba G. WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1976–1981, 2006.
- Gamba G, Miyanooshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, 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.
- Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423–493, 2005.
- 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.
- Gamba G. The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F838–F848, 2009.
- Glover M, Zuber AM, O'Shaughnessy KM. Renal and brain isoforms of WNK3 have opposite effects on NCCT expression. *J Am Soc Nephrol* 20: 1314–1322, 2009.
- Holden S, Cox J, Raymond FL. Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). *Gene* 335: 109–119, 2004.
- Kahle KT, Rinehart J, De los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP. WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16783–16788, 2005.
- Kahle KT, Rinehart J, Ring A, Gimenez I, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP. WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda)* 21: 326–335, 2006.
- Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4: 490–503, 2008.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78: 247–306, 1998.
- Lazrak A, Liu Z, Huang CL. Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006.
- Lee BH, Chen W, Stippes S, Cobb MH. Biological cross-talk between WNK1 and the transforming growth factor beta-Smad signaling pathway. *J Biol Chem* 282: 17985–17996, 2007.
- Lee BH, Min X, Heise CJ, Xu BE, Chen S, Shu H, Luby-Phelps K, Goldsmith EJ, Cobb MH. WNK1 phosphorylates synaptotagmin 2 and modulates its membrane binding. *Mol Cell* 15: 741–751, 2004.
- McCormick JA, Ellison DH. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev* 91: 177–219, 2011.
- Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB, Gamba G. Functional Comparison of the K⁺-Cl⁻ cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem* 275: 30326–30334, 2000.
- Mercado A, Vazquez N, Song L, Cortes R, Enck AH, Welch R, Delpire E, Gamba G, Mount DB. Amino-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1246–F1261, 2005.
- Moniz S, Jordan P. Emerging roles for WNK kinases in cancer. *Cell Mol Life Sci* 67: 1265–1276, 2010.
- Ponce-Coria J, San Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, De los Heros P, Juarez P, Munoz E, Michel G, Bobadilla NA, Gimenez I, Lifton RP, Hebert SC, Gamba G. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8458–8463, 2008.
- Rinehart J, Kahle KT, De los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G, Lifton RP. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16777–16782, 2005.
- Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, Risinger M, Pan W, Wu D, Colangelo CM, Forbush B, Joiner CH, Gulcicek EE, Gallagher PG, Lifton RP. Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell* 138: 525–536, 2009.
- San Cristobal P, Ponce-Coria J, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G. WNK3 and WNK4 amino terminal domain defines their effect on the renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1199–F1206, 2008.
- Song L, Mercado A, Vazquez N, Xie Q, Desai R, George AL, Gamba G, Mount DB. Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res* 103: 91–105, 2002.
- Tu SW, Bugde A, Luby-Phelps K, Cobb MH. WNK1 is required for mitosis and abscission. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1385–1390, 2011.
- Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Pruunsild P, Kaila K, Delpire E, Timmusk T, Rivera C, Airaksinen MS. A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Biol Chem* 282: 30570–30576, 2007.
- Verissimo F, Silva E, Morris JD, Pepperkok R, Jordan P. Protein kinase WNK3 increases cell survival in a caspase-3-dependent pathway. *Oncogene* 25: 4172–4182, 2006.
- Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome,

- phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391: 17–24, 2005.
29. **Wang HR, Liu Z, Huang CL.** Domains of WNK1 kinase in the regulation of ROMK1. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F438–F445, 2008.
30. **Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP.** Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107–1112, 2001.
31. **Xu BE, Stippec S, Lenertz L, Lee BH, Zhang W, Lee YK, Cobb MH.** WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. *J Biol Chem* 279: 7826–7831, 2004.
32. **Yang CL, Zhu X, Ellison DH.** The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest* 117: 3403–3411, 2007.



XII. APENDICE III

Pflugers Arch - Eur J Physiol (2008) 455:859–872
DOI 10.1007/s00424-007-0343-y

CELL AND MOLECULAR PHYSIOLOGY

Thrombin increases hyposmotic taurine efflux and accelerates $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ and RVD in 3T3 fibroblasts by a src-dependent EGFR transactivation

E. Vázquez-Juárez · G. Ramos-Mandujano ·
R. A. Lezama · S. Cruz-Rangel · L. D. Islas ·
H. Pasantes-Morales

Received: 30 April 2007 / Revised: 3 September 2007 / Accepted: 5 September 2007 / Published online: 27 September 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The present study in Swiss3T3 fibroblasts examines the effect of thrombin on hyposmolarity-induced osmolyte fluxes and RVD, and the contribution of the src/EGFR pathway. Thrombin (5 U/ml) added to a 30% hyposmotic medium markedly increased hyposmotic ^3H -taurine efflux (285%), accelerated the volume-sensitive Cl^- current ($\text{ICI}_{\text{swell}}^-$) and increased RVD rate. These effects were reduced (50–65%) by preventing the thrombin-induced intracellular Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i rise with EGTA-AM, or with the phospholipase C (PLC) blocker U73122. Ca^{2+} calmodulin (CaM) and calmodulin kinase II (CaMKII) also participate in this Ca^{2+} -dependent pathway. Thrombin plus hyposmolarity increased src and EGFR phosphorylation, whose blockade by PP2 and AG1478, decreased by 30–50%, respectively, the thrombin effects on hyposmotic taurine efflux, $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ and RVD. Ca^{2+} - and src/EGFR-mediated pathways operate independently as shown by (1)

the persistence of src and EGFR activation when [Ca^{2+}]_i rise is prevented and (2) the additive effect on taurine efflux, $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ or RVD by simultaneous inhibition of the two pathways, which essentially suppressed these events. PLC- Ca^{2+} - and src/EGFR-signaling pathways operate in the hyposmotic condition and because thrombin per se failed to increase taurine efflux and $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ under isosmotic condition it seems that it is merely amplifying these previously activated mechanisms. The study shows that thrombin potentiates hyposmolarity-induced osmolyte fluxes and RVD by increasing src/EGFR-dependent signaling, in addition to the Ca^{2+} -dependent pathway.

Keywords Thrombin · Volume regulation · Volume · Taurine · Swelling-activated chloride channel · Swelling

Introduction

The regulatory volume decrease (RVD) is a complex adaptive phenomenon by which cells recover their volume after swelling elicited by extracellular osmolarity reductions. RVD is accomplished by the extrusion of intracellular osmolytes followed by osmotically obligated water. K^+ , Cl^- and organic small molecules, notably amino acids, polyalcohols and amines, are the solutes compromised in RVD achievement. The corrective osmolyte efflux requires at least three main steps: (1) sensing volume changes, (2) volume transduction signaling and (3) activation of the osmolyte efflux pathways [16, 19, 35]. In recent years, elements of the osmosensing and signaling chains have been identified and their functional integration and interplay start to be delineated. Integrins, Ca^{2+} and a number of tyrosine kinases are part of this signaling network connecting volume change and adaptive osmolyte fluxes [13, 17, 19]. All

E. Vázquez-Juárez · G. Ramos-Mandujano · S. Cruz-Rangel ·
H. Pasantes-Morales
Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México, DF, México

L. D. Islas
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México, DF, México

R. A. Lezama
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
Instituto Politécnico Nacional,
04510 México, DF, México

H. Pasantes-Morales (✉)
Instituto de Fisiología Celular, UNAM,
México, DF 04510, México
e-mail: hpasante@ifc.unam.mx

these are sites for potential modulation of elements from other signaling chains.

In many cell types, an increase in $[Ca^{2+}]_i$ is consistently associated with hyposmotic swelling [28], but its contribution to RVD seems to be cell specific. Even in cells which do not require a $[Ca^{2+}]_i$ response to perform RVD, an increase in $[Ca^{2+}]_i$ has a modulatory role [28]. Still, in these cells, higher $[Ca^{2+}]_i$ elevations have a modulatory role enhancing RVD efficiency due to a Ca^{2+} -dependent potentiation of osmolyte fluxes. This has been shown for Cl^- and taurine when $[Ca^{2+}]_i$ is enhanced by treatment with ionomycin [3, 11]. The question raised is of whether increasing $[Ca^{2+}]_i$ by physiological mechanisms such as the activation of G protein-coupled receptors (GPCR), is able to evoke the same response as the ionophores, i.e., increasing osmolyte fluxes. The early study by Bender et al. [2] in astrocytes showed that a number of GPCR ligands have a potent effect increasing RVD efficiency. More recent studies have shown effects of GPCR activation enhancing osmolyte fluxes in hyposmotically swollen cells via a PLC- Ca^{2+} -CaM-CaMKII-dependent pathway. Activation of purinergic [10], muscarinic [15], noradrenergic [31] and PAR receptors [5] increases hyposmotic taurine efflux in 3T3 fibroblasts, SH-SY5Y neuroblastoma, cells fish erythrocytes and astrocytoma cells. Glutamate (D-aspartate) efflux is similarly potentiated by activation of purinergic, muscarinic and PAR receptors in cultured astrocytes and in SH-SY5Y neurons [15, 25, 30]. Thrombin has also an effect on the volume-activated Cl^- current (ICl^-_{swell}) and on hyposmotic Cl^- fluxes [4, 23, 32]. Noteworthy, the GPCR-elicited Ca^{2+} -dependent signaling contributes only in part to the taurine or glutamate efflux potentiation, and this dependence shows marked variations according to the cell type and the receptor activated. Therefore, other Ca^{2+} -independent mechanisms have to participate in the modulatory actions of GPCR. Tyrosine kinases may be elements of this Ca^{2+} -independent mechanisms.

Since the early study by Tilly et al. [33], it is known that a variety of tyrosine kinases are activated in cells swollen by hyposmolarity. Phosphorylation of cytosolic tyrosine kinases as well as those located in membrane receptors such as EGFR, occurs in response to hyposmotic swelling, and influence osmolyte fluxes [9, 27]. Concurrently, evidence in the last decade has shown a link between GPCR and some of these tyrosine kinases, an interaction currently named transactivation [7, 22]. This mechanism may account for the Ca^{2+} -independent fraction of the GPCR-evoked enhancement of RVD events. This possibility was tested in the present study in fibroblasts in which the effect of thrombin was examined on taurine efflux, ICl^-_{swell} and RVD. Contributions to this effect of the Ca^{2+} -dependent pathway and of a src-linked transactivation of EGFR were investigated.

Materials and methods

Reagents

Tyrphostin AG1478, PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazol [3,4-*d*] pyrimidine), U73122 and Gö6976 were from Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA. 3H -taurine was from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). All salts for preparation of medium solutions were from J.T. Baker, México. The antibodies used, anti-phospho EGFR (pTyr 1173) and anti-phospho c-src (pTyr 416) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), and secondary antibody goat anti-rabbit IgG tagged with fluorescein isothiocyanate (FITC) or horseradish peroxidase (HRP) conjugated were from Zymed (San Francisco, CA, USA). Fluorescent mounting medium was from Dako North America (Carpinteria CA, USA). Complete proteinase inhibitor cocktail tablets were obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Chemiluminescent HRP substrate (Immobilon Western) was from Millipore (Billerica, MA, USA). PPACK (D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone), synthetic peptide SFFLRN, formaldehyde, Ponceau S, NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)-benzoic acid) and other reagents were from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Thrombin was from Vital Products (Boynton Beach, FL, USA).

Cell cultures

Stock cultures of Swiss 3T3 fibroblasts (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were maintained in Eagle Basal Medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin, in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and 95% air at 37°C. For experimental purposes, Swiss 3T3 cells were plated in 100-mm dishes at 7×10^5 cells/dish density for western blot immunoassays, 35-mm dishes at 1.5×10^5 cells/dish for radiolabeled taurine fluxes and in rounded coverglasses at 1×10^4 cells/dish for immunofluorescence preparations, and used after 2–3 days when the cells were confluent or subconfluent (immunofluorescence).

Solutions and drugs

Isosmotic medium contained (in millimolar): 135 NaCl, 5 KCl, 1.17 $MgSO_4$, 1 $CaCl_2$, 5 glucose and 10 HEPES, pH 7.4, with an osmolarity of 300 mOsm. Hyposmotic solutions (30% reduction, H30%: 210 mOsm) were prepared by reducing the concentration of NaCl. Medium osmolarities were determined with a freezing point osmometer (Osmette A, Precision Systems, Natick, MA, USA).

For drug treatment, preincubation time was 30 min and agents were present throughout the experiment. Control cells were always treated in parallel with the vehicle used to solubilize the tested drugs.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells were grown on glass coverslips in complete medium, and after 24 h serum starved were rinsed in isosmotic medium, then submitted to the experimental conditions and fixed with 3.7% formaldehyde at room temperature for 20 min. Cells were permeabilized by 3 min treatment with 0.5% triton X-100 and then blocked with 0.5% bovine serum albumin in PBS (PBS/BSA) for 30 min. Cells were incubated overnight with the first antibody diluted 1:25 in PBS/BSA. After incubation, cells were rinsed with PBS and the secondary antibody goat anti-rabbit IgG tagged with FITC was added for 1 h at room temperature (1:50 dilution with PBS/BSA). After rinsing with PBS, the coverslips were mounted on glass slides containing 50 μ l fluorescent mounting medium for observation in a confocal laser microscope (BIO RAD, CA, USA). The fluorescence intensity was analyzed using the program Image-pro plus 5.0. Five fields containing 10–15 cells per each independent experiment were analyzed.

Western blot analysis

Cells were grown on Petri dishes and after 24 h serum starved were submitted to the experimental conditions; then, they were lysed with ice cold cell lysis buffer containing 270 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM *ortho*-vanadate, 1 mM β -glycerol phosphate, 5 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 1% Nonidet-P40, 1% β -mercaptoethanol, 20 mM Tris and protease inhibitors, and cells were gently detached with a rubber policeman. The whole lysate was sonicated (three 30-s cycles) and centrifuged at 10,000 rpm 10 min at 4°C. Protein concentration in the supernatant was determined by the procedure of Bradford. Total lysate was fractionated by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted to nitrocellulose membranes. Protein loading was routinely checked by staining membranes with Ponceau S. Blots were blocked with 5% skim milk in TBS-T and then probed with the indicated antibodies (1: 1,000 dilution) overnight at 4°C. Blots were washed four times (5 min each) with TBS and incubated for 1 h in a 1:4,000 dilution of peroxidase-conjugated anti-IgG, washed with TBS and developed with Chemiluminescent HRP substrate. Quantification of the immunoblot reactive bands was done by scanning the blots fluorographies from at least five independent experiments of the same type. Integration of the areas

under the curves was performed by the gel analysis software (ImageJ 1.36b NIH, USA).

³H-Taurine release experiments

Swiss 3T3 fibroblasts were preloaded with ³H-taurine (0.5 μ Ci/ml) for 1 h in isosmotic medium. After incubation, cells were washed for 8 min with isosmotic medium and superfused at 1 ml/min for 5 min, after which a stable efflux baseline was attained. The isosmotic medium was replaced by the experimental medium and samples were collected (1 ml/min) for 8 min. At the end of the experiments, cells were scraped and the radioactivity remaining in cells and in the collected samples determined in a liquid scintillation counter. Results are expressed as radioactivity released per minute expressed as percentage of the total incorporated during loading.

Measurement of changes in cell volume

Cell volume changes in the experimental conditions were estimated as the cell volume increase relative to volume in isosmotic conditions. Assays were carried out using a large-angle light scattering system according to McManus et al. [24]. 3T3 cells were cultured on rectangular coverglasses (10 \times 50 mm) at 90% confluence at the time of experiments. Coverglasses were placed at a 50° angle relative to the incident light on a superfusion chamber inside of a cuvette filled with isosmotic medium (300 mOsm) in an Fluoromax-3 Horiba luminescence spectrometer. Sudden changes in osmolarity were made by addition of H₂O to isosmotic medium. Cells were illuminated with an Argon-arc lamp and light scattering was detected at the same wavelength. Data are expressed as the inverse of the light scattering signal, as light intensity inversely correlates with cell volume. Cell volume changes were calculated according to the equation: I_0/I_t where I_0 : isosmotic light scattering signal average in 100 s; I_t : light scattering signal at time t . Measurements were performed at room temperature which was 25 \pm 2°C. The medium was warmed to 37°C before filling the cuvette. Because this technique requires that the cell population attached to the coverslip is largely homogeneous, measurements were made in cells cultured during the same time and with a similar confluency for the different experiments.

Electrophysiological recordings and data analysis

Electrophysiological recording was carried out on cells seeded on 35-mm dishes. Currents were measured with an Axopatch 200 patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices, Ontario, Canada) using the whole-cell patch clamp configuration. All recordings were performed

at room temperature (25°C). To minimize junction potential errors because of changes in solutions composition, an agar bridge filled with 3 M KCl was used to connect the ground electrode to the bath solution. Patch electrodes were prepared from 1.5-mm OD, 1.0-mm ID borosilicate glass (World Precision Instruments, FL, USA), and had resistances between 3 and 5 M Ω when filled with the pipette solution. The recorded signal was filtered at 10 kHz with a low-pass Bessel filter and transferred to a computer with the Digidata 1200 interface (Axon Instruments). No series resistance compensation was used. All recordings were acquired and analyzed with pCLAMP6 software (Axon Instruments). Whole-cell currents were elicited by 280 ms duration voltage steps ranging from -100 to +100 mV in 20-mV increments, from a holding potential of 0 mV. The standard pipette solution contained (in mM): 73 CsCl, 20 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 1 EGTA, 0.7 CaCl₂ (approximately 200 nM buffered calcium) and 5 Mg ATP, 90 mannitol, 2 GTP lithium, pH 7.4 adjusted with NaOH (300 \pm 3 mOsm). The bath solution had the following composition (in millimolar): 90 NaCl, 5 KCl, 1.17 MgSO₄, 1 CaCl₂, 5 Glucose, 10 HEPES, 90 mannitol, pH 7.4 and 300 mOsm. The hypotonic bath solution (210 mOsm) was prepared by omitting mannitol from the standard bath solution. This procedure did not alter the Cl⁻ reversal potential. The voltage protocol was carried out every 2–3 min and the current at 100 mV monitored to insure steady-state recordings. Solution changes were carried out using a peristaltic pump-based perfusion system. The concentration of thrombin used is the same for all experiments (5 U/ml). To express currents as current densities, we measured the capacitance of the cell at the beginning of whole-cell recording by integrating the capacitive current transient. Charge vs voltage curves were linear and their slope was used as a measure of capacitance. Contribution of stray capacitance to this measurement was minimal because >95% of pipette capacitance could be compensated.

Thrombin stimulation

For all experiments, including taurine efflux, ICl_{swell}⁻ recording, RVD or Western blots, thrombin was added simultaneously to the hyposmotic solution without any preincubation or pre-stimulation period. Thrombin pretreated with the protease blocker PPACK was also added simultaneously to the hyposmotic stimulus.

Statistical analysis

All data are given as means \pm SEM. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. For Figs. 1 and 3a Student's *t* test was used.

Results

Thrombin enhanced hyposmotic taurine efflux

Exposure of 3T3 fibroblasts to 30% hyposmotic solution (H30%) elicited a rapid increase of ³H-aurine efflux, from 0.2% in isosmotic conditions to 2.7% at the peak release after the hyposmotic stimulus (% of total accumulated radioactivity). The release peak is reached 2–3 min after the stimulus and thereafter, the efflux decreases towards basal levels. The five largest fractions of the release account for 10.9% of the total radioactivity accumulated. Addition of thrombin (5 U/ml) to the hyposmotic medium increased the rate and magnitude of taurine efflux. In the presence of thrombin, a release peak of 10.4% was reached 2 min after the stimulus and the sum of the five main release fractions was 27.7% of the total accumulated radioactivity (Fig. 1a). Taurine release in response to different osmolarity reductions showed a significant increase only at H20% but in the presence of thrombin an increase is observed already at H10% (Fig. 1b). Thrombin-elicited increase of hyposmotic taurine efflux at progressive osmolarity reductions fits a Gaussian curve (Fig. 1c). This analysis shows a significant increase of 166% at H10%, a maximal effect (305% increase) at H20%, 152% increase at H30% and no significant effect at H50%. Thrombin did not modify taurine efflux in isosmotic conditions (isosmotic 1.04 \pm 0.13; thrombin added at fraction 5: 1.11 \pm 0.16). Even when thrombin potentiation expressed as percentage increase was maximal at H20%, all experiments in this study were carried out at H30% at which differences in terms of the experimental values between the control and the thrombin condition are more evident.

To test whether the effect of thrombin increasing hyposmotic taurine efflux involves its protease activity, thrombin was pretreated with the protease inhibitor PPACK (1 μ M, 30 min). Figure 2a shows that this treatment essentially abolished the thrombin potentiation of hyposmotic taurine efflux. Taurine efflux in these cells is not different from the hyposmotic release in the absence of thrombin (Fig. 2a). The protease action of thrombin seems to occur largely through the protease-activated receptor PAR-1 because as shown in Fig. 2b, the PAR-1-activating synthetic peptide SFLLRN reproduced the effect of thrombin up to 89%. Four members of PARs have been identified (PAR 1–4) and PAR-1 subtype is the most ubiquitous form. This subtype is also that primarily involved in the effect of thrombin increasing glutamate and taurine efflux in astroglial cells [5, 30].

Effect of thrombin on the volume-sensitive Cl⁻ current (ICl_{swell}⁻)

We examined the effect of thrombin on swelling-induced currents in 3T3 cells. Membrane currents were measured

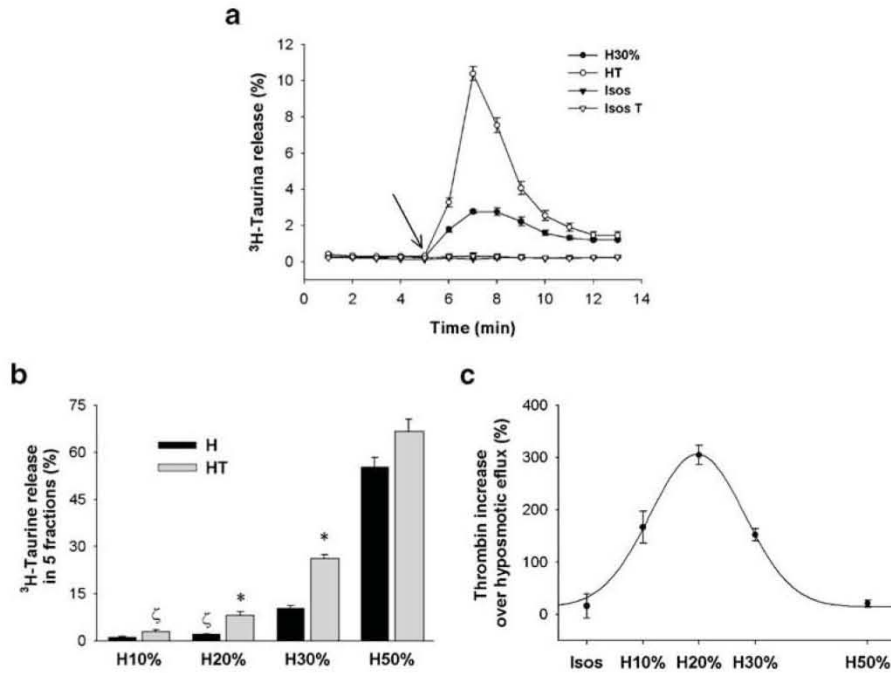


Fig. 1 Effect of thrombin increasing the hypotonic efflux of ³H-Taurine from 3T3 fibroblasts. **a** Time course of ³H-Taurine release and its potentiation by thrombin. Cells preloaded with ³H-Taurine were superfused (1 ml/min) with isosmotic medium during 5 min, and then (arrow) 8 min with isosmotic (inverted filled triangle) or 30% hypotonic medium (H30%) (filled circle). Thrombin (5 U/ml) was added to the isosmotic (inverted empty triangle) or hypotonic (empty circle) solutions. Points represent the radioactivity released at each fraction, expressed as percentage of total radioactivity accumulated during loading. **b** Effect of thrombin increasing taurine efflux in

hypotonic (H10, H20, H30, H50%) solutions. Bars represent net ³H-Taurine release, i.e., release in five fractions after the stimulus minus five fractions of the release in isosmotic conditions. Dashed bars Thrombin 5 U/ml (HT), black bars no thrombin added (H). **c** Gaussian curve fitting the effect of thrombin increasing the net hypotonic taurine efflux. Points represent the percentage increase over release in isosmotic or hypotonic medium. Results are means±SE of three to eight experiments. Significantly different from controls in the absence of thrombin, asterisk *P*<0.01; significantly different from the isosmotic condition, zeta *P*<0.05

using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as described in “Materials and methods” section. To focus on the Cl⁻ currents, in these experiments we used 73 mM CsCl⁻ and 20 mM TEA-Cl in the patch pipette to

minimize the contribution of K⁺ currents. After obtaining the whole-cell configuration, cells were maintained during 10 min in isosmotic solution and the steady-state current was recorded. Under these conditions, membrane currents

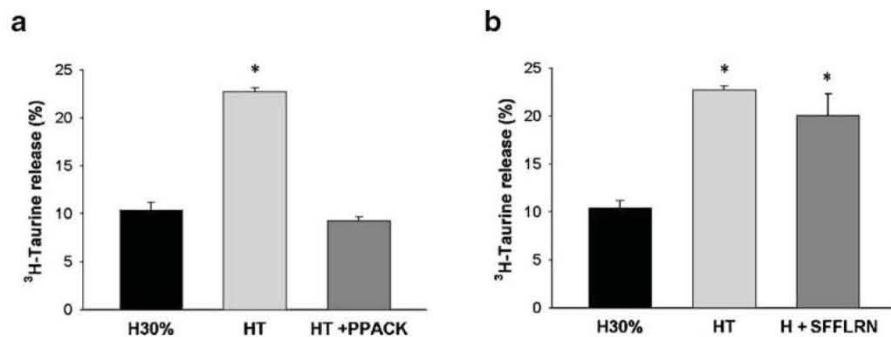


Fig. 2 Effect of thrombin treatment with the protease inhibitor PPACK, and of the PAR-1-activating synthetic peptide SFFLRN on hypotonic ³H-Taurine efflux. **a** Thrombin was preincubated (30 min) with the protease inhibitor PPACK (1 μM) and the assay proceeded as in Fig. 1. **b** Comparison of the effect of thrombin and of SFFLRN

(5 μM) enhancing ³H-Taurine efflux. The experimental assay and expression of results as in Fig. 1. Results are means±SE of three to six experiments. Significantly different from the control H30%, single asterisk *P*<0.01

were small and very nearly ohmic and reversed at -40 mV, presumably reflecting a small but finite permeability to Cs^+ ions (Fig. 3a). When cell were exposed to 30% hyposmolar solution, a large current developed. This current is carried by Cl^- ions because the only permeable anion present in these experiments is Cl^- and the current could be blocked

by the Cl^- channel blocker NPPB (Data not shown). Figure 3a shows that this Cl^- current exhibits previously reported features characteristic of $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$. It is an outwardly rectifying current, with inactivation kinetics at large positive voltages and a reversal potential of -4 mV, close to the Cl^- equilibrium potential of ~ 0.0 mV predicted by

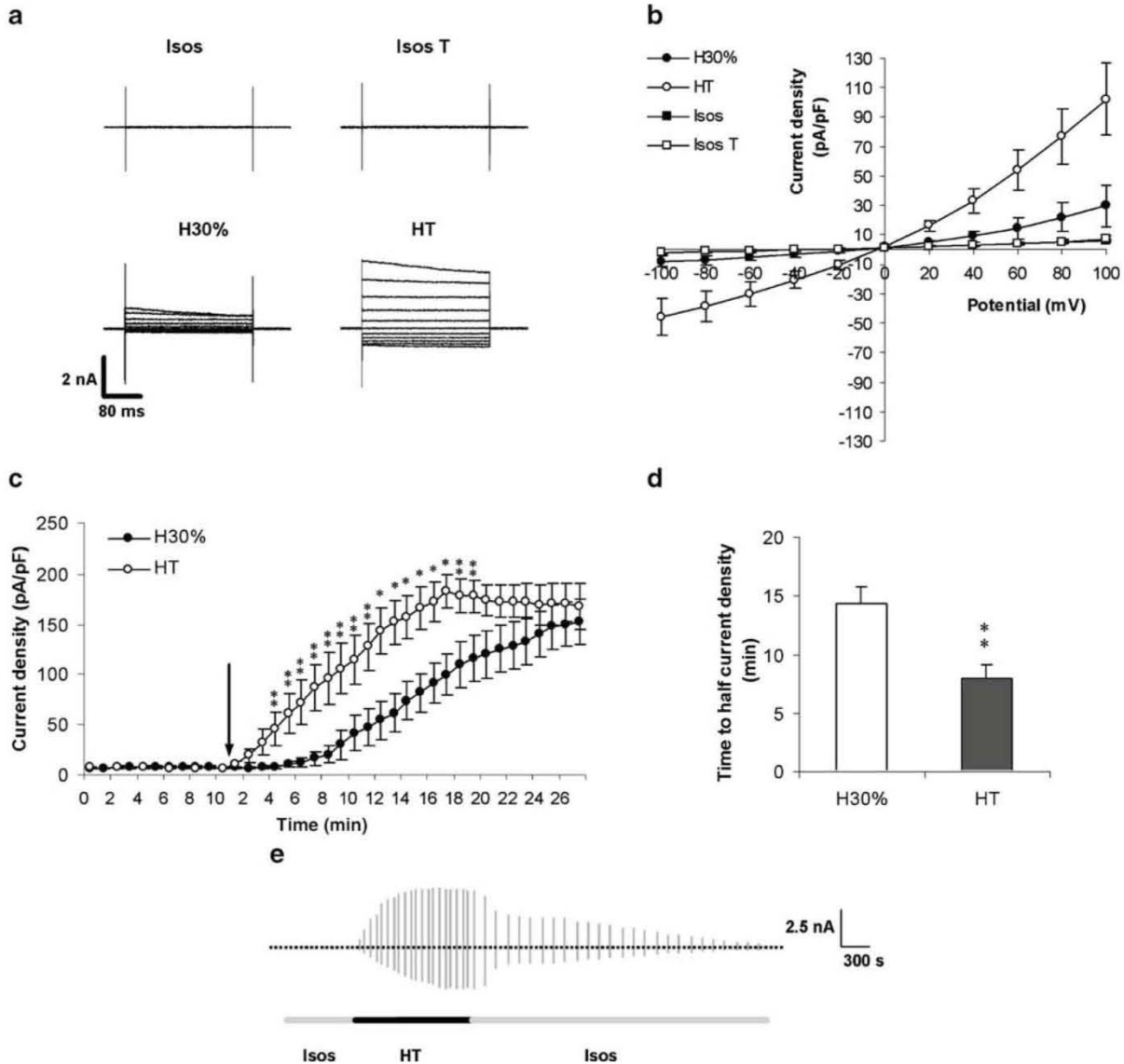


Fig. 3 Effect of thrombin and hyposmolarity on the osmosensitive Cl^- current. **a** Shows representative whole-cell current traces at the indicated experimental conditions. The figure shows currents obtained after a 10-min equilibration in the indicated solution. **b** Current density vs voltage curves from cells in isotonic medium (filled square), isotonic medium + thrombin (empty square), 30% hyposmotic medium (filled circle) and thrombin + 30% hyposmotic (empty circle). **c** Time course of $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ activation by 30% hyposmotic solution and 30% hyposmotic + thrombin. Shown is the current density at 100 mV

in the indicated experimental conditions. Results are means \pm SE of six to ten experiments. Double asterisks indicate a condition significantly different at $P < 0.05$ and single asterisk at $P < 0.01$. **d** Time to half activation in 30% hyposmotic medium (clear bar) and 30% hyposmotic medium + thrombin (dark bar). **e** Reversibility of activation by 30% hyposmotic medium + thrombin. The extremes of the bars indicate the value of current at 100 and -100 mV. The zero current level is indicated by the dashed line

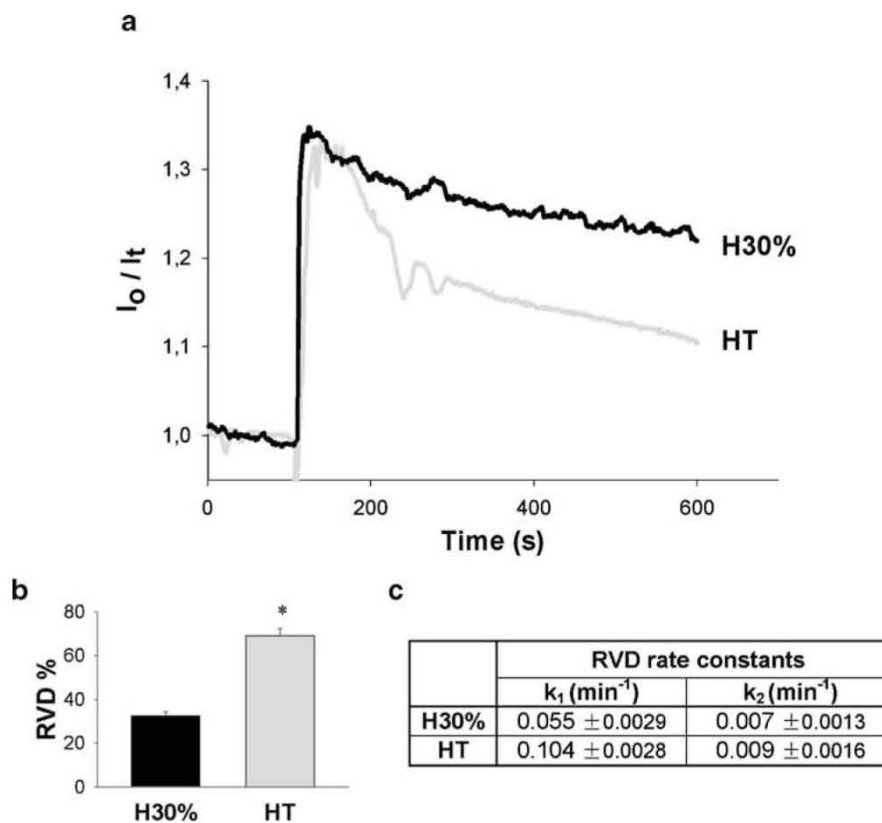
our solutions and as expected for a Cl^- permeable channel. Figure 3a also shows that exposure of 3T3 cells to thrombin alone did not induce by itself large currents.

When cells were exposed for the same time period to the 30% hyposmolar solution in the presence of thrombin, larger currents could be evoked with similar characteristics to the hyposmolarity-activated current. Figure 3b shows the current density vs voltage curves for these recordings. The membrane current was normalized to the cell membrane capacitance to correct for different cell sizes. To fully examine the effect of thrombin, we followed the entire time course of activation of the swelling-induced current (Fig. 3c). It is apparent that thrombin accelerates the activation of $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ by hyposmotic solutions and that both conditions activate the same level of current density, as would be expected if thrombin did not affect the number of channels in the membrane and the single channel conductance. A simple quantitative measure of the speed of activation is the time to half activation. The time to half activation of $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ is approximately twice as fast in the presence of thrombin as in its absence (Fig. 3d). Finally, activation by the 30% hyposmotic solution in the presence of thrombin is fully reversible, as illustrated by the data in Fig. 3e.

Thrombin increased the rate and efficiency of RVD

The above described effects of thrombin increasing the operation of two main pathways for RVD, i.e., the volume-sensitive Cl^- channel and the organic osmolyte pathway, predict an effect of thrombin on the rate and efficiency of the volume regulatory process. Changes in cell volume were estimated by the large-angle light scattering system. It should be noticed that absolute cell volume values are not obtained by this procedure, and the magnitude of a cell volume change induced by hyposmolarity is relative to cell volume in the isosmotic condition [24]. Fibroblasts exposed to H30% exhibited the typical response of swelling followed by RVD (Fig. 4). RVD showed two distinct phases, a more rapid phase which initiates immediately after maximal swelling, and a slow sustained phase. The rate constants for these two phases are shown in Fig. 4. Thrombin had no effect on cell swelling but notably enhanced cell volume decrease through an effect exerted essentially in the first phase of volume decrease, when the rate constant is almost twofold that in the absence of thrombin. The rate constant values at the slow phase were similar in the presence or absence of thrombin. After 10 min, cells in hyposmotic medium

Fig. 4 Swelling and regulatory volume decrease (RVD) in fibroblasts after a 30% hypo-smotic stimulus in the presence or absence of thrombin. Changes in cell volume were measured using a large-angle light-scattering system as described in “Materials and methods” section. **a** Representative traces of changes in cell volume in 30% hyposmotic (H30%) or hyposmotic plus thrombin medium (HT) (5 U/ml). **b** Bars express the cell volume recovery at the end of the experiment as percentage of maximal swelling. **c** Rate constants for the two visible RVD phases (110–200 and 200–600 s) were calculated from the slope of a linear function. Results are means±SE of five to nine experiments. Significantly different from H30%, asterisk $P < 0.01$



have recovered 36% of their initial volume, whereas in the presence of thrombin cell volume recovery was almost 70%.

The Ca^{2+} -dependent component of thrombin effects

Changes in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elicited by hyposmolarity and thrombin are shown in Fig. 5. The basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$, measured as described in the work of Franco et al. [10], was found to be 100 nM. Significant increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were induced by hyposmolarity or by thrombin in isosmotic medium. The largest increase was observed when cells were exposed to hyposmolarity and thrombin simultaneously (Fig. 5a). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation elicited by hyposmolarity plus thrombin was abolished by treatment with EGTA-AM (25 μM , 30 min) in Ca^{2+} -free medium (Ca^{2+} omission plus 0.1 mM EGTA) and markedly inhibited by the PLC blocker U73122 (Fig. 5b). To suppress the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation by hyposmolarity plus thrombin, but maintaining $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in basal levels (unstimulated, 100 nM), cells were incubated during 30 min in a medium with 100 nM Ca^{2+} and 1 μM ionomycin. This condition clamps $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in 100 nM. Figure 5a shows the reduction of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase by hyposmolarity plus thrombin.

The contribution of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase to thrombin effects was then examined on hyposmotic taurine efflux, $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ and RVD. For this purpose, cells were treated with U73122 (2.5 μM) or with EGTA/EGTA-AM. Results are shown in Fig. 6a–d. U73122 or EGTA-AM decreased taurine efflux 43 and 55%, respectively (Fig. 6a). These results stress the importance of PLC in the mechanism responsible for the Ca^{2+} -dependent effect of thrombin increasing taurine efflux. The influence of the Ca^{2+} -activated enzymes CaM or CaMKII was estimated by the inhibitory effect of W7 (25 μM) or KN93 (10 μM), which reduced the thrombin-stimulated taurine efflux 54 and 43%, respectively (Fig. 6a). In the absence of thrombin, the hyposmotic taurine efflux was 25–47% reduced by blockers of the Ca^{2+} -mediated signaling pathway (Fig. 6b). Protein kinase C (PKC) blockers Gö6976 (1 μM) or chelerythrine (2.5 μM) attenuated the thrombin enhanced taurine efflux by 30–31%, without affecting hyposmotic taurine (results not shown). The acceleration of $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ by thrombin was decreased by 65% in nominally Ca^{2+} -free conditions (1 mM EGTA in the pipette and 0.5 mM EGTA in the bath solution), and 49% by the PLC blocker U73122 (Fig. 6c). For these experiments, the effect of U73122 or of a nominally Ca^{2+} -free condition was examined at the time of half activation of $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$, i.e., 8–9 min after the stimulus. Consistent with these results, RVD observed in the presence of thrombin decreased 42–48% in cells treated with EGTA-AM or U73122 (Fig. 6d).

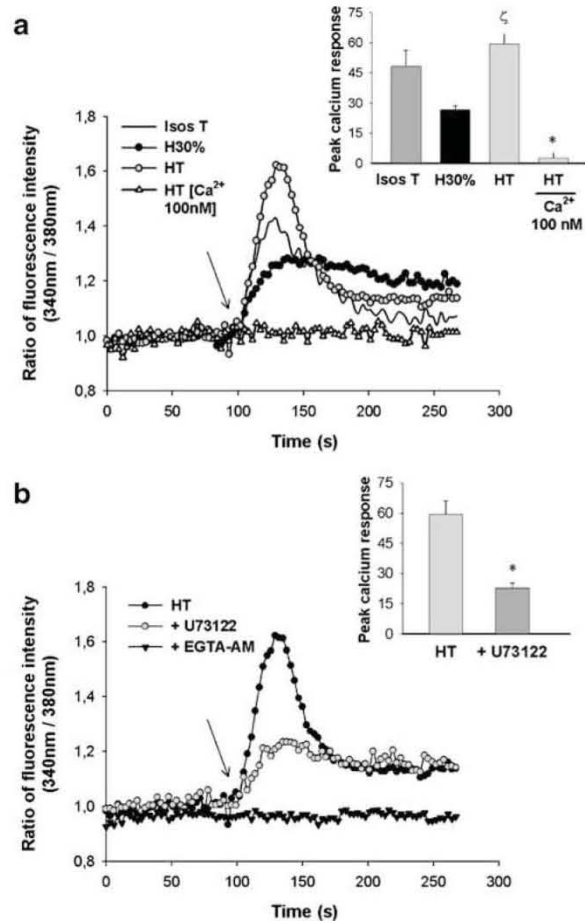


Fig. 5 Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by hyposmolarity and thrombin. Intracellular Ca^{2+} was determined using fluorescence changes of the preloaded Ca^{2+} indicator Fura-2/AM, as described in “Materials and methods” section. Fluorescence was measured under isosmotic conditions until baseline was stable and at the time indicated by the arrow, the following stimuli were applied: **a** isosmotic medium plus thrombin (Isos T), 30% hyposmotic medium (H30%), 30% hyposmotic medium plus thrombin (HT) and 30% hyposmotic medium plus thrombin in a condition of 100 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]_e$ obtained by treatment with 1 μM ionomycin during 30 min. **b** Thirty percent hyposmotic medium plus thrombin in cells treated with U73122 (2.5 μM) or with EGTA-AM (25 μM , 30 min) in external Ca^{2+} -free medium. Results are expressed as ratio of fluorescence intensity (340/360 nm). Bars represent the quantification of the peak Ca^{2+} response in the indicated conditions, expressed as the peak value minus the basal value for each condition. Means \pm SE of four to eight experiments. Significantly different from the 30% hyposmotic control condition, *zeta* $P < 0.01$. Significantly different from the HT condition, single asterisk $P < 0.01$

Thrombin transactivation of src and EGFR and its contribution to thrombin influence on hyposmotic taurine efflux, $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ and RVD

Previous studies have shown a marked influence of tyrosine kinases on osmolyte fluxes activated during RVD [6, 27].

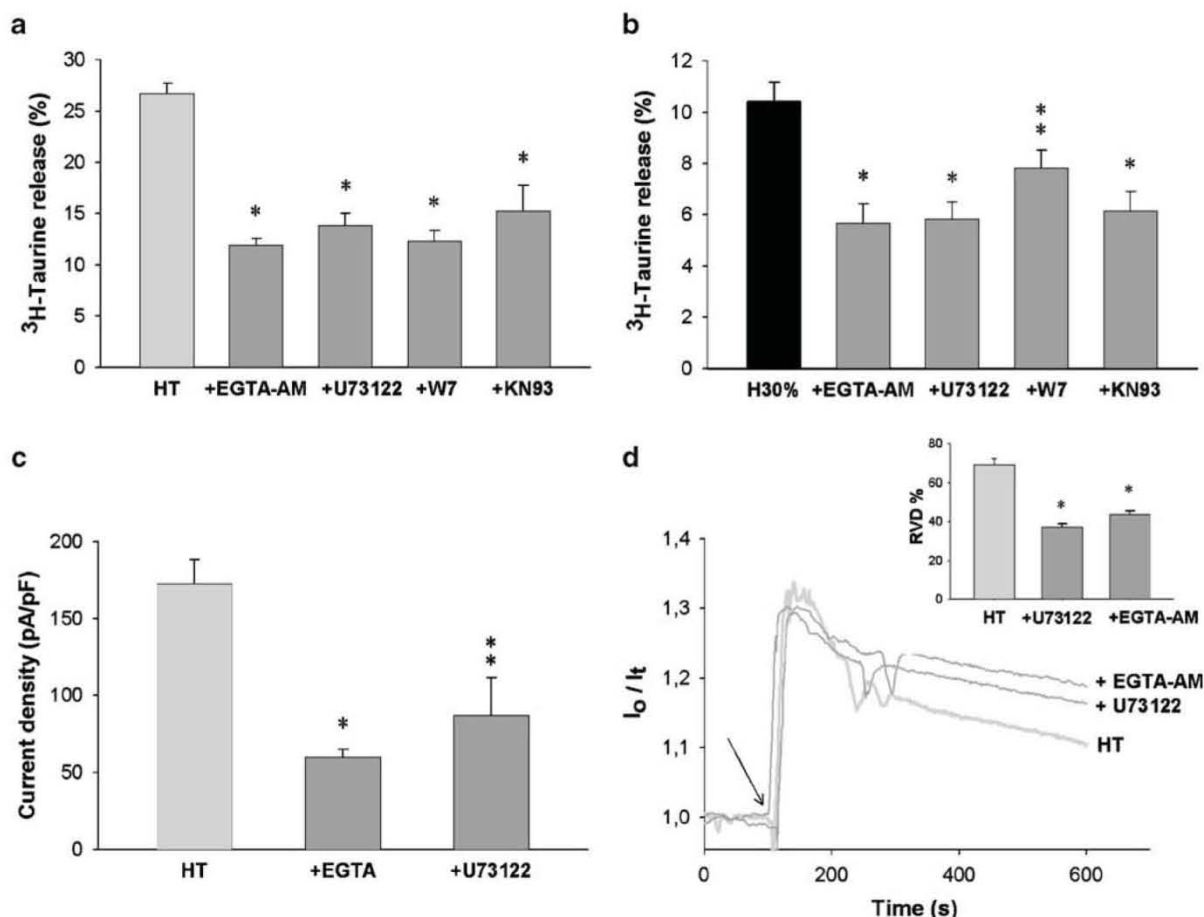


Fig. 6 Effects of Ca^{2+} signaling pathway blockers on hypotonic or hyposmolarity plus thrombin-elicited ^3H -taurine efflux, $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ and RVD. **a** Taurine efflux in cells stimulated with hyposmolarity plus thrombin (HT) and treated with EGTA-AM (25 μM , 30 min) in external Ca^{2+} -free medium or with U73122 (2.5 μM), W7 (25 μM) or KN93 (10 μM). **b** Hypotonic (H30%) taurine efflux in the absence of thrombin in cells treated with the same drugs. Bars represent taurine net release as in Fig. 1. **c** Effect of nominally Ca^{2+} -free conditions (0 Ca^{2+} plus 1 mM EGTA in the pipette and 0 Ca^{2+} plus 0.5 mM EGTA in the bath solution), or U73122 on $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ in cells stimulated with hyposmolarity plus thrombin. Bars represent $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$

density at min 8–9 after the stimulus. **d** Effect of EGTA-AM in external Ca^{2+} -free medium or U73122 on RVD in cells exposed by hyposmolarity plus thrombin. Representative traces of changes at cell volume in the indicated conditions and bars corresponding to volume recovery (percentage of maximal volume at the end of the experiment) in each condition. Cells were preincubated with the inhibitors during 20 min and the drugs were present in the media throughout the experiment. Means \pm SE of three to eight experiments. Significantly different from the control condition, single asterisk $P < 0.01$; double asterisks $P < 0.05$

In particular, hyposmolarity enhances tyrosine kinase phosphorylation of EGFR as well as of various members of cytosolic kinases of the Src family [6, 9]. Since thrombin is known to transactivate EGFR and to increase src phosphorylation [7, 23] these effects may contribute to thrombin actions on RVD events. Figure 7a–d shows the increase in EGFR phosphorylation evoked by hyposmolarity and its marked potentiation by thrombin. EGFR phosphorylation was decreased by the specific EGFR blocker AG1478 (10 μM) and abolished by the src blocker PP2 (10 μM) (Fig. 7a,b). The effect of hyposmolarity plus thrombin enhancing EGFR phosphorylation persists when $[\text{Ca}^{2+}]_i$

increase is prevented by clamping $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by treatment with ionomycin in 100 nM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (Fig. 7a,b). Figure 8 illustrates the increase in src phosphorylation by hyposmolarity, its potentiation by thrombin and the inhibitory effect of PP2 (Fig. 8a,b). Similar to EGFR, src phosphorylation by hyposmolarity plus thrombin is Ca^{2+} -independent (Fig. 8a,b). The influence of the thrombin-activated src/EGFR pathway was next examined on taurine efflux, $\text{ICI}_{\text{swell}}^-$ and RVD. Taurine efflux evoked by hyposmolarity plus thrombin was 37% reduced by the EGFR blocker AG1478 and 56% by the src blocker PP2 (Fig. 9a). Hypotonic taurine efflux in the absence of thrombin, was also decreased (58%) by

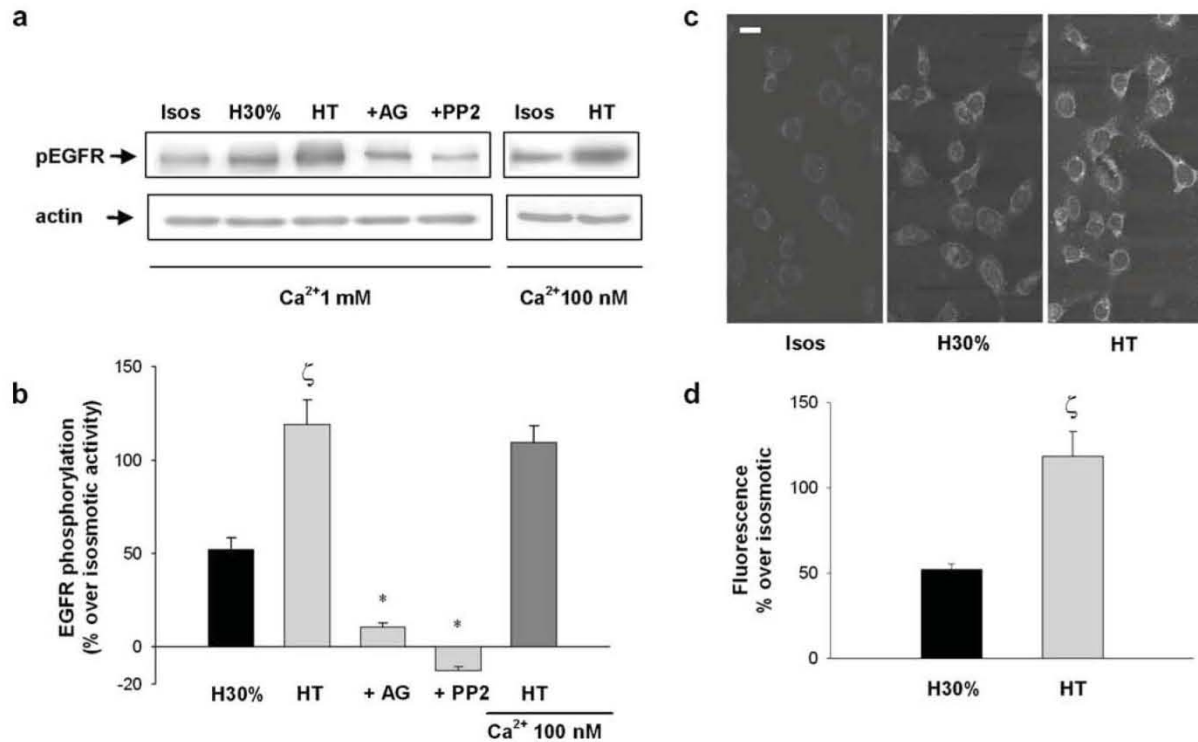


Fig. 7 EGFR phosphorylation on H30% and HT. **a** Cells were serum-starved for 24 h and then incubated in the indicated conditions: isosmotic, H30%, HT, HT plus AG1478 (AG) 10 μ M, HT plus PP2 10 μ M, isosmotic and HT in $[Ca^{2+}]_e$ 1 mM or 100 nM. This later was obtained by treatment with 1 μ M ionomycin during 30 min in a medium with 100 nM Ca^{2+} . This condition clamps $[Ca^{2+}]_i$ and maintains $[Ca^{2+}]_e$ in 100 nM. *Upper panel* EGFR phosphorylation analyzed by Western blotting with anti-phospho EGFR antibody (pTyr 1173). **b** In bars, the densitometric scanning quantitation of blots, with results expressed as percentage increase over EGFR activity in the

isosmotic condition. **c** For the confocal images, cells were treated in the indicated conditions and then prepared to visualized by confocal microscopy. Scale bar=20 μ m. **d** Results in bars were obtained from the confocal microscopy images and the fluorescence intensity quantified as described in "Materials and methods" section (Image pro-plus 5.0). Data correspond to fluorescence arbitrary units and represent the increase in fluorescence in H30% and HT over the isosmotic condition. Results are means \pm SE of four to six experiments. Significantly different from H30%, zeta $P<0.01$; significantly different from HT, asterisk $P<0.01$

EGFR or src blockade (Fig. 9b). AG1478 and PP2 inhibited the effect of thrombin accelerating ICI_{swell}^- by 57 and 47%, respectively (Fig. 9c). As expected, the rate of cell volume decrease enhanced by thrombin was also markedly reduced by these agents, 37 and 49% in cells treated with AG1478 or PP2, respectively (Fig. 9d).

To examine possible cross-talk or interdependence between the two signaling routes activated by hyposmolarity plus thrombin, i.e., PLC- Ca^{2+} and src/EGFR pathways, the additive or non-additive effects of simultaneously blocking the two pathways was investigated. Figure 10a shows the inhibition of 46–56% of taurine efflux in the presence of EGTA-AM or PP2, and the additive effect of the simultaneous application of these blockers, which reduced taurine efflux over 90% (Fig. 10a). Similarly, Fig. 10b shows an additive effect on ICI_{swell}^- , which was 90% reduced by the simultaneous exposure to a Ca^{2+} -free condition and PP2. In accordance with these results, RVD

which was reduced 50% in cells treated with EGTA-AM and 60% inhibited with PP2, was suppressed by the simultaneous treatment with these agents (Fig. 10c).

Discussion

The present work identified the signaling elements involved in the effect of thrombin increasing taurine efflux, ICI_{swell}^- and the rate and efficiency of RVD in 3T3 fibroblasts swollen by hyposmolarity. The combined operation of the classical PLC- Ca^{2+} -CaMKII signaling pathway and a thrombin-induced src/EGFR transactivation account for essentially all the effects of thrombin on RVD events.

Thrombin markedly increased the rate and magnitude of hyposmotic taurine efflux and significantly accelerated ICI_{swell}^- activation in the first minutes after the hyposmotic stimulus. These two effects of thrombin explain its influence

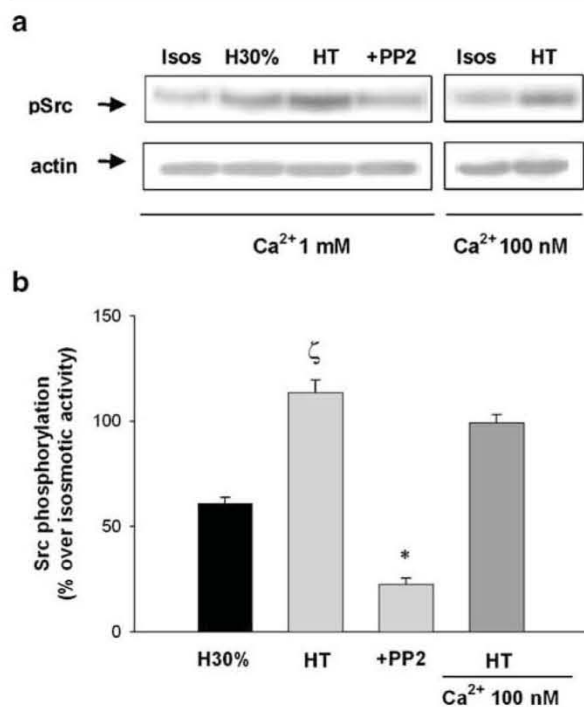


Fig. 8 Phosphorylation of src by H30% and HT. **a** src activity was assayed by immunoblotting. Upper panel src phosphorylation was analyzed by Western blotting with anti-phospho src antibody (pTyr 416), and the assay proceeded as in Fig. 7. **b** In bars, the densitometric scanning quantitation of blots, with results expressed as percentage increase over src activity in the isosmotic condition. Results are means \pm SE of three to four experiments. Significantly different from H30%, *zeta* $P < 0.01$; significantly different from HT, *asterisk* $P < 0.01$

on cell volume recovery pattern. Thrombin markedly accelerated RVD in the first minutes after swelling, increasing by twofold the rate constant of volume decrease. After this time, when taurine efflux is decreasing toward the original efflux values and ICI_{swell}^- shows similar amplitude in the presence or absence of thrombin, no significant difference was found in the rate constant of volume decrease. Because of this initial effect accelerating cell volume decrease, cells exposed to thrombin recovered about 70% of their original volume in contrast to 32% in its absence.

The contribution of the PLC-Ca²⁺-CaMKII-mediated pathway to thrombin-elicited increase of taurine efflux in fibroblasts was about 50–60%. This contribution varies for other GPCR ligands in different cell types. It represents 34–38% in SHSY-5Y neurons activated by lysophospholipids [14], 55–60% in fibroblasts treated with ATP [10], 24% in thrombin-stimulated neuroblastoma and 52% in astrocytoma cells [4, 5]. The PLC-Ca²⁺-CaMKII route contributes more importantly to glutamate efflux stimulated by thrombin or ATP in cultured astrocytes, accounting for about

70–80% [25, 30]. It is so far unclear whether this difference is specific of the cell type or of the glutamate efflux pathway.

Thrombin influenced ICI_{swell}^- in fibroblasts by markedly reducing the time to half activation of ICI_{swell}^- which is approximately twice as fast in the presence of thrombin as in its absence. Thrombin effect is exerted apparently on the same level of current density, as would be expected if it is not affecting the number of channels in the membrane. Thrombin increased ICI_{swell}^- amplitude evoked by hyposmolarity (13%) in CPAE cells [23] and the hyposmotic efflux of ¹²⁵I in SH-SY5Y and Intestine 407 cells [14, 32]. This effect persists when $[Ca^{2+}]_i$ is reduced to 50 nM or by depletion of thapsigargin-sensitive Ca²⁺ stores, in contrast to the reduction in ICI_{swell}^- observed in fibroblasts in conditions of nominally free Ca²⁺ by treatment with EGTA. In Intestine 407 cells, thrombin, and other Ca²⁺-mobilizing hormones markedly increased the efflux of ¹²⁵I and this effect is abolished by BAPTA-AM. Therefore, a variation is observed on the Ca²⁺-dependence of the Cl⁻ hyposmotic efflux potentiated by GPCR, related possibly to the cell type or/and the extent of swelling.

According to the contribution of the Ca²⁺-dependent signaling pathway to osmolyte fluxes, its blockade attenuates RVD in different proportion. A 50% reduction was observed in 3T3 fibroblasts whereas in cultured astrocytes, consistent with the contribution of the Ca²⁺-dependent pathway above discussed [25, 30], blockade of this signaling chain had a strong effect reducing RVD [2].

The present study showed that EGFR transactivation by thrombin participates importantly in its action on osmolyte fluxes and RVD in fibroblasts. A contribution of 40–50% is estimated considering the effect of preventing EGFR phosphorylation on RVD processes. The influence of EGFR was also observed on the hyposmotic taurine efflux in the absence of thrombin, with a contribution of more than 60%. The thrombin-induced EGFR transactivation has src as a main intermediate. The strong effect of src blockade decreasing EGFR phosphorylation indicates that src lies upstream EGFR and that it is seemingly an early target for swelling and thrombin signaling. GPCR–src interactions are well documented [21] although its role in RVD events has not been previously described.

Src blockade had a more potent effect than EGFR inhibition on taurine efflux, suggesting effects of src additional to its connection with EGFR. The influence of src on osmolyte pathways activated by hyposmotic swelling is well documented [6]. In hepatoma cells, src blockade suppresses the activation/operation of volume-sensitive K⁺ and Cl⁻ channels and abolished RVD [1]. The hyposmotic taurine efflux pathway is sensitive to src blockade in HeLa cells [26] and the src-like protein p56(lck) has a critical influence on hyposmotic taurine release in skate red cells [29]. In human lymphocytes, inhibition or genetic knockout

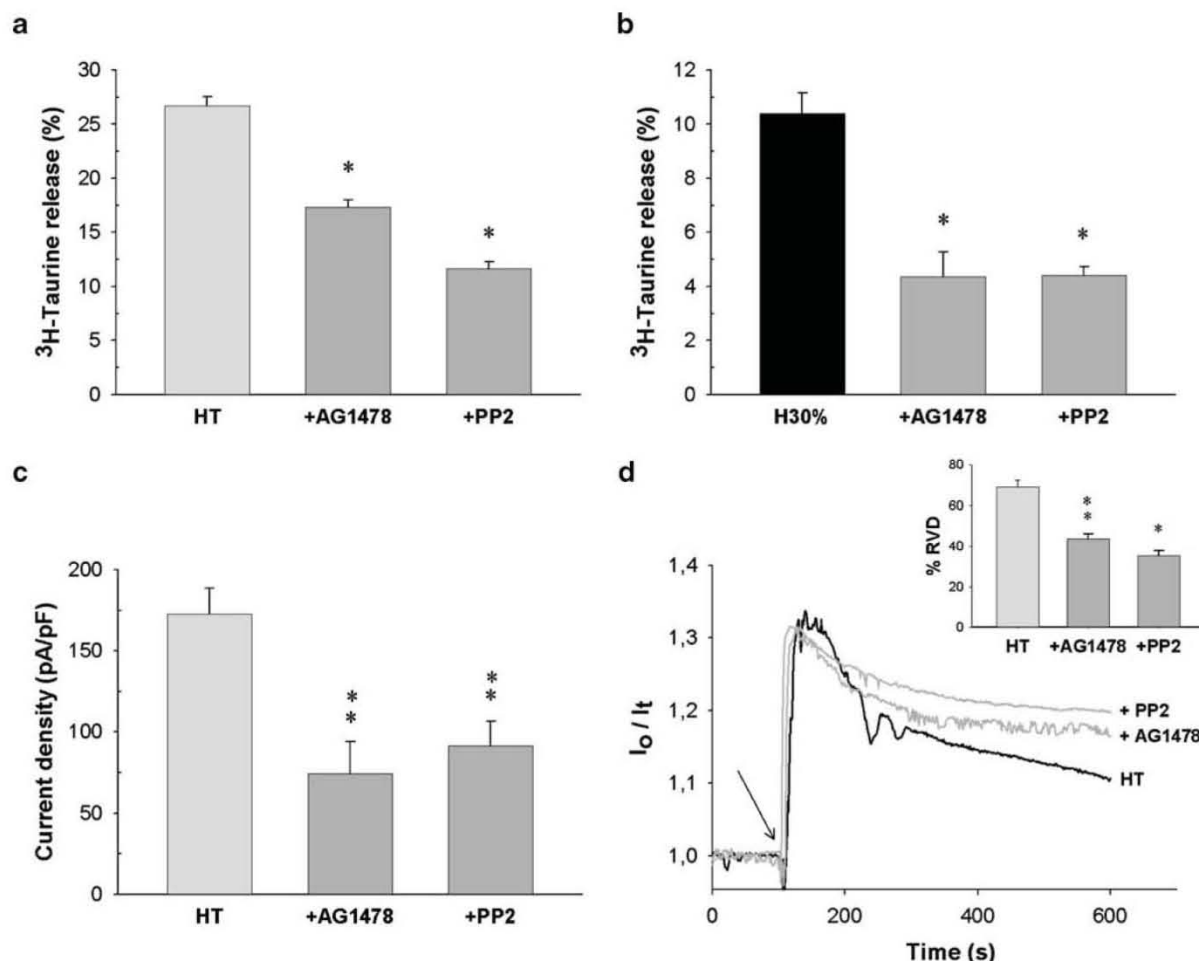


Fig. 9 Effects of EGFR and src phosphorylation blockade on ^3H -taurine efflux by hyposmotic or hyposmotic plus thrombin, $\text{ICl}_{\text{swell}}^-$ and RVD. **a** H30% taurine efflux in cells stimulated with HT and treated with AG1478 (10 μM) or with PP2 (10 μM). **b** H30% taurine efflux in cells treated with the same drugs. Bars represent taurine net release as in Fig. 1. **c** Effect of the same blockers on $\text{ICl}_{\text{swell}}^-$ in cells stimulated by HT. Bars represent $\text{ICl}_{\text{swell}}^-$ density at min 8–9 after the

stimulus. **d** Effect of AG1478 or PP2 on RVD in cells exposed to HT. Representative traces of changes in cell volume in HT and bars corresponding to volume recovery (percentage of maximal volume at the end of the experiment) in each condition. Means \pm SE of three to eight experiments. Significantly different from the control condition, single asterisk $P < 0.01$; double asterisks $P < 0.05$

of p56lck interferes with $\text{ICl}_{\text{swell}}^-$ activation, an effect being reversed by p56lck retransfection [20]. Altogether, these results stress the key role of src as a signaling molecule in hyposmotic swelling as well as in the effects of thrombin modulating RVD events. The upstream signaling for src activation in swollen cells is not well delineated. An integrin/src system is found in hepatocytes and may be an important osmosensing pathway [34]. The identification and influence on thrombin effect of the numerous downstream and upstream signaling molecules crossing with src and EGFR remain to be investigated.

The PLC- Ca^{2+} -CaMKII and the src/EGFR-mediated signaling chains activated by hyposmolarity plus thrombin

in fibroblasts appear to operate independently. This was shown in the present study by two sets of results: first, the persistence of src and EGFR activation by hyposmolarity plus thrombin when $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is clamped to 100 nM and no $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase is elicited in this condition, and second, by the additive effect on taurine efflux, $\text{ICl}_{\text{swell}}^-$ or RVD, of the simultaneous inhibition of the two pathways, which essentially suppressed these processes.

Thrombin did not affect cell volume in isosmotic conditions. Neither significant swelling nor shrinkage were detected in fibroblasts exposed to thrombin, suggesting that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ raised by thrombin in these cells is not activating Ca^{2+} -dependent K^+ or Cl^- channels of a sufficient mag-

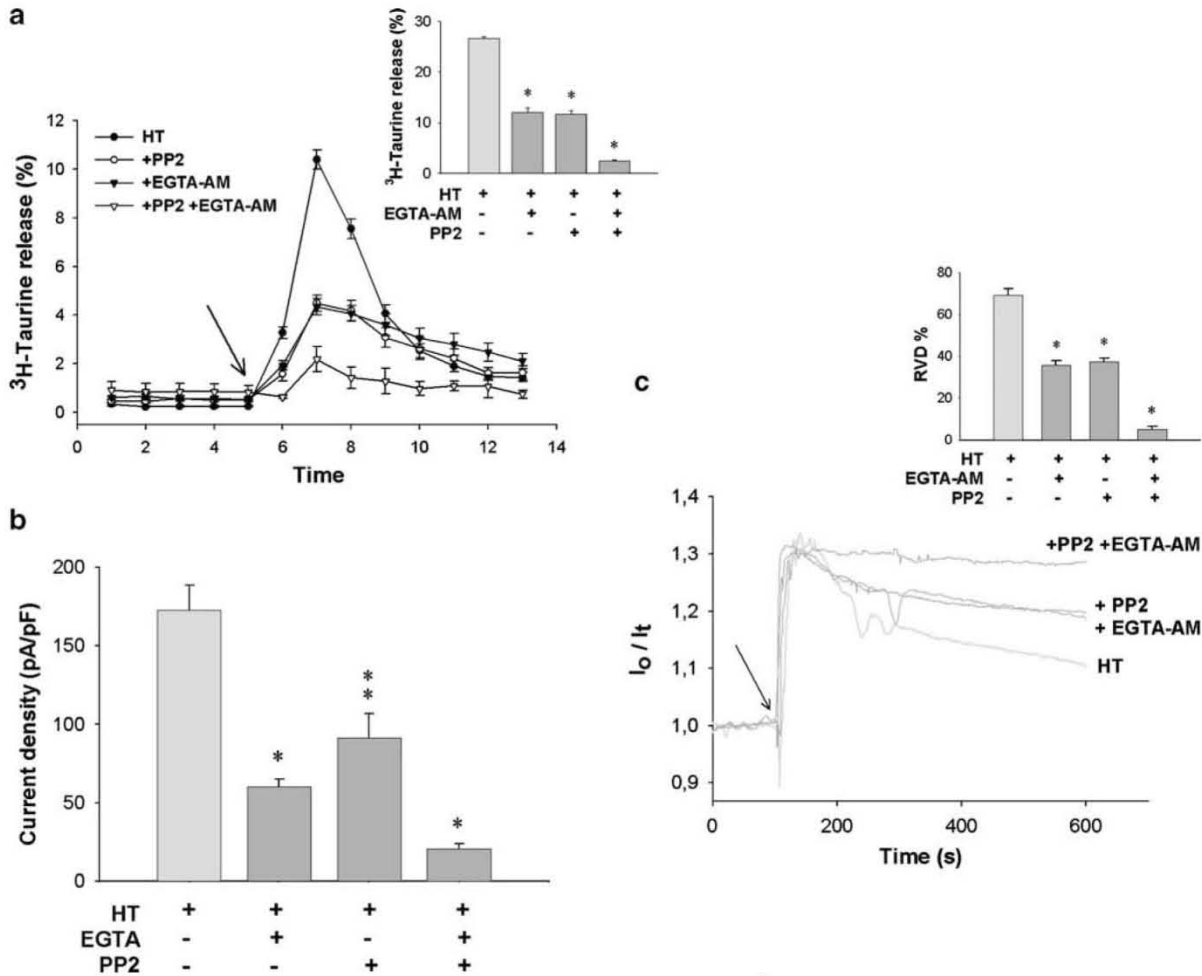


Fig. 10 Additive inhibitory effects of simultaneous blockade of the PLC-Ca²⁺-CaMKII and src-EGFR pathways on ³H-taurine efflux, ICI_{swell} and RVD evoked by HT. **a** Hyposmotic taurine efflux in cells stimulated with HT (filled circle) and treated with EGTA-AM (25 μM) in external Ca²⁺-free medium (inverted shaded triangle), PP2 (10 μM) (empty circle), or the two conditions simultaneously (inverted triangle). Bars represent taurine net release as in Fig. 1. **b** Effect of a nominally Ca²⁺-free condition (0 Ca²⁺ plus 1 mM EGTA in the

pipette and 0 Ca²⁺ plus 0.5 mM EGTA in the bath solution) or PP2 on ICI_{swell} stimulated by HT. Bars represent ICI_{swell} density at min 8–9 after the stimulus. **c** Effect of EGTA-AM and PP2 on RVD in cells exposed to HT. Representative traces of changes in cell volume in the indicated conditions. Bars correspond to cell volume recovery (%) in each condition. Means±SE of three to eight experiments. Significantly different from HT, single asterisk P<0.01; double asterisks P<0.05

nitude to significantly alter the water content in the cells. Neither increases in ICI_{swell} amplitude nor in ¹²⁵I⁻ efflux by thrombin are found in isosmotic conditions in CPAE or Intestine 407 cells [23, 32] although ICI_{swell} activates in isosmotic conditions in cells treated with very high concentrations of ionomycin [18]. Ca²⁺-sensitive large-conductance K⁺ channels (BK) might be activated by thrombin and participate in its effects on RVD [12]. This was not examined in the present study but the importance of K⁺ fluxes on RVD rate warrants a detailed investigation on this subject.

Results of the present study showed that PLC-Ca²⁺-CaMKII- and src/EGFR signaling chains mediate RVD-related events under hyposmotic conditions, and that thrombin is merely amplifying these mechanisms. Noteworthy, thrombin per se, is not significantly increasing taurine efflux or ICI_{swell} in isosmotic conditions. It is only after the set in motion of the volume-sensitive osmolyte efflux pathways by hyposmotic swelling that thrombin potentiation occurs. The mechanisms involved in this initial activation phase are still unidentified. Activation of integrin-small GTP-binding proteins [8, 34] or PLA2-arach-

idonic acid-mediated mechanisms [19] are considered as candidate mechanisms.

Acknowledgements We deeply appreciate the technical assistance of Ms. Claudia Peña Segura. This study was supported in part by grant nos. IN209507 from DGAPA-UNAM and 46465 from CONACYT.

References

- Barfod ET, Moore AL, Melnick RF, Lidofsky SD (2005) Src regulates distinct pathways for cell volume control through Vav and phospholipase C γ . *J Biol Chem* 280:25548–25557
- Bender AS, Neary JT, Norenberg MD (1993) Role of phosphoinositide hydrolysis in astrocyte volume regulation. *J Neurochem* 61:1506–1514
- Cardin V, Lezama R, Torres-Marquez ME, Pasantes-Morales H (2003) Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca $^{2+}$ rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia* 44:119–128
- Cheema TA, Pettigrew VA, Fisher SK (2007) Receptor regulation of the volume-sensitive efflux of taurine and iodide from human SH-SY5Y neuroblastoma cells: differential requirements for Ca (2+) and protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1068–1077
- Cheema TA, Ward CE, Fisher SK (2005) Subnanomolar concentrations of thrombin enhance the volume-sensitive efflux of taurine from human 1321N1 astrocytoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315:755–763
- Cohen DM (2005) SRC family kinases in cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C483–C493
- Daub H, Wallasch C, Lanckenau A, Herrlich A, Ullrich A (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16:7032–7044
- Di Ciano-Oliveira C, Thirone AC, Szasz K, Kapus A (2006) Osmotic stress and the cytoskeleton: the R(h)ole of Rho GTPases. *Acta Physiol (Oxf)* 187:257–272
- Franco R, Lezama R, Ordaz B, Pasantes-Morales H (2004) Epidermal growth factor receptor is activated by hyposmolarity and is an early signal modulating osmolyte efflux pathways in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 447:830–839
- Franco R, Rodriguez R, Pasantes-Morales H (2004) Mechanisms of the ATP potentiation of hyposmotic taurine release in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 449:159–169
- Galiotta LJ, Falzoni S, Di Virgilio F, Romeo G, Zegarra-Moran O (1997) Characterization of volume-sensitive taurine- and Cl $^{-}$ -permeable channels. *Am J Physiol* 273:C57–C66
- Hafting T, Haug TM, Ellefsen S, Sand O (2006) Hypotonic stress activates BK channels in clonal kidney cells via purinergic receptors, presumably of the P2Y subtype. *Acta Physiol (Oxf)* 188:21–31
- Hausinger D, Reinehr R, Schliess F (2006) The hepatocyte integrin system and cell volume sensing. *Acta Physiol (Oxf)* 187:249–255
- Heacock AM, Dodd MS, Fisher SK (2006) Regulation of volume-sensitive osmolyte efflux from human SH-SY5Y neuroblastoma cells following activation of lysophospholipid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 317:685–693
- Heacock AM, Kerley D, Gurda GT, VanTroostenberghe AT, Fisher SK (2004) Potentiation of the osmosensitive release of taurine and D-aspartate from SH-SY5Y neuroblastoma cells after activation of M3 muscarinic cholinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 311:1097–1104
- Hoffmann EK, Pedersen SF (2006) Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation. *Contrib Nephrol* 152:54–104
- Jakab M, Furst J, Gschwentner M, Botta G, Garavaglia ML, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmueller S, Woll E, Chwatal S, Ritter M, Paulmichl M (2002) Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem* 12:235–258
- Jakab M, Schmidt S, Grundbichler M, Paulmichl M, Hermann A, Weiger T, Ritter M (2006) Hypotonicity and ethanol modulate BK channel activity and chloride currents in GH4/C1 pituitary tumour cells. *Acta Physiol (Oxf)* 187:51–59
- Lambert HI (2004) Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem Res* 29:27–63
- Lepple-Wienhues A, Szabo I, Laun T, Kaba NK, Gulbins E, Lang F (1998) The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol* 141:281–286
- Luttrell DK, Luttrell LM (2004) Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* 23:7969–7978
- Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11:177–183
- Manolopoulos GV, Prenen J, Droogmans G, Nilius B (1997) Thrombin potentiates volume-activated chloride currents in pulmonary artery endothelial cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 433:845–847
- McManus M, Fischbarg J, Sun A, Hebert S, Strange K (1993) Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and membrane transport processes. *Am J Physiol* 265:C562–C570
- Mongin AA, Kimelberg HK (2005) ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca $^{2+}$ -sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C204–C213
- Oliveiro P, Stutzin A (2004) Calcium modulates osmosensitive taurine efflux in HeLa cells. *J Neurochem* 29:169–176
- Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G (2006) Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling. *Acta Physiol* 187:93–102
- Pasantes-Morales H, Morales-Mulia S (2000) Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86:414–427
- Perlman DF, Goldstein L (2004) The anion exchanger as an osmolyte channel in the skate erythrocyte. *J Neurochem* 29:9–16
- Ramos-Mandujano G, Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H (2007) Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes. *Glia* 55:917–925
- Thoroed S, Soergaard M, Cragoe E, Fugelli K (1995) The osmolality-sensitive taurine channel in flounder erythrocytes is strongly stimulated by noradrenaline under hypo-osmotic conditions. *J Exp Biol* 198:311–324
- Tilly BC, Edixhoven MJ, van den Berghe N, Bot AG, de Jonge HR (1994) Ca $^{2+}$ -mobilizing hormones potentiate hypotonicity-induced activation of ionic conductances in Intestine 407 cells. *Am J Physiol* 267:C1271–C1278
- Tilly BC, van den Berghe N, Tertoolen LG, Edixhoven MJ, de Jonge HR (1993) Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J Biol Chem* 268:19919–19922
- vom Dahl DS, Schliess F, Reissman R, Gorg B, Weiergraber O, Kocalkova M, Dombrowski F, Hausinger D (2003) Involvement of integrins in osmosensing and signalling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 278:27088–27095
- Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RK (2003) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1–80

Potentialiation by Thrombin of Hyposmotic Glutamate and Taurine Efflux from Cultured Astrocytes: Signalling Chains

S. Cruz-Rangel · R. Hernández-Benítez ·
E. Vázquez-Juárez · A. López-Domínguez ·
H. Pasantes-Morales

Accepted: 14 February 2008 / Published online: 21 March 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Activation of protein-activated receptor (PAR-1) by thrombin potentiates the hyposmotic efflux of ^3H -D-aspartate and ^3H -taurine from cultured cerebellar astrocytes. This effect is mediated by a thrombin-elicited increase in cytosolic Ca^{2+} levels $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the activation of phosphoinositide-3-kinase (PI3K). These signalling pathways operate independently showing additive effects if prevented simultaneously. The contribution of the Ca^{2+} -mediated pathway to thrombin-increased D-aspartate or taurine efflux, evaluated by the inhibitory effect of preventing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise, was higher for D-aspartate (64% efflux decrease) than for taurine (40% decrease). The PI3K blocker decreased 48% and 36% D-aspartate and taurine efflux, respectively. Hyposmolarity increases phosphorylation of EGFR and c-src, but thrombin did not enhance this effect. Blockade of EGFR/src phosphorylation marginally reduced (11–14%) the hyposmolarity plus thrombin efflux of D-aspartate; taurine efflux was more sensitive to these blockers (18–26%). Since thrombin has no effect increasing EGFR/src phosphorylation in astrocytes, the contribution of this transactivation pathway may represent the inhibition of the hyposmotic efflux solely.

Keywords Thrombin transactivation · Epidermal growth factor receptor · Volume regulation · Swelling

Special issue article in honor of Dr. Ricardo Tapia.

S. Cruz-Rangel · R. Hernández-Benítez · E. Vázquez-Juárez ·
A. López-Domínguez · H. Pasantes-Morales (✉)
Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico, DF 04510, Mexico
e-mail: hpasante@ifc.unam.mx

Introduction

Animal cells have a characteristic volume defined for each cell lineage. Preserving this volume is necessary to maintain the cytoarchitecture and the proper concentration of signalling molecules in the cytosol. Although in physiological conditions the extracellular fluids have a highly controlled osmolarity, the water content in intracellular compartments can be transiently and continuously altered during the normal function of the cell. Nutrient uptake, cell motility, secretion, synaptic ion gradients, synthesis and degradation of macromolecules are, among others, situations creating local osmotic gradients. Adaptive mechanisms to counteract these changes are necessary to maintain the cytoarchitecture necessary for the correct spatial assembly of transduction networks. Cell volume is also disturbed in pathological conditions. Cell volume gain occurs when the osmolarity of the fluids is perturbed by failure in the mechanisms of osmotic control. Pathologies leading to hyponatremia generate hyposmotic swelling [1]. This occurs in acute or chronic renal failure, hepatic cirrhosis, congestive heart failure, or nephrotic syndrome, psychogenic polydipsia or during endurance athletic events. Hyponatremia occurs also in the elderly and during pregnancy [1]. Cell swelling occurs also without a change in external osmolarity. This type of swelling known as cytotoxic swelling is due to ion redistribution or accumulation of osmotically active solutes, followed by obligated water. It is commonly associated with hypoxic or ischemic episode and with hepatic encephalopathy [2, 3, 4]. Changes in cell volume are potentially harmful in all cells but it is particularly detrimental in brain, due to the restrictions to expansion imposed by the rigid cranium. As expansion occurs, the constraining of small vessels generates episodes of ischemia, infarct, excitotoxicity and neuronal death. In

extreme conditions, caudal herniation of the brain parenchyma through the foramen magnum affects brain stem nuclei resulting in death by respiratory and cardiac arrest.

Astrocytes are the brain cells preferentially swelling in both, hyposmotic or isosmotic conditions. In hyposmolarity, the higher swelling observed in astrocytes with respect to neurons may be due either to the preferential expression of aquaporins or to a more efficient operation of volume regulation in neurons as compared to astrocytes. This later notion is supported by a study showing that upon a hyposmotic condition *in vivo*, the Purkinje cells in the cerebellum release an abundant pool of taurine which is transferred to neighbour astrocytes [5]. As consequence of this taurine translocation, neurons are preserved while astrocytes swell. In isosmotic conditions generating high levels of extracellular K^+ , the role of astrocytes protecting neurons by siphoning K^+ results in astrocyte swelling [6, 7].

The cell response to hyposmotic swelling has been extensively examined in brain cells in culture, neurons as well as astrocytes. Upon exposure to reduced external osmolarity, cells first swell and then activate a mechanism of volume regulatory decrease (RVD) consistent in the extrusion of osmotically active solutes followed by water. This is an active mechanism occurring in spite of the persistence of the hyposmotic condition [8, 9]. The osmolytes involved in RVD are the main intracellular ions K^+ and Cl^- and a large number of heterogeneous small organic molecules, grouped on the term of organic osmolytes [10]. Amino acids are part of this pool of organic osmolytes. Taurine, GABA and glutamate are released from neurons and astrocytes in response to hyposmotic swelling [11]. This might affect neuronal excitability, GABA and glutamate being major neurotransmitters.

Besides the activation of osmolyte efflux pathways, other effectors are also linked to swelling and RVD. Membrane remodelling, reorganization of the cytoskeleton, activation of stress-detecting molecules and reactions to alert the cell of situations threatening survival. All these are reactions necessary for the cell to adapt to the complex and varied changes imposed by the change in cell volume, during swelling first and during the subsequent volume recovery. It is not surprising then, that changes in cell volume activate a variety of signalling chains, which are now being explored in detail. Furthermore, from the number of signalling molecules activated it is necessary to assign each of them to the variety of responses evoked by swelling. A further complication may result if the signalling chains are not the same in all cells. An example of this possible variation is the influence of Ca^{2+} on RVD. An increase in $[Ca^{2+}]_i$ is a most consistent response of cells to swelling. However, RVD is Ca^{2+} -dependent in some cells and Ca^{2+} -independent in other cells [12]. In the first case,

$[Ca^{2+}]_i$ increase influence Ca^{2+} -activated K^+ channels, mainly of the large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels, and elicit K^+ efflux, which is an early event in RVD. In contrast, in another large number of cells, these channels are not involved in RVD but the corrective K^+ efflux occurs through other types of K^+ channels such as voltage-dependent or swelling activated K^+ channels [13, 14], which are not responding to Ca^{2+} increase. In these cells, consequently, RVD is Ca^{2+} -independent. Other osmolyte pathways such as the volume-sensitive channel and the taurine (organic osmolyte) efflux pathway are largely Ca^{2+} -independent [12, 13].

An interesting observation is that even in those cells showing Ca^{2+} -independent RVD, increasing $[Ca^{2+}]_i$ over the levels elicited by the hyposmotic stimulus markedly potentiates some of the osmolyte efflux pathways, notably the organic osmolyte efflux pathway. This effect of $[Ca^{2+}]_i$ increasing organic osmolyte fluxes has been observed when $[Ca^{2+}]_i$ rise is evoked by a Ca^{2+} ionophore (ionomycin) [15] or by increasing $[Ca^{2+}]_i$ by activation of G-protein coupled receptors (GPCRs) of the subfamily activating a PLC- Ca^{2+} pathway [Rev. in 16]. At present, a variety of these receptors have been shown to stimulate the hyposmotic taurine efflux in various cell types. Purinergic, PAR-1, M3 muscarinic, H1 histamine and lysophospholipid receptors increase the hyposmotic taurine efflux in a large variety of cell types [Rev. in 16]. This effect of GPCRs is also exerted on other osmolytes. Glutamate (*D*-aspartate) efflux is potentiated by agonists of purinergic and PAR-1 receptors in cultured astrocytes [17, 18] and by the muscarinic cholinergic receptor agonist Oxo-M in SH-SY5Y cells [19], this receptor also increases the swelling sensitive efflux of myo-inositol from SH-SY5Y cells [20].

These effects of GPCRs agonists increasing organic osmolyte fluxes appear to be essentially mediated by the PLC- Ca^{2+} pathway, being all of them Ca^{2+} -dependent to some extent. The degree of dependence, though, varies according to the agonists examined, the osmolyte traced and the magnitude of osmolarity reduction [16].

Besides the Ca^{2+} -dependent signalling chain, a variety of GPCR activate other signalling cascades via their interaction with growth factor receptors. These form an important family of transmembrane molecules with intrinsic tyrosine kinase activity, which activate a plethora of intracellular signalling elements. Hyposmotic swelling activates some of these receptors. EGFR activates by hyposmolarity in fibroblasts and keratinocytes [21, 22] and phosphorylation of ErbB4 is increased by swelling in cerebellar granule neurons [23]. There is evidence now available about an active cross-talk between GPCRs and tyrosine kinases, by a mechanism known as transactivation. EGFR and members of the src family are the molecules more directly involved in this interplay [24, 25, 26].

GPCR/tyrosine kinase crosstalk is only starting to be examined in reference to cell volume regulation. A recent study from our group in 3T3 fibroblasts [27] shows that activation of PAR-1 by thrombin potentiates the hyposmotic phosphorylation of EGFR and src and that these two molecules have an important contribution to the hyposmotic efflux of taurine activated by thrombin. In contrast, the increase of the hyposmotic glutamate efflux by activation of two GPCRs, the purinergic P2Y receptor and the PAR-1 receptor, appear to be largely dependent on the PLC-Ca²⁺ pathway [17, 18]. This is a marked difference with the response in fibroblasts in which inhibition of the PLC-Ca²⁺ pathway by EGTA-AM or U73122 reduced the efflux of taurine by 40–50% [27]. This may be due to a cell difference or to an osmolyte difference. This was investigated in the present study in which we examined (i) the effect of thrombin on EGFR or src phosphorylation increased by hyposmolarity, (ii) the effect of src and EGFR blockers on the thrombin increased glutamate efflux and (iii) the effect of the same treatment on the potentiation by thrombin of the hyposmotic taurine efflux.

Results and Discussion

Thrombin Markedly Enhanced [Ca²⁺]_i in Astrocytes Which Contributes to the Potentiation of Glutamate and Taurine Efflux

Cultured astrocytes in isosmotic conditions have a [Ca²⁺]_i of about 60 nM. Reduction in external osmolarity (30%) induced a small and sustained increase in [Ca²⁺]_i which in average is 64.3% higher than in isosmotic conditions, reaching 100 nM (Fig. 1). Addition of thrombin markedly enhances [Ca²⁺]_i. At the peak, [Ca²⁺]_i is more than 5-fold that found in isosmotic conditions and 4.5-fold that elicited by hyposmolarity (Fig. 1). This is a well known effect of thrombin, documented in a large variety of cells. In a previous study in cultured cerebellar astrocytes [17] we investigated the source of this thrombin-elicited [Ca²⁺]_i rise, by treating cells with Ca²⁺-free medium (plus 0.1 mM EGTA) to evaluate the contribution of extracellular Ca²⁺, or with ionomycin to deplete all internal stores. It was found that the contribution of external and internal sources is similar, of about 50% each. We now examined the influence of preventing [Ca²⁺]_i rise on the efflux of taurine potentiated by thrombin, and compared to that previously observed for glutamate.

Exposure to 30% hyposmotic solution increased ³H-D-aspartate efflux from cultured astrocytes. The efflux of ³H-D-aspartate in isosmotic conditions which was in average 0.6% (percentage of total accumulated radioactivity), increased to about 3% at the peak release reached 2–3 min

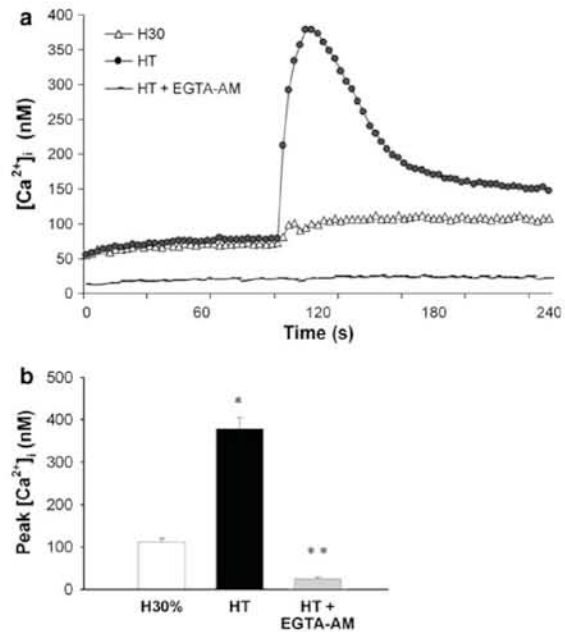


Fig. 1 Hyposmolarity and hyposmolarity plus thrombin-induced increase in [Ca²⁺]_i in cultured cerebellar astrocytes. Cells plated on rectangular glass coverslips (10 × 50 mm) in plastic dishes were loaded by incubation with fura-2-AM (2.5 μM) for 60 min. Digital images of the cells were obtained in a Fluoromax-3 Horiba luminescence spectrometer at an emission wavelength of 510 nm using paired exposures to 340 and 380 nm excitation wavelength sampled every 3 s. The change in [Ca²⁺]_i was monitored by fluorescence under isosmotic conditions until the baseline was stable and then medium was made hyposmolar (30%) by addition of the appropriate volume of distilled water. (a) Representative traces of the increase in [Ca²⁺]_i determined from the ratiometric changes in fluorescence. (b) Peak transient levels in [Ca²⁺]_i reached at the indicated conditions: H30%, medium with 30% reduced osmolarity; HT: hyposmotic plus thrombin medium. Data are means ± SE (*n* = 4) analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Significantly different from the hyposmotic condition **P* < 0.01; significantly different from the HT condition ***P* < 0.01

after the stimulus. Thereafter the efflux slowly inactivated towards basal levels. The net release in the four largest fractions i.e., the hyposmotic release minus the release in isosmotic conditions reached 7% (Fig. 2a). Addition of thrombin (5 U/ml) markedly potentiated the hyposmotic glutamate release. In the presence of thrombin, the net release of the four main fractions was 38%, corresponding to 5.4-fold increase over the hyposmotic release (Fig. 2a). These results agree with those previously reported in cerebellar astrocytes measuring ³H-glutamate efflux [17]. The effect of thrombin increasing ³H-D-aspartate efflux was largely dependent on the thrombin-induced increase in [Ca²⁺]_i. This is a well known signalling pathway evoked by the thrombin-induced PAR-1 activation. In the present study, preventing [Ca²⁺]_i rise by EGTA-AM (Fig. 2b)

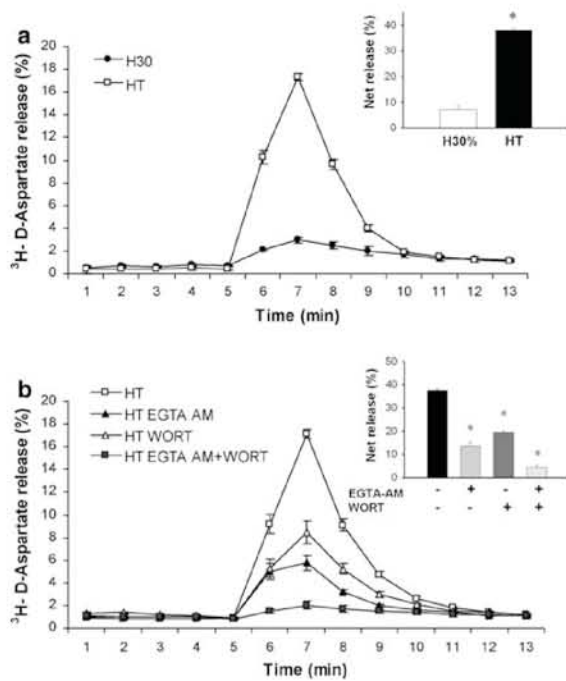


Fig. 2 Effect of thrombin increasing the hypotonic efflux of ³H-D-aspartate from cultured cerebellar astrocytes. (a) Time course of ³H-D-aspartate release by hypotonic 30% condition (H30%) (●) and its potentiation by thrombin (5 U/ml; HT) (□). Cells preloaded with ³H-D-aspartate were superfused (1 ml/min) with isotonic medium, and then (fraction No. 5) with 30% hypotonic medium. Isotonic medium, 300 mOsm; 135 mM NaCl; H30% made by equimolar reduction of NaCl. Thrombin was added to the hypotonic solutions. Points represent the radioactivity released at each fraction, expressed as percentage of total radioactivity accumulated during loading. Bars represent the release of ³H-D-aspartate released in the four main fractions of the peak after the stimulus minus four fractions of the release in isotonic conditions (net release). Dashed bars: thrombin 5 U/ml (HT), empty bars: no thrombin added (H30%). (b) Effects of PI3K blockade by wortmannin and of prevention of Ca²⁺ rise by treatment with EGTA-AM on hypotonicity plus thrombin-elicited ³H-D-aspartate efflux. Cells stimulated with hypotonicity plus thrombin (□), pretreated with wortmannin 250 nM (△) or with EGTA-AM 25 μM in external Ca²⁺-free medium (▲) or with the two conditions simultaneously (■). Bars represent net release as above described. Results are means ± SE of 3–8 experiments and analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Significantly different from the control condition HT, **P* < 0.05

reduced D-aspartate efflux by 64%, stressing the importance of the Ca²⁺-dependent signalling pathway on the effect of thrombin.

Thrombin action on the hypotonic taurine efflux was next examined. Figure 3a shows the time course of ³H-taurine efflux evoked by hypotonicity. This response has been described in a large variety of cells including cultured astrocytes. In most cell types, the hypotonic taurine efflux is only marginally Ca²⁺-dependent [12]. However, increasing [Ca²⁺]_i by ionomycin markedly potentiates this

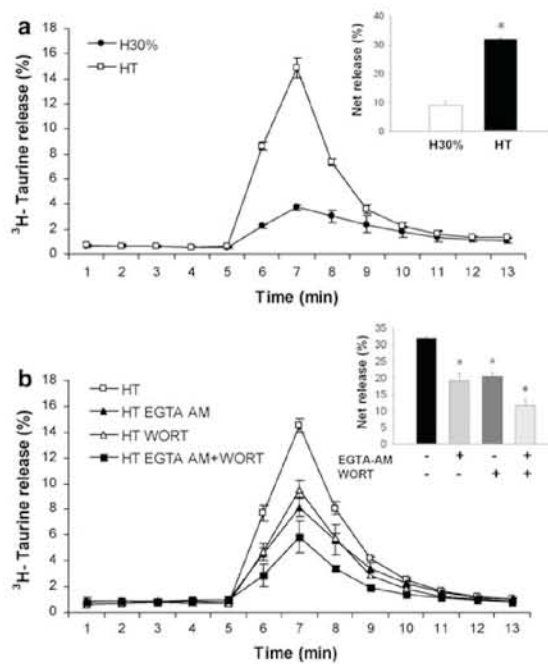


Fig. 3 Effect of thrombin increasing the hypotonic efflux of ³H-taurine from cultured cerebellar astrocytes. (a) Time course of ³H-taurine release by exposure to osmolarity reduced medium (H30%) (●) and its potentiation by addition of thrombin (5 U/ml; HT) (□). Experimental procedure details as in Fig. 2. (b) Effects of PI3K blockade by wortmannin and of prevention of Ca²⁺ rise by treatment with EGTA-AM on hypotonicity plus thrombin-elicited ³H-taurine efflux from cultured cerebellar astrocytes. Cells stimulated with hypotonicity plus thrombin (□), pretreated with wortmannin 250 nM (△), with EGTA-AM 25 μM in external Ca²⁺-free medium (▲) or with the two conditions simultaneously (■). Points represent the radioactivity released at each fraction, expressed as percentage of total radioactivity accumulated during loading. Bars represent net release of ³H-taurine as described in Fig. 2. Results are means ± SE of 3–8 experiments and analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Significantly different from HT, **P* < 0.05

efflux [15]. As shown in Fig. 3a, a 3.6-fold increase of hypotonic taurine efflux was observed in the presence of thrombin. Thrombin potentiates taurine efflux also in astrocytoma and neuroblastoma cells [28, 29] and in 3T3 fibroblasts [27]. The hypotonic efflux of taurine enhanced by thrombin was 40% decreased by cell treatment with EGTA-AM (Fig. 3b). This inhibition is lower than that found for glutamate efflux, and more close to the 45% found in a previous study in fibroblasts [27].

The Contribution of PI3K

An additional element in the signalling pathway by which thrombin potentiates the hypotonic D-aspartate and taurine efflux is PI3K. Inhibition of PI3K by wortmannin

inhibited the thrombin-increased hyposmotic D-aspartate efflux by 48%. The simultaneous treatment with EGTA-AM, to prevent the thrombin-elicited $[Ca^{2+}]_i$ rise and of wortmannin to inhibit PI3K, essentially abolished D-aspartate efflux (almost 90% inhibition), showing that the two signalling pathways operate independently and almost fully account for the hyposmotic efflux of D-aspartate in the presence of thrombin (Fig. 2b). Blockade of PI3K also reduced the hyposmotic plus thrombin efflux of taurine by 36% (Fig. 3b), a less potent effect than that observed for D-aspartate. When cells are treated with EGTA-AM and wortmannin together, the hyposmotic plus thrombin taurine efflux decreased 63% (Fig. 3b), also significantly less than the inhibition of D-aspartate in the same condition. This may suggest the involvement of another signalling element for taurine efflux.

Thrombin is not Increasing the Hyposmolarity-Evoked EGFR or src Phosphorylation in Astrocytes

Transactivation of growth factor receptors by GPCRs is well documented [24–26]. A link between PAR-1 activation by thrombin and EGFR has been described in various cell types, although the nature and prevalence of this transactivation in connection with RVD or osmolyte fluxes has not been explored in detail. A study in 3T3 fibroblasts showed the potentiation by thrombin of the hyposmotic increase in EGFR phosphorylation [27]. This was not observed in cultured astrocytes, as shown in Fig. 4. The hyposmotic condition increased EGFR phosphorylation by about 40% over phosphorylation in isosmotic medium, but at variance to that found in fibroblasts, the presence of thrombin did not further enhance this effect (Fig. 4). The EGFR phosphorylation blocker AG1478 markedly reduced the increase elicited by the hyposmotic condition.

The phosphorylation of c-src was also enhanced by hyposmolarity in 3T3 fibroblasts [27], but similar to EGFR, thrombin did not increase but rather reduced c-src phosphorylation (Fig. 5). The src blocker PP2 has a potent inhibitory effect and essentially abolished the hyposmolarity-elicited phosphorylation in the presence or absence of thrombin. These results show that, in contrast to the effect of thrombin in fibroblasts increasing c-src phosphorylation, this interaction is not observed in cultured astrocytes. These results show that in these cells the EGFR/src pathway is not a prominent signalling chain in the process of thrombin potentiation of the hyposmotic glutamate efflux.

Contribution of the EGFR/src Pathway to the Thrombin-Elicited Efflux of Glutamate and Taurine

We next examined the effect of blockade of the EGFR/src pathway on the thrombin potentiated efflux of D-aspartate

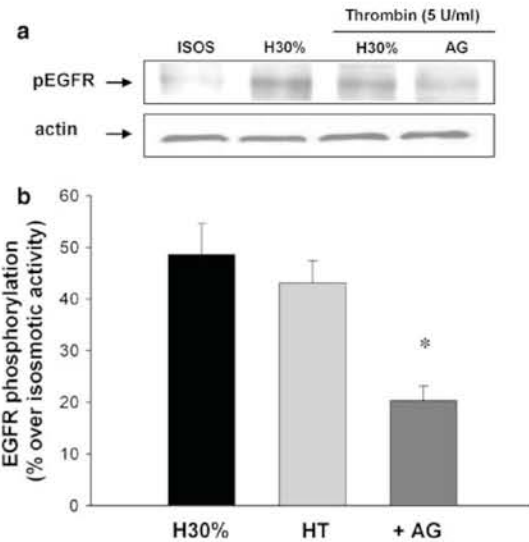


Fig. 4 Effects of hyposmolarity and of hyposmolarity plus thrombin on EGFR phosphorylation. Serum starved cultured cerebellar astrocytes were exposed to the indicated conditions for 3 min and lysates were assayed for EGFR phosphorylation by Western blotting with anti-phospho EGFR (Tyr 1173) antibody. (a) Representative blot showing the phosphorylation of EGFR induced by hyposmolarity (H30%) and hyposmolarity plus thrombin (5 U/ml, HT) in astrocytes pre-treated or not with the EGFR inhibitor AG1478 (10 μ M) for 20–30 min; lower blot: anti-actin antibody used as an internal standard to normalize protein concentration in each lane. (b) Bands were quantified by densitometer and EGFR phosphorylation is expressed in bars as percentage of the phosphorylation increase over the activity in the isosmotic condition. Data are means \pm SE ($n = 3-5$) and analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Significantly different from HT condition * $P < 0.01$

and taurine from cultured astrocytes. The thrombin-potentiated hyposmotic D-aspartate release was reduced 11–14% upon blockade of EGFR or c-src phosphorylation by AG1478 or PP2 (Fig. 6a). The release of taurine was more sensitive to these blockers, being inhibited 18–26% (Fig. 6b). This suggests a higher contribution of this pathway to taurine efflux as compared to D-aspartate. However, the contribution of EGFR/src in astrocytes is lower than that found in a previous study in fibroblasts. At variance to that found in astrocytes, in these cells we found an effect of thrombin increasing EGFR and src phosphorylation induced by hyposmolarity and a reduction of over 40% of hyposmolarity plus thrombin-induced taurine efflux [27]. Since in astrocytes, thrombin had no effect increasing the hyposmolarity-evoked EGFR or c-src phosphorylation, the reduction in D-aspartate and taurine efflux by its blockade may correspond to the inhibition of the hyposmotic release in the absence of thrombin. The contribution of the three signaling elements, i.e. $[Ca^{2+}]_i$ rise, PI3K and EGFR on taurine efflux is demonstrated by results in Fig. 7

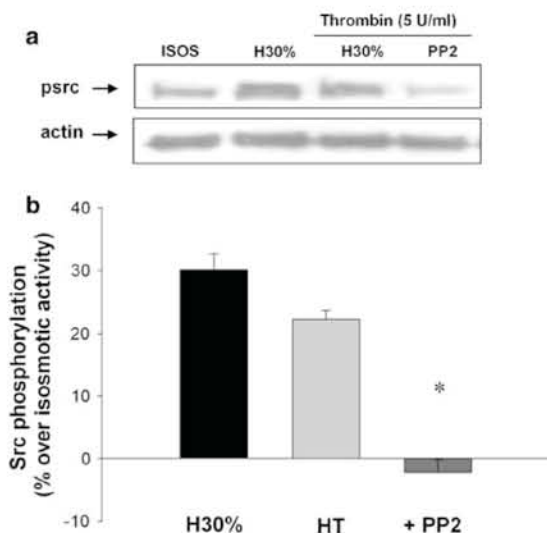


Fig. 5 Effects of hypotonicity and of hypotonicity plus thrombin on c-src phosphorylation. Cell lysates obtained as in Fig. 4 were assayed for c-src phosphorylation by Western blotting with anti-phospho c-src (Tyr 418) antibody. (a) Representative blot showing the phosphorylation of c-src induced by hypotonicity (H30%) and hypotonicity plus thrombin (5 U/ml, HT) in astrocytes pre-treated or not with the src family inhibitor PP2 (10 μM) for 20–30 min; lower blot: anti-actin antibody used as an internal standard to normalize protein concentration in each lane. (b) Bands were quantified by densitometer, and c-src phosphorylation is expressed as in Fig. 4. Significantly different from the HT condition **P* < 0.01

showing the additive effect of blockade of each one of these pathways, which essentially abolished taurine efflux elicited by hypotonicity plus thrombin.

Results of the present study showed that in cultured astrocytes, D-aspartate efflux evoked by hypotonicity plus thrombin is importantly mediated by a Ca²⁺-dependent pathway, plus a contribution of PI3K, and that blockade of these two pathways reduces its release over 90%. The src/EGFR signalling pathway may account for the remaining 10%, and may reflect the marginal contribution of this pathway of the hypotonic efflux in the absence of thrombin. In the case of taurine, the same signalling elements contribute to the hypotonic plus thrombin efflux, but the Ca²⁺- and PI3K-dependent pathways are less influential and the EGFR/src pathway is more influential than for D-aspartate efflux. These results indicate a difference between taurine and D-aspartate efflux regarding the importance of Ca²⁺/PI3K, as well as a difference between cultured astrocytes and fibroblasts regarding the importance of the thrombin transactivation of the EGFR/src pathway, which in astrocytes is clearly lower than in fibroblasts. The reason for this difference is so far unclear but may be due either to cell differences or to a lower expression of EGFR in astrocytes at 15 days in vitro, as used in this study, since it is known that EGFR expression

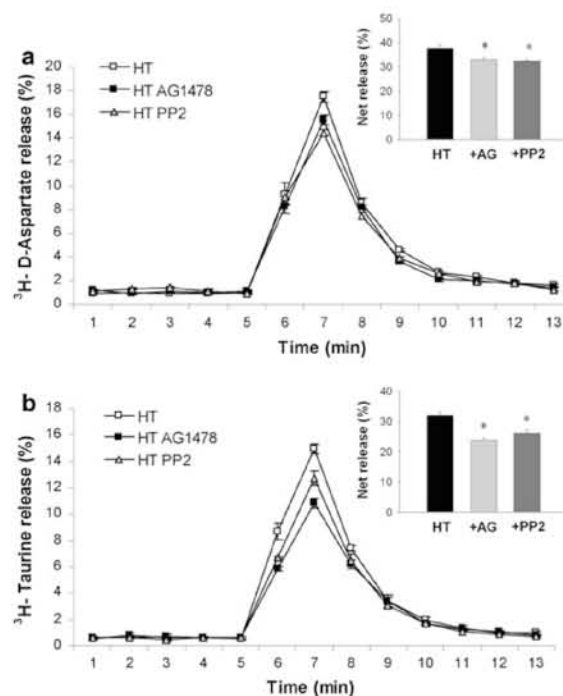


Fig. 6 Effects of EGFR and c-src phosphorylation blockade on (a) ³H-D-aspartate and (b) ³H-taurine efflux elicited by hypotonicity plus thrombin (HT), in cells pretreated with AG1478 (10 μM, 30 min) or with PP2 (10 μM, 30 min). Bars represent net release as in Fig. 2. Means ± SE of 3–8 experiments. Significantly different from the control (HT) condition, **P* < 0.05

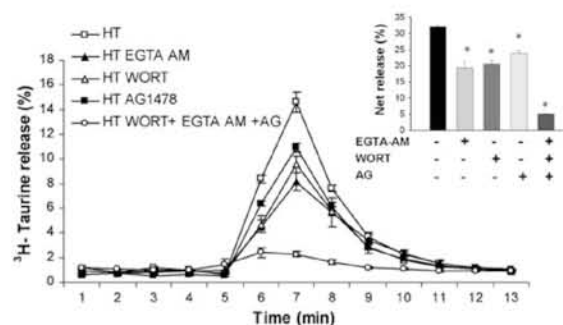


Fig. 7 Additive inhibitory effects of simultaneous blockade of the Ca²⁺-dependent, PI3K and EGFR pathways on ³H-taurine efflux. ³H-taurine efflux in cells stimulated with HT (□), treated with EGTA-AM (25 μM) in external Ca²⁺-free medium (▲), wortmannin (250 nM, 1 h) (Δ) and AG1478 (10 μM, 30 min) (■), or the three conditions simultaneously (○). Bars represent net ³H-taurine release as in Fig. 2. Means ± SE of 3–8 experiments. Significantly different from HT, **P* < 0.05

is reduced in differentiated astrocytes [30]. Studies on other cell types as well as a study in astrocytes at earlier stages of in vitro differentiation may contribute to clarify these points.

A significant contribution of PI3K in the thrombin increased hyposmotic efflux of D-aspartate and taurine efflux was found in the present study. The participation of PI3K might result from thrombin/EGFR transactivation, in turn influencing PI3K. This is not supported though, by the relatively minor influence of the EGFR/src pathway on D-aspartate and taurine fluxes, lower than that of PI3K, as well as by the additive contribution of the PI3K and the EGFR/src pathways here demonstrated. Another possible mechanism of PI3K activation is through the $\beta\gamma$ subunits of the G-protein coupled to the PAR receptor. This possibility remains to be investigated.

It is worthy to notice that the increase in taurine and glutamate efflux elicited by thrombin as well as by other GPCR agonists occurs essentially through the volume-sensitive organic osmolyte efflux pathway, being essentially abolished by blockers of this pathway.

Acknowledgements The authors acknowledge the valuable technical assistance of Claudia Peña Segura and Gerardo Ramos Mandujano. This work was supported by grants No. 46465 from CONACYT, México and IN209507 from DGAPA, UNAM.

References

1. Sterns RH, Silver SM (2006) Brain volume regulation in response to hypo-osmolality and its correction. *Am J Med* 119:S12–S16
2. Unterberg AW, Stover J, Kress B et al (2004) Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129:1021–1029
3. Mongin AA (2007) Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: the perfect storm. *Pathophysiology* 14:83–93
4. Norenberg MD (1993) Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13:319–335
5. Nagelhus EA, Lehmann A, Ottersen OP (1993) Neuronal-glia exchange of taurine during hypo-osmotic stress: a combined immunocytochemical and biochemical analysis in rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 54:615–631
6. Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291–300
7. Leis JA, Bekar LK, Walz W (2005) Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 50:407–416
8. Hoffmann EK, Pedersen SF (2006) Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation. *Contrib Nephrol* 152:54–104
9. Wehner F, Olsen H, Tinel H et al (2003) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1–80
10. Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G et al (2006) Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med* 119:S4–S11
11. Tuz K, Peña-Segura C, Franco R et al (2004) Depolarization, exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes. *Eur J Neurosci* 19:916–924
12. Pasantes-Morales H, Morales Mulia S (2000) Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86:414–427
13. Stutzin A, Hoffmann EK (2006) Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. *Acta Physiol* 187:27–42
14. Niemeyer MI, Stutzin A, Sepúlveda FV (2002) A voltage-independent K^+ conductance activated by cell swelling in Ehrlich cells is modulated by a G-protein-mediated process. *Biochim Biophys Acta* 1562:1–5
15. Cardin V, Lezama R, Torres-Márquez ME et al (2003) Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca^{2+} rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia* 44:119–128
16. Vázquez-Juárez E, Ramos-Mandujano G, Hernández-Benítez R et al (2007) On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Biochem Physiol* In press
17. Ramos-Mandujano G, Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R et al (2007) Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes. *Glia* 55:917–925
18. Mongin AA, Kimelberg HK (2005) ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca^{2+} -sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C204–C213
19. Heacock AM, Kerley D, Gurda GT et al (2004) Potentiation of the osmosensitive release of taurine and D-Aspartate from SH-SY5Y neuroblastoma cells after activation of M3 muscarinic cholinergic receptors. *J Pharm Exp Ther* 311:1097–1104
20. Loveday D, Heacock AM, Fisher SK (2003) Activation of muscarinic cholinergic receptors enhances the volume-sensitive efflux of myo-inositol from SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 87:476–486
21. Franco R, Lezama R, Ordaz B (2004) Epidermal growth factor receptor is activated by hyposmolarity and is an early signal modulating osmolyte efflux pathways in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 447:830–839
22. Kippenberger S, Loitsch S, Guschel M et al (2005) Hypotonic stress induces E-cadherin expression in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* 579:207–214
23. Lezama R, Ortega A, Ordaz B et al (2005) Hyposmolarity-induced ErbB4 phosphorylation and its influence on the non-receptor tyrosine kinase network response in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 93:1189–1198
24. Daub H, Wallasch C, Lankenau A et al (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16:7032–7044
25. Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11:177–183
26. Luttrell DK, Luttrell LM (2004) Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and src family kinases. *Oncogene* 23:7969–7978
27. Vázquez-Juárez E, Lezama RA, Ramos-Mandujano G et al (2007) Thrombin potentiates hyposmotic taurine efflux, ICl^-_{swell} and RVD in Swiss 3T3 fibroblasts by a src-dependent EGFR transactivation. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 455:859–872
28. Cheema TA, Ward CE, Fisher SK (2005) Subnanomolar concentrations of thrombin enhance the volume-sensitive efflux of taurine from human 1321N1 astrocytoma cells. *J Pharm Exp Ther* 315:755–763
29. Cheema TA, Pettigrew VA, Fisher SK (2007) Receptor regulation of the volume-sensitive efflux of taurine and iodide from human SH-SY5Y neuroblastoma cells: differential requirements for Ca^{2+} and protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1068–1077
30. Liu B, Neufeld AH (2007) Activation of epidermal growth factor receptors in astrocytes: from development to neural injury. *J Neurosci Res* 85:3523–3529

REVIEW

BRAIN VOLUME REGULATION: OSMOLYTES AND AQUAPORIN PERSPECTIVES

H. PASANTES-MORALES* AND S. CRUZ-RANGEL

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, México

Abstract—Cerebral water control is critical to maintain neuronal excitability, and to prevent injuries derived from brain swelling or shrinkage. The influence of aquaporins (AQPs) in the balance of water distribution between intracranial compartments is getting much experimental support. The importance of AQPs in fluid clearance during vasogenic brain edema seems well established but their role in cytotoxic swelling and in brain cell shrinkage is not known in detail. The main AQPs function as water channels anticipates their influence on cell volume changes as well as on the mechanisms of volume recovery, which include notably the osmolyte translocation across the cell membrane. Osmolyte fluxes permit the reestablishment of an osmotic balance and volume recovery in anisotonic-elicited cell volume changes, but are also causal factors per se of brain cell swelling or shrinkage in pathological situations. This review aims to inform on the so far described functional interactions between AQPs and osmolyte fluxes and their volume-sensitive pathways. It also points to the coincidence of AQPs and activation of osmolyte fluxes in physiological and pathological conditions and to the importance of finding possible functional links between these two events, thus enlarging the possibilities via AQP manipulations, to prevent the adverse consequences of cell volume changes in brain. © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: glutamate, G protein coupled receptors, ischemia, hyposmolarity, astrocytes.

	Contents	
Osmolytes in brain cells		872
Osmolytes, AQPs and cytotoxic swelling		873
Hyposmotic swelling		873
Swelling, AQPs and brain excitability		875
AQPs, osmolytes and ischemia		876

*Corresponding author. Tel: 5255-5622-5588; fax: 5255-5622-5607. E-mail address: hpasante@ifc.unam.mx (H. Pasantes-Morales).
Abbreviations: 9-AC, anthracene-9 carboxylate; BKCa, large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels; CaMK, calcium/calmodulin-dependent protein kinase; CKII, casein kinase II; DCPIB, 4-[(2-Butyl-6,7 dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1oxo-1H-inden-5-yl)oxy] butanoic acid; DHPG, S-3,5 dihydrophenylglycine; DIDS, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid; GPC, glycerophosphorylcholine; GPCR, G protein coupled receptor; HERG, ether a go-go K⁺ channels; K2P, two-pore domain K⁺ channels; KCC, K⁺/Cl⁻ cotransporter; Kir4.1, inwardly rectifying K⁺ channel 4.1; Kv, voltage-gated K⁺ channels; NKCC, N⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter; NPPB, 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid; PCr, phosphocreatine; PEA, phosphoethanolamine; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; TASK, TWIK-related acid-sensitive K⁺ channels; TRPV4, transient receptor potential vanilloid-4 channel.

0306-4522/10 \$ - see front matter © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.074

Osmolytes in brain and spinal cord trauma	876
G protein coupled receptors, osmolyte fluxes and AQPs	877
Osmolytes, volume changes and AQPs in apoptosis and necrosis	879
Conclusions and perspectives	880
Acknowledgments	880
References	880

The maintenance of a constant volume is critical for cell homeostasis. Even small changes in cell water content may affect the concentration of molecules involved in signaling cascades and modify the intracellular and cell-to-cell communication. The complex architecture of intracellular compartments is also disturbed by uncontrolled changes in water content, with adverse consequences for functional molecule interactions. The hydration state of the cytoplasmic gel is another important factor to be considered. It is then anticipated that basic mechanisms for volume regulation have been preserved in essentially all animal cells.

Changes in cell volume occur in both physiological and pathological conditions. In terrestrial species, the osmolarity of extracellular fluids is highly controlled by renal systems, but pathological states compromise the systemic osmolarity or the distribution of osmotically active solutes. In physiological conditions, the intracellular volume is continuously affected by local and transient osmotic microgradients generated by nutrient uptake, synaptic function, secretion, cytoskeletal remodeling, among others (Lang et al., 1998; Wehner et al., 2003; Hoffmann et al., 2009).

Cell volume perturbation is a challenge for cells in all animal organs, but has particularly dramatic consequences in brain. Brain volume increase is restricted by the rigid skull and as tissue expansion occurs, the constraining and eventual rupture of vasculature generates ischemic and hemorrhagic stroke. Excitotoxicity and neuronal death in the perifocal area spreads the injury. In extreme conditions, caudal herniation of the brain parenchyma interferes with brain stem nuclei, with high risk of mortality by respiratory and cardiac arrest (Kimelberg, 1995; Simard et al., 2007). Swelling also affects brain excitability, generating seizure states or increasing seizure susceptibility (Andrew et al., 1989; Andrew, 1991).

Brain edema has been classified as vasogenic, when is caused by the blood barrier disruption, or cytotoxic when results from a pathological condition without rupture of the blood–brain barrier (Klatzo, 1994). In most pathologies, one type of edema gradually results in the development of

the other type. In this review about osmolytes and AQPs will focus on cytotoxic swelling of the type developed in hyponatremia, epilepsy, ischemia, and in head and spinal cord trauma. These are multifactorial pathologies with a number of common events, many of them being swelling effectors. Energy failure, depolarization, high extracellular K^+ levels, extracellular glutamate rise, lacticidosis, oxidative stress, membrane damage and ion overload, all concur in these pathologies to end up in cell swelling.

Since the early work of Manley et al. (2000) the role played by AQPs in pathological brain swelling has received much attention (rev. in Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003; Papadopoulos and Verkman, 2007; Tait et al., 2008; Verkman, 2009; Zador et al., 2009). AQP subtypes found in brain and spinal cord are AQP4, AQP1 and AQP9. AQP4 is the principal AQP in brain and is found predominantly in astrocytes, at the endfeet processes at the perivascular space, glia limitans and subependymal astrocytes (Venero et al., 2001; Badault et al., 2002). It is expressed also in astrocytes of other brain regions, notably at those related with osmotic control such as the hypothalamic magnocellular nuclei and the subfornical organ (Nielsen et al., 1997). AQP9 is expressed in brain colocalized with AQP4 at the astrocyte endfeet and in Bergmann glia (Venero et al., 2001; Badault et al., 2002). AQP1 is expressed in the apical membrane of the choroid plexus epithelium, and in ganglionic sensory neurons. AQP-3, -5 and -8 are found in the piriform cortex, hypothalamus, globus pallidus and choroid plexus (Yang et al., 2009). AQP6 and AQP7 are expressed in mouse cortical neurons. The expression of AQPs in spinal cord will be addressed in detail in other contributions of this issue. Astrocytes are the cells preferentially committed in water balance within the brain compartments, a function linked to their role protecting neurons and neuronal contacts from external adverse effects (Walz, 1989; Nase et al., 2008). Astrocytes are therefore, the anticipated targets for AQP influence, particularly AQP4, in physiological and pathological conditions. Due to the lack of AQP4 inhibitors, our knowledge about the role of this molecule in brain edema and astrocyte swelling relies on the pattern and consequences of brain cell swelling in AQP4-defective animals generated by genetic deletions. AQP4-null mice as well as mice with disrupted dystrophin- α -syntrophin complex leading to dysfunctional AQP4 (Manley et al., 2000; Vajda et al., 2002; Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003) have been potent tools to investigate the role of this AQP in brain swelling. Though, results obtained from these genetically intervened animals should be taken with caution until the specificity of the genetic disruption is well established.

OSMOLYTES IN BRAIN CELLS

Brain water is distributed between blood, cerebrospinal fluid, interstitial and intracellular compartments and moves across these compartments following differences in osmotic and hydrostatic pressures. Water fluxes across the cell membrane occur following the water potential, which depends on the solute concentration at the two compart-

Table 1. Brain organic osmolyte content (mM)

Osmolyte	Rat brain	Human brain
Glutamate	10–15.4	7.5–9.5
Glutamine	3.4–5.1	5.0–5.9
Taurine	4.2–7.1	1.5–2.1
Glycine	0.9–2.0	0.66–2.4
Aspartate	1.2–3.5	0.78–2.4
GABA	1.1–3.0	0.76–.96
Alanine	1.0–3.0	1.1–1.8
N-Acetylaspartate	7.5–10	8.8–8.9
Myo-inositol	3.3–5.8	6.5–9.0
Creatine/PCr	6.6–9.7	7.4–8.4
GPC	1.0–1.2	
Betaine	0.5–0.8	
Sorbitol	0.01	
Urea	1.2–3.7	
PEA	1.8–2.1	

Results are from Perry et al., 1971; Melton et al., 1987; Lien et al., 1991; Verbalis and Gullans, 1991; Sterns et al., 1993; Videen et al., 1995; Seidl et al., 2001; Soupart et al. 2002; Massieu et al., 2004; Restuccia et al., 2004.

ments separated by the membrane. With no significant changes in hydrostatic pressure gradients, water movement depends largely on the osmotic gradients, which are created by the osmolyte concentration at the extracellular and intracellular compartments. In principle, all cytosolic free solutes participate, but to make a substantial contribution to volume changes in the whole cell, they should be present in high concentrations. When volume changes occur in intracellular compartments of small size, this requirement may not be so strict. Osmolytes in animal cells including brain cells, are the electrolytes present in high levels at the cytosol and extracellular fluids, i.e. Na^+ , K^+ and Cl^- , and small organic molecules of heterogeneous structure: amino acids and derivatives (taurine, glutamate, glycine, GABA and N-acetylaspartate), polyalcohols (myo-inositol and sorbitol) and amines (glycerophosphoryl choline, betaine, creatine/P-creatine and phosphoethanolamine) (Lang et al., 1998). In most species, organic osmolytes showing the largest concentration in brain are glutamate, myo-inositol, creatine, taurine and N-acetylaspartate, accounting by about 80% of the total pool of osmolytes (Perry et al., 1971; Lien et al., 1991; Verbalis and Gullans, 1991; Sterns et al., 1993; Soupart et al., 2002). Glutamate is consistently found at the highest levels (Table 1). Taurine is present in high concentration in rodents but its levels are low in species with poor ability for synthesis, like cat and human (Perry et al., 1971; Videen et al., 1995; Seidl et al., 2001; Restuccia et al., 2004).

Large changes in electrolyte content generate adverse effects either inside the cell by disturbing the structure of macromolecules or at the extracellular space, particularly in brain cells, due to their critical role in neuronal excitability. Organic osmolytes, in contrast, are compatible molecules, affecting neither metabolic nor functional cell conditions. Thus, in the long term, organic osmolytes tend to replace electrolytes. In the central nervous system, however, amino acids such as glutamate, GABA and glycine

have a dual role as osmolytes and neurotransmitters and their translocation may disturb brain excitability and synaptic transmission. One of the most compatible osmolyte is taurine, since it is metabolically inert, and exhibits only weak synaptic interactions (Pasantes-Morales and Schousboe, 1997; Albrecht and Schousboe, 2005).

OSMOLYTES, AQP_s AND CYTOTOXIC SWELLING

Hyposmotic swelling

Reductions in plasma osmolarity drive water fluxes into brain tissue following the osmotic gradients. Brain cells initially behave as perfect osmometers and swell, but immediately after, the loss of solutes from the intracellular and extracellular fluid spaces, provides the driving force for water fluxes and volume restoration. Volume recovery has been studied in the brain *in vivo* (Melton et al., 1987), in cultured astrocytes and neurons as well as in glial and neuronal cell lines (rev in Pasantes-Morales, 1996). The early brain response to an acute hyposmotic condition is the fast mobilization of the most abundant electrolytes, Na⁺, K⁺ and Cl⁻ (Melton et al., 1987). Net ionic loss is maximal after 3 h of water infusion, and thereafter the rate of decrease is slowed (Fig. 1). At this time, extrusion of organic osmolytes, mainly glutamate, glutamine, taurine, creatine and *myo*-inositol accomplish the long-term adaptation of brain cells (Melton et al., 1987). The organic osmolyte brain content is reduced by 50% in average. Only taurine levels continue decreasing until nearly depletion of the brain pool (Verbalis and Gullans, 1991) (Fig. 1). In the human brain, *myo*-inositol is the main contributor to volume control in hyponatremia (Videen et al., 1995). Sterns et al. (1993) estimated in 11% the increase in brain water without the contribution of organic osmolytes. This is a condition generating neurological damage, seizures and risk of mortality. The contribution of organic osmolytes limits water increase to less than 5%, thus preventing neurological deterioration. As result of this long-term adaptation to chronic hypotonicity, brain intracellular osmolarity decreases, tending to reach an equilibrium with the external hyposmotic environment. When plasma osmolarity is returned to normal, this condition is sensed as hyperosmotic by brain cells, which dehydrate and shrink, until new volume recovery mechanisms activate. Fast osmolarity corrections induce severe cell shrinkage, leading to neurological deterioration and serious clinical injury (Lien, 1995; Sterns and Silver, 2006).

The osmolyte content reduction in hyponatremia is mirrored by an increase in osmolyte efflux, observed *in vivo* in dialisates or superfusates, in brain slices and in cultured cells (Estevez et al., 1999). Manyfold increases in osmolyte efflux are consistently found, with taurine showing the largest efflux (9–22-fold) and the lowest osmolarity threshold (Wade et al., 1988; Solis et al., 1998). This could reflect a higher efficiency of the taurine efflux pathway or more availability of taurine pools for release than those of amino acids involved in other functions, such as neurotransmitters or metabolic elements.

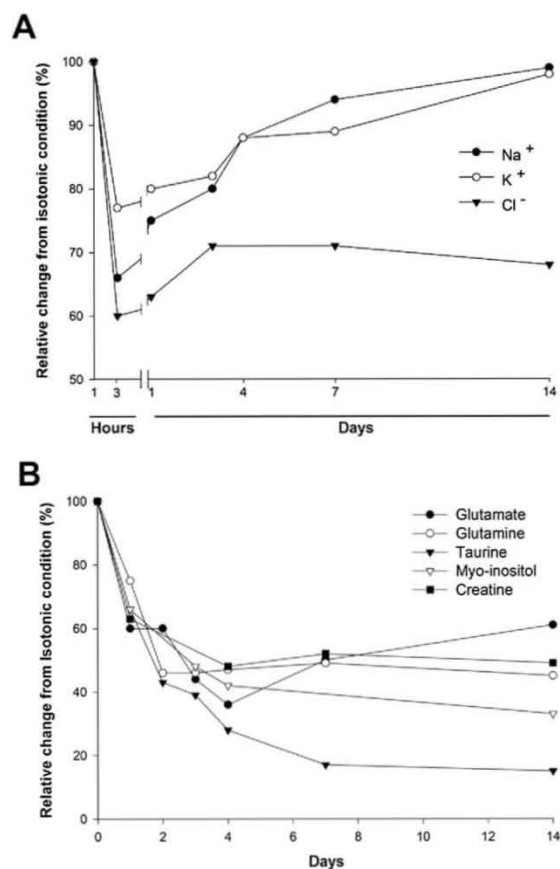


Fig. 1. Time course of rat brain content of osmolytes in experimental hyponatremia. (A) Changes in K⁺ and Cl⁻ levels and (B) major organic osmolytes. Data obtained or recalculated from Melton et al. (1987); Lien et al. (1991); Verbalis and Gullans (1991); Soupart et al. (2002); Massieu et al. (2004). Electrolyte concentrations in rat brain (mmol/kg water): Na⁺ 56–62; K⁺ 121–136; Cl⁻ 42–62 (Lien et al., 1991; Sterns et al., 1993) mmol/kg dry brain weight: Na⁺ 215–293; K⁺ 470–472; Cl⁻ 149–153 (Melton et al., 1987; Verbalis and Gullans, 1991). Organic osmolyte concentration in rat brain as in Table 1.

The osmosensitive efflux of electrolytes and organic osmolytes during acute or chronic hyponatremia is accomplished largely by solute extrusion rather than by molecular synthesis or degradation. Osmolyte efflux pathways have been characterized in cultured astrocytes and neurons, neuroblastoma and glioma cell lines and in snail neurons. K⁺ and Cl⁻ permeate through specific channels or to a lesser extent, are carried by electroneutral cotransporters. Organic osmolytes move through energy-independent leak pathways. The swelling-activated Cl⁻ channel (Cl⁻_{swell}) shows remarkably similar properties in a variety of cell types, including brain cells (Jackson and Strange, 1995; Okada, 1997; Crépel et al., 1998; Patel et al., 1998; Olson et al., 2004; Inoue et al., 2005). Cl⁻_{swell} are typically outward rectifiers with intermediate unitary conductance. Cl⁻_{swell} is highly selective to anions, and its large pore diameter of about 1.1 nM, permits the passage of large anions such as gluconate, benzoate and glutamate. Activation of Cl⁻_{swell} requires ATP, but not its hydrolysis (Jack-

son et al., 1996). The general Cl^- channel blockers DIDS, 9-AC, NPPB, DDF, and niflumic acid inhibit $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$. Phlor- etin and DCPIB are described as specific $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ blockers. A variety of Cl^- channels have been cloned and some are activated by swelling, but none of them exhibit the features characteristic of $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$, and therefore, the molecular identity of $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ remains so far unknown. In contrast to the similar features of $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ in different types of cells, a variety of K^+ channels participate in cell volume regulation (Wehner, 2006). These channels may have other functions in the cell, but activate in response to signals concurrent with swelling, such as depolarization and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise. The large-conductance- Ca^{2+} activated K^+ channels respond to small osmolarity changes in glioma C6 cells (Ordaz et al., 2004). K^+ channels directly gated by swelling have been described in Ehrlich ascites cells, but have not been yet described in brain cells (Niemeyer et al., 2002). The electroneutral cotransporters KCC-1 and KCC-3, present in glial cells, participate in volume regulation though their quantitative contribution is unclear (Ernest et al., 2005; Gagnon et al., 2007; Ringel and Plesnila, 2008; Taouil and Hannaert, 1999).

The hyposmotic efflux of taurine, glutamate and myo- inositol from brain cells occurs via a bidirectional leak pathway with net solute movement driven by the concentration gradient (Junankar and Kirk, 2000; Shennan, 2008). Remarkably, organic osmolyte fluxes are greatly reduced by $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ blockers. This raised the possibility of a common pathway for Cl^- and organic osmolytes, a suggestion supported by electrophysiological studies in astrocytes and C6 glioma cells showing permeation through $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ of glutamate and taurine in anion form (Roy, 1994). Although this is indicative of a size pore sufficiently large to permeate the amino acids, taurine has no net charge in physiological conditions, and only a small amount if any, could permeate via $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$. There is evidence contradicting the hypothesis of the shared pathway (Stutzin et al., 1999). Other candidates for permeation of osmolyte amino acids, particularly taurine are the anion exchanger (band 3) in fish erythrocytes and the phospholemman (Shennan, 2008) an homomeric channel with binding sites for cations and anions within the pore, allowing the passage of zwitterionic molecules, such as amino acids. It is still undefined whether organic osmolytes all move through a common pathway or via different pathways sharing properties such as the sensitivity to Cl^- channel blockers. Marked differences are found between glutamate and taurine osmosensitive fluxes from rat brain cortex (Haskew-Layton et al., 2008) suggesting either two different origins (neurons or astrocytes) or two different pathways for the two amino acids.

The involvement of AQPs in hypotonic brain edema seems well established. A pronounced and rapid increase in AQP4 immunoreactivity is observed in brain of mice with systemic hyponatremia (Vajda et al., 2000). There is no increase in AQP4 mRNA suggesting that secondary conformational modifications of the AQP4 protein enhance antibody binding. Direct evidence on the role of AQP4 in hypotonicity-induced brain edema came from *in vivo* stud-

ies in AQP4-null mice. After acute water intoxication, AQP4 $^{-/-}$ mice showed reduced brain water content, and a marked decrease of swelling of pericapillary astrocytic foot process (Manley et al., 2000) in addition. AQP4-defective mice respond to this toxic hyposmolarity by better neurological outcome and less mortality compared to the wild-type mice (Manley et al., 2000). Similar to findings in the AQP4 $^{-/-}$ mice, in dystrophin- or α -syntrophin-null mice, the onset of brain edema and mortality induced by acute hyponatremia are significantly delayed (Amiry-Moghaddam et al., 2004; Vajda et al., 2002). Consistent with these observations, transgenic mice with AQP4 overexpression showed an accelerated progression of cytotoxic brain swelling, and a marked increase in intracranial pressure up to fatal levels (Yang et al., 2008).

Astrocytes in culture retain the functional expression of AQP4, which even when loosing the polarization observed *in vivo*, redistributes throughout the astrocyte cell membrane, and preserves its physiological ability for water transport (Nicchia et al., 2000). AQP4-defective cultured astrocytes can be obtained either from the brain of AQP4-null mice or by AQP4 gene silencing via siRNA. Hyposmolarity-exposed cultured astrocytes from AQP4 $^{-/-}$ mice, show a dramatic reduction of over seven-fold in osmotic water permeability compared with astrocytes from the wild-type mice (Solenov et al., 2004). Also rat cultured astrocytes with AQP4 suppressed by siRNA show decreased water permeability (Nicchia et al., 2003). These cells show, in addition, marked changes in cell shape, not observed in AQP4-null mice astrocytes. Reduced osmotic water permeability is also found in membrane vesicles and brain slices obtained from AQP4-defective mice (Verkman, 2006). There is notably lack of information in general and particularly on brain cells of how AQPs participate in volume regulation after hyposmotic swelling. Studies in acinar cells reported the concerted action of TRPV4 and AQP5 on volume regulation (Liu et al., 2006) and in cortical collecting duct cell lines, AQP2 increases volume regulation (Ford et al., 2005), but to our knowledge, this has not been yet examined in astrocytes, where a role for AQP4 in the regulatory volume decrease would be anticipated. A recent report shows no differences between AQP4-defective and the wild-type mice, regarding brain and ventricle sizes, cerebral cortical density of neurons, astrocytes or oligodendrocytes. The microvasculature around astrocyte foot processes showed no sign of edema in the AQP4-defective brain (Saadoun et al., 2009) Also, similar morphology is found in astrocytes obtained from AQP4-defective and wild-type mice (Manley et al., 2004). This may suggest that AQPs are defense mechanisms facing large volume changes as occurring in pathological conditions. Cultured astrocytes and neurons have a volume regulatory mechanism called isovolumetric regulation (Tuz et al., 2001; Ordaz et al., 2004). In most studies on volume regulation, cells are exposed to abrupt and large decreases in external osmolarity that, although useful for understanding some basic features of volume regulation, only rarely occur, even in pathological situations. When changes in osmolarity are small and gradual (less than 2

mOsm/ml), cells do not show volume changes. This is not equivalent to absence of swelling, but represent an active mechanism of volume adjustment accomplished by osmolytes and pathways similar to those of the typical volume regulatory decrease. It would be interesting to explore the role of AQPs in this more physiological approach of volume regulation.

Increased water permeability and cell water content induce activation of osmolyte fluxes as an adaptive mechanism to swelling. This anticipates a reciprocal influence between AQPs and the channels or transporters in charge of osmolyte translocation since water fluxes follow water potential, which in turn depends on osmotic gradients. The link between AQP and osmolyte efflux pathway could be established by the cell volume sensors and the osmotransduction signaling chains, or directly by a functional coupling of AQPs and channels/transporters. There are some examples of this functional coupling. (1) In rat cortical astrocytes, downregulation of AQP4 by siRNA decreases the volume-sensitive Cl^- current elicited by hyposmolarity. This effect, interestingly, is restored by increasing cytosolic ATP (Benfenati et al., 2007). These AQP-defective astrocytes showed downregulation of CIC-2, but this is not involved in the volume-sensitive Cl^- current (Benfenati et al., 2007). Whether these coincident findings are relevant to volume regulation remains to be established. (2) Colocalization of AQP4, CIC-2 and the electroneutral cotransporter KCC1 is found in a glioma cell line (D54-MG cell line) stably transfected with AQP4 (McCoy et al., 2009). (3) A rat glioma cell line expressing AQP1 showed water influx restriction regulated by the external Cl^- concentration and influenced by AQP1. Treatment with HgCl_2 , which blocks AQP1, markedly increases cell volume in isosmotic conditions, and prevents the hyposmotic swelling (Rouzaire-Dubois et al., 2009). How general is this functional link between Cl^- and AQPs and whether it is expressed *in vivo* is still unexplored. A study on taurine distribution in different sections of the renal tubule showed a high correspondence between taurine presence and the water fluxing capacity of cells. Moreover, immunoreactive studies using double-labeling with antisera for taurine and AQP1, showed a correspondence between AQP1 expression and high taurine levels (Amiry-Moghaddam et al., 1996). A similar study in brain regions searching for taurine/glutamate and AQP4 colocalization would be of interest.

Swelling, AQPs and brain excitability

The influence of swelling on brain excitability has been known since the early observations about seizure occurrence in acute hyponatremia, and increased susceptibility to seizures in chronic hyponatremia or psychotic polydipsia (Andrew, 1991). At cellular level, hyposmotic swelling evokes epileptiform activity in hippocampal CA3 and in neocortical pyramidal neurons (Saly and Andrew, 1993). Hyposmotic swelling also affects synaptic transmission, increasing the amplitude of excitatory postsynaptic potentials (Chebabo et al., 1995) either by rising synaptic glutamate efflux (Tuz et al., 2004) or/and by restricting neurotransmitter diffusion. Alternatively or in addition, swelling

may affect neuronal excitability via non-synaptic mechanisms enhancing ephaptic interactions when swelling reduces the extracellular space size (Schwartzkroin et al., 1998). This interpretation is in line with the effect dissociating synchronization of epileptiform activity by reducing Cl^- influx and astrocyte swelling (Hochman et al., 1995). There is a controversy on whether swelling or hyposmolarity is the causal factor of hyperexcitability. Likely, both factors contribute by different mechanisms to the generation of the hyperexcitable condition (Caspi et al., 2009; Broberg et al., 2008).

Swelling and brain excitability is modulated by AQP4 *in vivo*. AQP4 $-/-$ mice treated with convulsant agents shows reduced seizure susceptibility but prolonged seizure duration, in comparison to the wild-type mice (Binder et al., 2006; Hsu et al., 2007). Similarly, α -synthrophin-deficient mice show more severe seizures than wild type animals (Amiry-Moghaddam et al., 2003). This difference has been linked to a deficit in K^+ homeostasis, particularly to K^+ clearance in animals with mislocalized or null AQP4 activity. The increased neuronal firing during seizures increases markedly the extracellular K^+ levels, which are then regulated by clearance and spatial buffering in astrocytes. If this process is impaired or exceeded, recovery of normal brain excitability is disturbed. The possibility of defective K^+ clearance in the AQP4-null animals is based on the delay observed in both rise and decay of extracellular K^+ in electrically-stimulated brain cortex of AQP4 $-/-$ compared to the AQP $+/+$ mice (Binder et al., 2006; Hsu et al., 2007). K^+ buffering deficit is also found in hippocampal slices from α -synthrophin-deficient mice (Amiry-Moghaddam et al., 2003). The mechanisms for this deficit in K^+ clearance are still unclear but may involve the glial inwardly-rectifying K^+ channels or/and an altered extracellular space size. The inwardly-rectifying Kir4.1 K^+ channel is considered a main pathway for K^+ uptake by astrocytes (Kofuji and Newman, 2004) and there is evidence suggesting its association with AQP4 in glial cells. However, a recent study showed that neither the expression nor the physiological properties of the channel are altered in brain glial cells from AQP $-/-$ mice (Zhang and Verkman, 2008). The electroneutral cotransporter NKCC is also prominently involved in K^+ clearance. AQP4 may be colocalized and possibly functionally coupled to this transporter as it is to KCC1 (McCoy et al., 2009). The expanded extracellular space in the brain of AQP-defective mice (Binder et al., 2004b) may also account for these changes in K^+ dynamics affecting excitability. An expanded extracellular space dilutes K^+ in a larger aqueous volume, slowing changes in K^+ concentration and delaying uptake and clearance. These effects may provide an explanation to the higher threshold and prolonged duration of seizures observed in the AQP4-defective animals (Binder et al., 2004a; 2006; Hsu et al., 2007).

High extracellular K^+ consistently elicits the efflux of amino acids and other osmolytes *in vivo* and *in vitro* (Pasantes-Morales and Schousboe, 1989; Rutledge and Kimelberg, 1996; Saransaari and Oja, 1999). Aspartate, glutamate, GABA, and taurine are those showing the largest

increases, ranging 4–12-fold over the basal efflux (Molchanova et al., 2004). In line with the role of AQPs on brain water homeostasis, modulation by AQPs of the swelling-dependent fraction of K^+ -elicited amino acid efflux is anticipated. Information on this subject is so far incipient. A recent report *in vivo* confirms the K^+ -induced efflux of glutamate, aspartate, GABA and taurine from mice striatum, and describes a marked increase in K^+ -stimulated release of all amino acids in the AQP $-/-$ mice (Ding et al., 2007). This increased efflux is consistent with the AQP4-related deficit in K^+ clearance, above discussed, which by maintaining high K^+ concentration at the extracellular space sustains the increase in amino acid efflux observed in the AQP-defective mice. Glutamate efflux in turn, contributes to further depolarization and high external K^+ levels, thus triggering an autopropropagated cascade of depolarization and swelling.

AQPs, osmolytes and ischemia

Brain ischemic stroke is a condition consistently leading to cytotoxic swelling of astrocytes. Interruption of glucose and oxygen supply by vascular occlusion and the resulting energy failure dissipate the ionic transmembrane gradients and modifies their distribution at the intracellular/extracellular compartments. The net intracellular Na^+ accumulation followed by Cl^- and osmotically driven water influx are the first elements of ischemic cytotoxic swelling. The high Na^+ cell content in turn, depolarizes neurons and glia, increasing glutamate efflux and extracellular K^+ , to levels often up to 80 mM. At this point, K^+ clearance and glutamate-driven water influx become additional causal factors of astrocyte swelling (Walz, 2000; Leis et al., 2005; Kimelberg, 2005). This ionic imbalance creates new osmotic gradients between the extracellular space and blood vessels, generating a transcapillary flux of Na^+ , Cl^- , water and other molecules. Then, brain edema becomes evident (Simard et al., 2007). As consequence of all these events, extracellular osmolyte levels increase manifold over basal, in all models of experimental ischemia, *in vivo* and *in vitro*, in brain slices and in cultured astrocytes. Aspartate, glutamate, GABA, taurine, myo-inositol and phosphoethanolamine are those preferentially released, as documented in a multitude of reports (rev. in Phillis and O'Regan, 2003). A corresponding decrease in osmolyte brain levels reflects the magnitude of the efflux (Nonaka et al., 1998). Efflux of taurine, phosphoethanolamine and myo-inositol is predominantly caused by swelling (Phillis and O'Regan, 2003), whereas swelling is not the only stimulus for osmolytes such as GABA and glutamate which also serve as neurotransmitters. Depolarization and the transmembrane ion gradient dissipation elicit GABA and glutamate efflux, mediated by the carrier reverse operation or/and by synaptic vesicular release. Glutamate efflux has been examined in more detail since brain damage in ischemia is strongly linked to neuronal death by excitotoxicity (Hazell, 2007; Mongin, 2007) and cell survival around the ischemic area, also depends on the control of extracellular glutamate levels and excitotoxicity prevention (Feustel et al., 2004; Kimelberg, 2005; Kucheryavykh et al., 2007;

Mongin, 2007; Malarkey and Parpura, 2008). While the swelling-induced release of glutamate may be detrimental for brain cells, the efflux of other organic osmolytes, particularly taurine, myo-inositol and creatine contribute to restrict the magnitude of swelling. Taurine in addition, may have protective effects on cell membranes reducing Ca^{2+} influx and preventing ionic overload through deteriorated membranes (Pasantes-Morales et al., 1985).

AQPs, particularly AQP4, is a main pathway for water accumulation in the ischemic brain. This was first presumed by the increased expression of AQP4 in astrocytes endfeet, coincident in time with early brain swelling in ischemia models in mice and rats (Taniguchi et al., 2000; Meng et al., 2004). Increased AQP4 expression was also found in ischemic human brain (Aoki et al., 2003). The conclusive evidence about the importance of AQP4 in ischemic edema came from studies in the AQP4-null mice. The early report by Manley et al. (2000) in a model of focal ischemia, showed significantly lower brain hemisphere swelling, infarct size and lesion volume in AQP4-defective mice as compared to the wild-type mice. AQP4-null animals also exhibited increased survival and better neurological performance than the AQP4 $+/+$ mice (Manley et al., 2000). Attenuated and delayed development of ischemia-induced brain edema, were also found in α -syntrophin-null or dystrophin-null mice with mislocalized AQP4. It is of interest to examine the ischemic-induced osmolyte efflux in these models of AQP4-defective animals but to our knowledge, such type of studies have not yet been performed. Expression of AQP-3 -5 and -8 is found in rat brain during permanent focal ischemia, with a time course suggesting their involvement in edema generation (Yang et al., 2009).

As above mentioned, AQP4 is expressed in cultured astrocytes and AQP4-defective cells show a reduction in water permeability under hypotonicity, but the consequences of AQP deletion on water fluxes in models of chemical ischemia have not been so far examined. AQP4 expression in cultured astrocytes is enhanced in lactacidosis, a condition present in ischemia when, facing impaired oxidative phosphorylation, astrocytes activate the anaerobic glycolytic pathway to synthesize ATP while still some glucose is available. Lactic acid is formed during this process, resulting in astrocyte swelling by Na^+ , Cl^- and water accumulation via the coupled operation of Na^+/H^+ and Cl^-/HCO_3^- antiporters, and the H^+ -monocarboxylate symporter. The increased AQP4 expression in lactacidosis is observed at the membrane surface, without changes in mRNA, suggesting redistribution or translational modifications as mechanisms of AQP overexpression (Morishima et al., 2008). Reduced lactacidosis-evoked swelling in AQP-defective animals is anticipated but remains to be demonstrated.

Osmolytes in brain and spinal cord trauma

Traumatic brain injury is a most frequent situation resulting in cytotoxic brain edema, which is of decisive importance in the evolution of the pathology. Swelling occurs as consequence of interconnected mechanical and biochemical re-

actions. Directly related to swelling is the post-traumatic widespread depolarization, which increases intracellular Na^+ and Cl^- levels, elevates extracellular K^+ and drives cell water influx. Transient sheer forces derived from trauma mechanically deform membranes and alters ion permeability also leading to intracellular water increase. If hemorrhagic episodes concur with trauma, as is often the case, the cascade of reactions characteristic of stroke is then triggered. An additional indirect mechanism of swelling after brain trauma is the hyponatremia evolving as consequence of a disturbed secretion of the antidiuretic hormone. All these conditions are eventually increasing osmolyte fluxes, mainly from astrocytes as discussed before. Large increases in glutamate and taurine levels are found in the cerebrospinal fluid of rats and patients with traumatic brain edema, reflecting an enhanced efflux from the brain cells (Stover et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Stover and Unterberg, 2000; Qureshi et al., 2003). Extracellular glutamate increases immediately after head trauma (Matsushita et al., 2000). When this occurs, excitotoxicity adds to other injuring factors related to the physical trauma, particularly since immediately after the lesion, there is a hyperactivation of *N*-methyl *D*-aspartate (NMDA) receptors. Although this is followed by receptor downregulation (Biegon et al., 2004; Yaka et al., 2007), the chain of adverse effects, including swelling, has been set in motion.

Traumatic injury has been extensively investigated in the spinal cord. As for head trauma, spinal cord traumatic injury triggers a plethora of interrelated phenomena, including prominently edema. Occurrence of edema may aggravate the primary injury by increasing the extracellular levels of excitotoxic molecules such as glutamate. Traumatic spinal cord injury elicits a marked increase in osmolyte amino acid release. Glutamate, GABA, glycine and taurine are those showing the most conspicuous increase in the extracellular space (Farooque et al., 1996; McAdoo et al., 1999), and correspondingly, amino acid tissue content decreases (Demediuk et al., 1989; Diaz-Ruiz et al., 2007). Interestingly, GABA, glycine and taurine tissue content decrease is transient, but glutamate low levels persist during long time (Demediuk et al., 1989). Thus, glutamate may contribute to aggravate the impact injury in spinal cord generating cytotoxic swelling and cell death by excitotoxicity (Liu et al., 1999). Taurine, in contrast, may have some protective actions of the injured tissue (Gupta et al., 2006). An effect of taurine reducing inflammatory responses has been recently reported (Nakajima et al., 2009). Recent studies in spinal cord astrocytes document a mechanism for glutamate release by activation of the purinergic metabotropic receptor P2Y₁, via IP₃-dependent Ca^{2+}_i rise and PKC. Glutamate release occurs through the volume-sensitive anion channel and is reduced by furosemide, a blocker of the electroneutral cotransporter NKCC (Zeng et al., 2008). This mechanism for glutamate release is likely not operating in spinal cord trauma if ischemia concurs to the traumatic episode, due to the ATP restriction characteristic of the ischemic condition. As discussed in the next section, glutamate efflux is potentiated by ATP from swollen cells in cortical astrocytes, via the P2Y₂ receptor, but

the mechanism is not active in isosmotic conditions (Mongin and Kimelberg, 2005).

The AQPs subject around brain trauma and spinal cord injury is addressed in detail in other contributions of this issue.

G protein coupled receptors, osmolyte fluxes and AQPs

The sequence analysis of the AQP4 molecule revealed potential phosphorylation sites for PKA (Ser 111), PKC (Ser 180), CaMKII (Ser 111) and CKII (Ser 276, Ser 285) (Gunnarson et al., 2004). Phosphorylation at Ser 180 and Ser 111 has opposite effects on water permeability through AQP4, as phosphorylation of Ser 180 decreases and Ser 111 increases water permeability (Yukutake and Yasui, 2010). There is evidence of an influence of PKC on AQP4 in glial cells. In glioma cells from the D54-MG line stably transfected with AQP4, increasing PKC phosphorylates AQP4, reducing water permeability and cell migration, while the opposite occurs upon PKC inhibition by chelerythrine. These effects are mediated by phosphorylation of the AQP4 Ser180 and are abolished by point mutation of this residue (McCoy et al., 2009). A study *in vivo* of focal ischemia in rats also showed a decrease of AQP4 water permeability upon PKC activation by phorbol esters (Fazzina et al., 2009). Phosphorylation can also mediate long term AQP4 regulation by PKC. In rat cultured astrocytes, phorbol esters activation of PKC causes time and dose-dependent decreases in AQP4 mRNA (Nakahama et al., 1999; Yamamoto et al., 2001). In the same cells, thrombin inhibits AQP4 expression, an effect mediated by PKC (Tang et al., 2007). The influence of CaMKII in water permeability in cultured astrocytes is also documented in a model of lead-induced swelling which occurs by increased water permeability through AQP4, activated by CaMKII phosphorylation of Ser 111 (Gunnarson et al., 2005).

The short-term control of water permeability via AQP4 phosphorylation, points to a finely tuned adjustment of water fluxes during swelling and volume regulation. It may also become a playing element in the well documented cross-talk between G-protein coupled receptors (GPCR), osmolyte fluxes and volume regulation found in brain cells. Volume regulation in astrocytes and neurons elicited by hyposmotic swelling is essentially Ca^{2+} -independent (Pasantes-Morales and Morales Mulia, 2000), but it can be strongly influenced by activation of GPCR, which trigger most of the Ca^{2+} -related kinases having AQP4 as target. Large increases in the volume-sensitive fluxes of organic osmolytes from brain cells are elicited by agonists of a variety of GPCR. Metabotropic purinergic, muscarinic, and protease receptors, all have this effect enhancing osmo-sensitive osmolyte fluxes (rev. in Vázquez-Juárez et al., 2008; Fisher et al., 2008). Then, the set of kinases activated by GPCR agonists may also contribute via AQP4, to modulate water fluxes in the direction required to restrict swelling and accomplish volume regulation. In hyposmotic conditions, water permeability could be regulated by the metabotropic purinergic receptors P2Y, via an autocrine ATP effect. ATP is released from astrocytes during hypos-

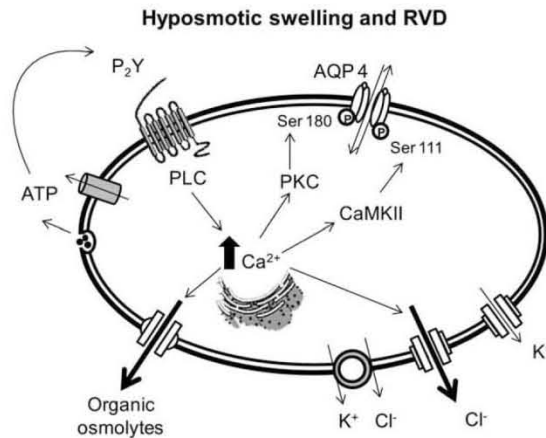


Fig. 2. Suggested reactions connecting AQP4, osmolytes and GPCR in astrocytes during hyposmotic swelling. Cell volume increase induce the autocrine efflux of ATP which interacts with P2Y metabotropic purinergic receptors, and activates the set of signals leading to Ca^{2+} release from internal stores. The activated Ca^{2+} -dependent kinases PKC or CaMKII in turn, interact with AQP4 via serine residue phosphorylation, decreasing water permeability if the PKC phosphorylates Ser180 or increasing water permeability when CaMKII phosphorylates Ser111. According to the predominance of these pathways, and presumably at different temporal patterns, AQP4 will provide a channel either to sustain swelling or to permit water efflux and cell volume recovery. The two signaling pathways involving PKC and CaMKII also potentiate organic osmolyte efflux and Cl^- exit via $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ (see text).

otic swelling and interacts with the purinergic metabotropic receptors, activating several Ca^{2+} -dependent protein kinase cascades including PKC and CaMKII (Mongin and Kimelberg, 2005). By these two signaling routes, ATP might modulate water permeability in astrocytes through AQP4 and act as a regulator of swelling and/or cell volume decrease (Fig. 2). Purinergic metabotropic receptors have an influence on osmolyte efflux pathways activated by hyposmotic swelling in astrocytes. The volume-activated Cl^- current is reduced by P2Y1 blockers (Darby et al., 2003) and the volume-sensitive glutamate and taurine efflux is reduced by P2Y blockers (Mongin and Kimelberg, 2005). Noteworthy, the purinergic receptor influence on $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ and glutamate and taurine efflux pathway is observed only when these pathways have already been activated by swelling. A more complex interplay between AQP-mediated water permeability and GPCR may occur in pathologies such as ischemia or trauma, when glutamate levels rise at the extracellular space. A recent study shows how glutamate or the 1mGluR agonist DHPG increase water permeability in hippocampal slices and in astrocytes from neuron/astrocyte co-cultures in glial cells expressing AQP4 but not in AQP4-defective cells (Gunnarson et al., 2008). The 1mGluR-activated signaling chain includes Ca^{2+} release from intracellular stores, activation of Ca^{2+} -calmodulin kinase II, nitric oxide synthase, and protein kinase G. AQP4 is considered the molecular target of this signaling cascade, via a PKG-mediated phosphorylation at AQP4 serine 111. The effect of 1mGluR on AQP4 seems to occur by increasing the channel permeability through a

short term regulation via phosphorylation, without modifying the expression or trafficking of the AQP (Gunnarson et al., 2008). This and other interactions of AQPs with GPCRs involve a potential harm. The effect of 1mGluR increasing AQP4 permeability contributes to the deleterious effects of glutamate, as in ischemia or trauma, in this case exacerbating the edematous condition (Fig. 3). The situation may be further complicated when other GPCR agonists such as thrombin, increase markedly in brain during hemorrhagic episodes resulting from head trauma

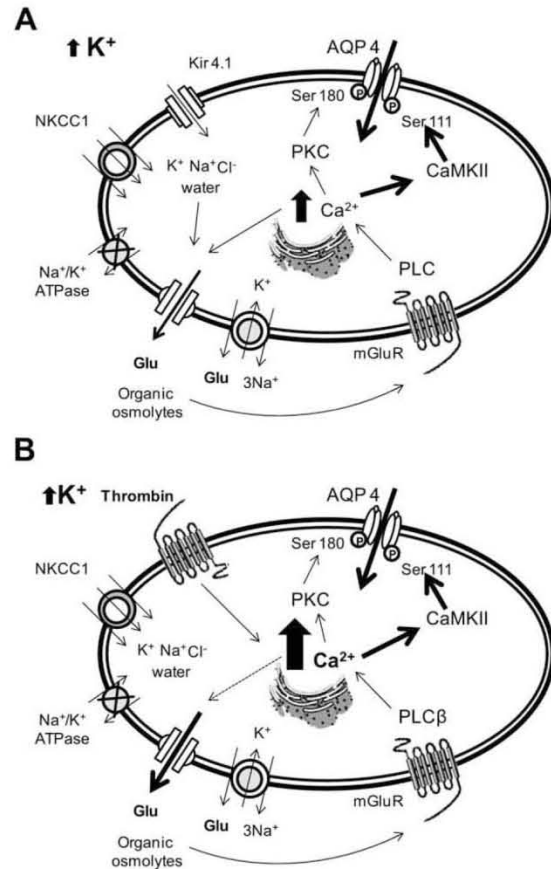


Fig. 3. Suggested interplay between osmolytes, AQP4 and GPCR in ischemic swelling in astrocytes. (A) The high extracellular K^+ levels characteristic of ischemia activate the astrocytic K^+ clearance mechanisms involving inwardly rectifying Kir channels (Kir4.1) and the electroneutral cotransporter NKCC. As consequence of this process, astrocytes accumulate water, presumably via AQP4. Cell swelling as well as the ion transmembrane gradient dissipation enhance extracellular glutamate which may then interact with the metabotropic glutamate receptor 1mGluR and activate a chain of events having intracellular Ca^{2+} rise as a key element in the activation of Ca^{2+} -dependent kinases PKC and CaMKII, which in turn, influence AQP4, with an apparent predominance of CaMKII. AQP4 Ser111 phosphorylation, and increased water permeability, contribute to ischemic edema. (B) The situation is aggravated when hemorrhagic episodes concur with ischemia, increasing markedly brain thrombin levels. By the mechanism of intracellular Ca^{2+} increase, thrombin potentiates glutamate efflux, thus providing further activation to 1mGluR, AQP4-mediated water influx and further swelling. An autopropagated chain of edema effectors is then set in motion.

or during ischemia-induced vessel rupture. At short term, thrombin potentiates glutamate efflux from astrocytes in ischemic-like conditions (Vázquez-Juárez et al., 2009). This increased glutamate efflux might then activate the 1mGluR-AQP4 and aggravate brain edema (Fig. 3). Interestingly, activation of the ionotropic purinergic receptor P2X7 decreases AQP4 expression in cultured astrocytes, and in the whole brain *in vivo* in anoxic conditions (Lee et al., 2008). This downregulation is presumably occurring in ischemia and trauma, when ATP leaks from damaged cells, and may contribute to attenuate the cytotoxic swelling associated with these pathologies. The mechanism of this interplay is as yet unclarified. All these results showing AQP modulation by metabotropic receptors or other stimuli of intracellular signaling chains, extends the number of possible targets for therapeutic strategies devised to attenuate ischemic and traumatic damage to neurons and astrocytes derived from uncontrolled edema.

Osmolytes, volume changes and AQPs in apoptosis and necrosis

Changes in cell volume are key morphological traits to distinguish between necrotic and apoptotic death. Swelling is characteristic of necrotic death and contributes directly to propagate the chain of deleterious events ultimately leading to cell death. Neuronal apoptotic death is part of the physiological process to configure the successful routes and connections during brain development. In the mature brain, apoptotic death is related to the course of chronic and acute neuropathologies, including notably brain and spinal cord trauma. Cell shrinkage is a hallmark of apoptotic death, and is considered as part of the apoptotic signaling chain. Therefore, apoptosis and necrosis are cell events in which AQP are playing a critical role.

Necrotic death in brain cells occurs as consequence of accidental situations, associated with pathologies. Head trauma and spinal cord injury are among the most common situations leading to necrotic cell death, together with ischemic episodes derived from various pathologies. The chain of deleterious events leading to cell swelling in necrosis has been above described in the cytotoxic swelling section. Summarized, the compression, obstruction or rupture of blood vessels derives in insufficient glucose and oxygen supply leading to energy failure, reduction in ATP synthesis, impairment in Na^+/K^+ and Ca^{2+} ATPases, extracellular K^+ and glutamate elevation, intracellular Ca_i^{2+} rise by inefficient buffering, nitroxidative stress and membrane lipoperoxidation. Then, the uncontrolled Na^+ , K^+ and Cl^- accumulation is the final cause of necrotic cell swelling, while further Ca_i^{2+} accumulation aggravates this cascade of adverse events ultimately leading to cell death.

Apoptosis is not an accidental cell death but a highly regulated process of cell deletion, directed to eliminate a definite group of cells at a precise time, for preserving the optimal function of tissues and organs. However, an imbalance in apoptosis control contributes to the pathogenesis of a variety of acute or degenerative neuropathologies. Apoptotic cell death is critically involved in the delayed cell loss following brain and spinal cord injury depending

on the type of damage, the affected brain cells include neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia. Apoptosis occurs according to a strictly ordered set of biochemical events, one of which is a characteristic reduction in cell volume, termed apoptotic volume decrease (AVD). This is a very constant feature of the apoptotic process, found in essentially all cell types, and observed in apoptosis induced by different mechanisms. The sequence of main apoptotic cell events includes caspase-3 cleavage, cytochrome C release and translocation, endonuclease activation and DNA fragmentation. Noteworthy, AVD is an early event in the program, occurring before the surge of these typical apoptotic traits. It has even been considered as part of the causal signals and not only a consequence of apoptosis (Bortner and Cidlowski, 2002, 2004).

Cell volume reduction during apoptosis occurs by the active translocation of K^+ , Cl^- and osmotically driven water. The crucial role of K^+ efflux in AVD and apoptosis is now well established as well as the involvement of K^+ channels in this process (Yu, 2003; Bortner and Cidlowski, 2004; Ferraris and Burg, 2006). The molecular identity of the ADV-linked K^+ channels is now extensively investigated, but evidence about a K^+ channel specific for ADV has not yet been found. Rather, a diversity of K^+ channels present in the non apoptotic cell, performing a variety of tasks in the physiological condition, participates in ADV. The list of K^+ channels linked to AVD and apoptosis include: Kv channels (isoforms Kv 1.1, Kv 1.3, Kv 1.5, Kv 2.1), K2P channels (TASK-1 and TASK-3), HERG and BK Ca^{2+} channels (Burg et al., 2006). K^+ efflux during AVD is associated with Cl^- exit. Anion currents activate during apoptosis, with properties in all similar to those of $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$, but this activation has to respond to different signals since it occurs in isosmotic conditions (Okada et al., 2006). About a role for organic osmolytes in apoptosis or/and ADV, taurine has been implicated based on (i) the increased taurine efflux during apoptosis shown in some cell types, including cerebellar granule neurons (Lang et al., 2000; Morán et al., 2000), and (ii) the effect of high external taurine preventing the assembly of apoptosomes and further activation of caspase 9 (Takatani et al., 2004). It is unclear so far, how taurine efflux contributes to ADV, or participates in other apoptotic events, such as caspase regulation or mitochondrial dysfunction (Chen et al., 2009).

There is scarce information about the role of AQPs in AVD in brain cells. Cortical mouse neurons treated with lactacystin to induce apoptosis, show increased AQP1 expression at 6 h, which persists up to 12 h after, being later downregulated. Interestingly, the onset of apoptosis in lactacystin-treated neurons occurred at 15 h, thus stressing the early role of volume changes in apoptotic reactions. AQP4 expression and AQP4 gene are highly downregulated in this apoptotic model in neurons, suggesting either that loss of water during AVD occurs via another AQP, likely AQP1, or/and that AQP4 has a permissive role maintaining normal cell water levels, which is suppressed during apoptosis, thus contributing to AVD.

In other cell types the contribution of AQPs to AVD is supported by the following findings: (i) AVD and apoptosis

are reduced by the general AQP blocker HgCl₂ in granulosa ovarian, tymocytes and CHO cells. (ii) overexpression of AQP1 enhances AVD and apoptosis (Jablonski et al., 2004a). (iii) AQP2 expression in a renal cell line without native AQP, activate K⁺ and Cl⁻ channels leading to AVD and apoptosis (Flamenco et al., 2009), and (iv) hepatic tumor cells with native decreased expression of AQP8 and AQP9, show reduced water movement and intrinsic resistance to apoptosis (Jablonski et al., 2007).

AVD results primarily from K⁺ and Cl⁻ outflow and osmotically driven water, but there is evidence which point to the fall in K⁺ levels or/and in cell ionic strength, rather than AVD, as the primary condition influencing apoptotic signals. However, to obtain a net intracellular K⁺ decrease or ionic strength reduction, the adaptive volume regulatory response has to be blocked. It is proposed that AQPs initially activate and contribute to AVD, but subsequently inactivate, in order to sustain the low intracellular K⁺ and Cl⁻ levels (Jablonski et al., 2004a). Several mechanisms have been proposed for this inactivation including caveolin-1/AQP coupling and internalization in caveolae, or the formation of a fodrin/AQP complex, later dissociated by the apoptosis-induced cleavage of this cytoskeleton anchor protein (Jablonski and Hughes, 2006; Jablonski et al., 2004b, 2007; Jessica Chen et al., 2008). These possibilities have to be confirmed by further experimental evidence.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

AQP are recognized as main pathways for water fluxes in conditions leading to cell volume changes in brain cells, particularly in astrocytes. The role of AQP4 in vasogenic and cytotoxic edema is well supported by studies on AQP4-deficient mice. A similar influence in brain cells from other species, including human, remains to be established. Interest in this topic derives from the implications of cytotoxic swelling in neuronal excitability and swelling-related neuronal death by excitotoxicity in the pathogenesis of ischemia and trauma. Regarding cell volume regulation, AQPs could have a key role for sensing cell volume changes, by modifying the intracellular ionic strength or molecular crowding, or the cytosolic concentration of specific signaling molecules. Via an effect on volume sensing mechanisms, AQPs may influence signaling chains and ultimately, the activation of osmolyte efflux pathways, responsible for cell volume adjustment. Expression, activity and regulation of AQPs might then be critical for the generation and extent of cell swelling, as well as for the rate and efficiency of volume recovery. This is anticipated, but remains to be demonstrated. Marked differences have been consistently observed between different sets of neurons or between neurons and astrocytes in the magnitude of cell swelling or shrinkage, and in the time course and efficiency of volume regulation. Whether these differences are attributable to different expression or activity of AQPs is a most important topic to be clarified. The interplay between GPCR agonists and AQPs via phosphorylation is one of the major avenues to be explored in the future.

Acknowledgments—We thank CONACYT (grant no. 98952) and DGAPA, UNAM (grant no. IN209507) for supporting our research.

REFERENCES

- Albrecht J, Schousboe A (2005) Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res* 30: 1615–1621.
- Amiry-Moghaddam M, Nagelhus EA, Agre P, Nielsen S, Ottersen OP (1996) Taurine and water channels are co-localized in renal tubule cells and other tissues: immunocytochemical studies in rats. *Adv Exp Med Biol* 403:165–171.
- Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4:991–1001.
- Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP (2003) Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13615–13620.
- Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, Adams ME, Froehner SC, Mori S, Ottersen OP (2004) Alpha-syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J* 18:542–544.
- Andrew RD, Fagan M, Ballyk BA, Rosen AS (1989) Seizure susceptibility and the osmotic state. *Brain Res* 498:175–180.
- Andrew RD (1991) Seizure and acute osmotic change: clinical and neurophysiological aspects. *J Neurol Sci* 101:7–18.
- Aoki K, Uchiyama T, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Wakayama Y (2003) Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction. *Acta Neuropathol* 106:121–124.
- Badault J, Lasbennes F, Magistretti P, Regli L (2002) Aquaporins in brain: distribution, physiology and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:367–378.
- Benfenati V, Nicchia GP, Svelto M, Rapisarda C, Frigeri A, Ferroni S (2007) Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 100:87–104.
- Biegona A, Fry PA, Paden CM, Alexandrovich A, Tsenter J, Shohami E (2004) Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5117–5122.
- Binder DK, Oshio K, Ma T, Verkman AS, Manley GT (2004a) Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Neuroreport* 15:259–262.
- Binder DK, Papadopoulos MC, Haggie PM, Verkman AS (2004b) In vivo measurement of brain extracellular space diffusion by cortical surface photobleaching. *J Neurosci* 24:8049–8056.
- Binder DK, Yao X, Zador Z, Sick TJ, Verkman AS, Manley GT (2006) Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Glia* 53:631–636.
- Bortner CD, Cidlowski JA (2002) Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Differ* 9:1307–1310.
- Bortner CD, Cidlowski JA (2004) The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. *Pflügers Arch* 448:313–318.
- Broberg M, Pope KJ, Lewis T, Olsson T, Nilsson M, Willoughby JO (2008) Cell swelling precedes seizures induced by inhibition of astrocytic metabolism. *Epilepsy Res* 80:132–141.
- Burg ED, Remillard CV, Yuan JX (2006) K⁺ channels in apoptosis. *J Membr Biol* 209:3–20.
- Caspi A, Benninger F, Yaari Y (2009) KV7/M channels mediate osmotic modulation of intrinsic neuronal excitability. *J Neurosci* 29: 11098–11111.
- Chebabo SR, Hester MA, Aitken PG, Somjen GG (1995) Hypotonic exposure enhances synaptic transmission and triggers spreading

- depression in rat hippocampal tissue slices. *Brain Res* 695:203–216.
- Chen K, Zhang Q, Wang J, Liu F, Mi M, Xu H, Chen F, Zeng K (2009) Taurine protects transformed rat retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction. *Brain Res* 1279:131–138.
- Crépel V, Panenka W, Kelly ME, MacVicar BA (1998) Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci* 18:1196–1206.
- Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA (2003) ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol* 89:1870–1877.
- Díaz-Ruiz A, Salgado-Ceballos H, Montes S, Maldonado V, Tristán L, Alcaraz-Zubeldía M, Ríos C (2007) Acute alterations of glutamate, glutamine, GABA, and other amino acids after spinal cord contusion in rats. *Neurochem Res* 32:57–63.
- Ding JH, Sha LL, Chang J, Zhou XQ, Fan Y, Hu G (2007) Alterations of striatal neurotransmitter release in aquaporin-4 deficient mice: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 422:175–180.
- Demediuk P, Daly MP, Faden AI (1989) Effect of impact trauma on neurotransmitter and nonneurotransmitter amino acids in rat spinal cord. *J Neurochem* 52:1529–1536.
- Ernest NJ, Weaver AK, Van Duyn LB, Sontheimer HW (2005) Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C145–C160.
- Estevez AY, O'Regan MH, Song D, Phillis JW (1999) Effects of anion channel blockers on hyposmotically induced amino acid release from the in vivo rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 24:447–452.
- Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y (1996) Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis. *J Neurotrauma* 13:537–548.
- Fazzina G, Amorini AM, Marmarou C, Fukui S, Okuno K, Glisson R, Marmarou A, Kleindienst A (2009) The PKC activator phorbol myristate acetate decreases brain edema by AQP4 down-regulation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurotrauma*, in press.
- Ferraris JD, Burg MB (2006) Tonicity-dependent regulation of osmoprotective genes in mammalian cells. *Contrib Nephrol* 152:125–141.
- Feustel PJ, Jin Y, Kimelberg HK (2004) Volume-regulated anion channels are the predominant contributors to release of excitatory amino acids in the ischemic cortical penumbra. *Stroke* 35:1164–1168.
- Fisher SK, Cheema TA, Foster DJ, Heacock AM (2008) Volume-dependent osmolyte efflux from neural tissues: regulation by G-protein-coupled receptors. *J Neurochem* 106:1998–2014.
- Flamenco P, Galizia L, Rivarola V, Fernandez J, Ford P, Capurro C (2009) Role of AQP2 during apoptosis in cortical collecting duct cells. *Biol Cell* 101:237–250.
- Ford P, Rivarola V, Chara O, Blot-Chabaud M, Cluzeaud F, Farman N, Parisi M, Capurro C (2005) Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2. *Biol Cell* 97:687–697.
- Gagnon KB, Adragna NC, Fyffe RE, Lauf PK (2007) Characterization of glial cell K-Cl cotransport. *Cell Physiol Biochem* 20:121–130.
- Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A (2004) Regulation of brain aquaporins. *Neuroscience* 129:947–955.
- Gunnarson E, Zelenina M, Axehult G, Song Y, Bondar A, Krieger P, Brismar H, Zelenin S, Aperia A (2008) Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia* 56:587–596.
- Gunnarson E, Axehult G, Baturina G, Zelenin S, Zelenina M, Aperia A (2005) Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4. *Neuroscience* 136:105–114.
- Gupta RC, Seki Y, Yosida J (2006) Role of taurine in spinal cord injury. *Curr Neurovasc Res* 3:225–235.
- Haskew-Layton RE, Rudkouskaya A, Jin Y, Feustel PJ, Kimelberg HK, Mongin AA (2008) Two distinct modes of hyposmotic medium-induced release of excitatory amino acids and taurine in the rat brain in vivo. *PLoS ONE* 3:e3543.
- Hazell AS (2007) Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int* 50:941–953.
- Hochman DW, Baraban SC, Owens JW, Schwartzkroin PA (1995) Dissociation of synchronization and excitability in furosemide blockade of epileptiform activity. *Science* 270:99–102.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89:193–277.
- Hsu MS, Lee DJ, Binder DK (2007) Potential role of the glial water channel aquaporin-4 in epilepsy. *Neuron Glia Biol* 3:287–297.
- Inoue H, Mori S, Morishima S, Okada Y (2005) Volume-sensitive chloride channels in mouse cortical neurons: characterization and role in volume regulation. *Eur J Neurosci* 21:1648–1658.
- Jablonski E, Webb A, Hughes FM Jr (2004a) Water movement during apoptosis: a role for aquaporins in the apoptotic volume decrease (AVD). *Adv Exp Med Biol* 559:179–188.
- Jablonski EM, Webb AN, McConnell NA, Riley MC, Hughes FM Jr (2004b) Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(4):C975–C985.
- Jablonski EM, Hughes FM Jr (2006) The potential role of caveolin-1 in inhibition of aquaporins during the AVD. *Biol Cell* 98:33–42.
- Jablonski EM, Mattocks MA, Sokolov E, Koniaris LG, Hughes FM Jr, Fausto N, Pierce RH, McKillop IH (2007) Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 250:36–46.
- Jackson PS, Strange K (1995) Characterization of the voltage-dependent properties of a volume-sensitive anion conductance. *J Gen Physiol* 10:661–676.
- Jackson PS, Churchwell K, Ballatori N, Boyer JL, Strange K (1996) Swelling-activated anion conductance in skate hepatocytes: regulation by cell Cl⁻ and ATP. *Am J Physiol* 270:C57–C66.
- Jessica Chen M, Sepramaniam S, Armugam A, Shyan Choy M, Manikandan J, Melendez AJ, Jeyaseelan K, Sang Cheung N (2008) Water and ion channels: crucial in the initiation and progression of apoptosis in central nervous system? *Curr Neuropharmacol* 6:102–116.
- Junankar PR, Kirk K (2000) Organic osmolyte channels: a comparative view. *Cell Physiol Biochem* 10:355–360.
- Kimelberg HK (1995) Current concepts of brain edema: review of laboratory investigations. *J Neurosurg* 83:1051–1059.
- Kimelberg HK (2005) Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50:389–397.
- Klatzo I (1994) Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60:3–6.
- Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045–1056.
- Kucheryavykh YV, Kucheryavykh LY, Nichols CG, Maldonado HM, Baksi K, Reichenbach A, Skatchkov SN, Eaton MJ (2007) Down-regulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia* 55:274–281.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78:247–306.
- Lang F, Madlung J, Siemen D, Ellory C, Lepple-Wienhues A, Glubins E (2000) The involvement of caspases in the CD95(Fas/Apo-1)-but not swelling-induced cellular taurine release from Jurkat T-lymphocytes. *Pflügers Arch* 440:93–99.
- Lee M, Lee SJ, Choi HJ, Jung YW, Frøkiaer J, Nielsen S, Kwon TH (2008) Regulation of AQP4 protein expression in rat brain astrocytes: role of P2X7 receptor activation. *Brain Res* 1195:1–11.
- Leis JA, Bekar LK, Walz W (2005) Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 50:407–416.

- Lien YH, Shapiro JI, Chan L (1991) Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. Implications for the pathogenesis of central pontine myelinolysis. *J Clin Invest* 88:303–309.
- Lien YH (1995) Role of organic osmolytes in myelinolysis: a topographic study in rats after rapid correction of hyponatremia. *J Clin Invest* 95:1579–1586.
- Liu D, Xu GY, Pan E, McAdoo DJ (1999) Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience* 93:1383–1389.
- Liu X, Bandyopadhyay BC, Nakamoto T, Singh B, Liedtke W, Melvin JE, Ambudkar I (2006) A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery. *J Biol Chem* 281:15485–15495.
- Malarkey EB, Parpura V (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52:142–154.
- Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS (2004) New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 129:983–991.
- Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6:159–163.
- Matsushita Y, Shima K, Nawashiro H, Wada K (2000) Real-time monitoring of glutamate following fluid percussion brain injury with hypoxia in the rat. *J Neurotrauma* 17:143–153.
- McAdoo DJ, Xu GY, Robak G, Hughes MG (1999) Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol* 159:538–544.
- McCoy ES, Haas BR, Sontheimer H (2010) Water permeability through aquaporin-4 is regulated by protein kinase C and becomes rate-limiting for glioma invasion. *Neuroscience*, 168:971–981.
- Melton JE, Patlak CS, Pettigrew KD, Cserr HF (1987) Volume regulatory loss of Na, Cl, and K from rat brain during acute hyponatremia. *Am J Physiol* 252:F661–F669.
- Meng S, Qiao M, Lin L, Del Bigio MR, Tomanek B, Tuor UI (2004) Correspondence of AQP4 expression and hypoxic-ischaemic brain edema monitored by magnetic resonance imaging in the immature and juvenile rat. *Eur J Neurosci* 19:2261–2269.
- Molchanova S, Kööbi P, Oja SS, Saransaari P (2004) Interstitial concentrations of amino acids in the rat striatum during global fore-brain ischemia and potassium-evoked spreading depression. *Neurochem Res* 29:1519–1527.
- Mongin AA, Kimelberg HK (2005) ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca²⁺-sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C204–C213.
- Mongin AA (2007) Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: the perfect storm. *Pathophysiology* 14:183–193.
- Morán J, Hernández-Pech X, Merchant-Larios H, Pasantes-Morales H (2000) Release of taurine in apoptotic cerebellar granule neurons in culture. *Pflügers Arch* 439:271–277.
- Morishima T, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate H, Arima H, Fujita Y, Sasano H, Tsuda T, Katsuya H, Asai K, Sobue K (2008) Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 61:18–26.
- Nakahama K, Nagano M, Fujioka A, Shinoda K, Sasaki H (1999) Effect of TPA on aquaporin 4 mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Glia* 25:240–246.
- Nakajima Y, Osuka K, Seki Y, Gupta RC, Hara M, Takayasu M, Wakabayashi T (2009) Taurine reduces inflammatory responses after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, in press.
- Nase G, Helm PJ, Enger R, Ottersen OP (2008) Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia* 56:895–902.
- Nicchia GP, Frigeri A, Liuzzi GM, Santacrose MP, Nico B, Procino G, Quondamatto F, Herken R, Roncali L, Svelto M (2000) Aquaporin-4-containing astrocytes sustain a temperature- and mercury-insensitive swelling in vitro. *Glia* 31:29–38.
- Nicchia GP, Frigeri A, Liuzzi GM, Svelto M (2003) Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes. *FASEB J* 17:1508–1510.
- Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17:171–180.
- Niemeyer MI, Stutzin A, Sepúlveda FV (2002) A voltage-independent K⁺ conductance activated by cell swelling in Ehrlich cells is modulated by a G-protein-mediated process. *Biochim Biophys Acta* 1562:1–5.
- Nonaka M, Yoshimine T, Kohmura E, Wacayama A, Yamashita T, Hayakawa T (1998) Changes in brain organic osmolytes in experimental cerebral ischemia. *J Neurol Sci* 157:25–30.
- Okada Y (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* 273:C755–C789.
- Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, Takahashi N (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* 209:21–29.
- Olson JE, Li GZ, Wang L, Lu L (2004) Volume-regulated anion conductance in cultured rat cerebral astrocytes requires calmodulin activity. *Glia* 46:391–401.
- Ordaz B, Vaca L, Franco R, Pasantes-Morales H (2004) Volume changes and whole cell membrane currents activated during gradual osmolarity decrease in C6 glioma cells: contribution of two types of K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1399–C1409.
- Papadopoulos MC, Verkman AS (2007) Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 22:778–784.
- Pasantes-Morales H, Wright CE, Gaull GE (1985) Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem Pharmacol* 34:2205–2207.
- Pasantes-Morales H, Schousboe A (1989) Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *Glia* 2:45–50.
- Pasantes-Morales H (1996) Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis* 11:187–204.
- Pasantes-Morales H, Schousboe A (1997) Role of taurine in osmoregulation in brain cells: mechanisms and functional implications. *Amino Acids* 12:281–292.
- Pasantes-Morales H, Morales Mulia S (2000) Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86:414–427.
- Patel AJ, Lauritzen I, Lazdunski M, Honoré E (1998) Disruption of mitochondrial respiration inhibits volume-regulated anion channels and provokes neuronal cell swelling. *J Neurosci* 18:3117–3123.
- Perry TL, Hansen S, Berry K, Mok C, Lisk D (1971) Free amino acids and related compounds in biopsies of human brain. *J Neurochem* 18:521–528.
- Phillis JW, O'Regan MH (2003) Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 43:461–467.
- Qureshi AI, Ali Z, Suri MF, Shuaib A, Baker G, Todd K, Guterman LR, Hopkins LN (2003) Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Crit Care Med* 31:1482–1489.
- Restuccia T, Gómez-Ansón B, Guevara M, Alessandria C, Torre A, Alayrac ME, Terra C, Martín M, Castellví M, Rami L, Sainz A, Ginès P, Arroyo V (2004) Effects of dilutional hyponatremia on brain organic osmolytes and water content in patients with cirrhosis. *Hepatology* 39:1613–1622.

- Ringel F, Plesnila N (2008) Expression and functional role of potassium-chloride cotransporters (KCC) in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 442:219–223.
- Rouzaire-Dubois B, Ouanounou G, O'Regan S, Dubois JM (2009) Sodium-dependent activity of aquaporin-1 in rat glioma cells: a new mechanism of cell volume regulation. *Pflügers Arch* 457:1187–1198.
- Roy G (1994) Channels for amino acids and metabolites activated by cell volume regulation. *Jpn J Physiol* 44(Suppl 2):S37–S42.
- Rutledge EM, Kimelberg HK (1996) Release of [3H]-D-aspartate from primary astrocyte cultures in response to raised external potassium. *J Neurosci* 16:7803–7811.
- Saadoun S, Tait MJ, Reza A, Davies DC, Bell BA, Verkman AS, Papadopoulos MC (2009) AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience* 161:764–772.
- Saly V, Andrew RD (1993) CA3 neuron excitation and epileptiform discharge are sensitive to osmolality. *J Neurophysiol* 69:2200–2208.
- Saransaari P, Oja SS (1999) Taurine release is enhanced in cell-damaging conditions in cultured cerebral cortical astrocytes. *Neurochem Res* 24:1523–1529.
- Schwartzkroin PA, Baraban SC, Hochman DW (1998) Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res* 32:275–285.
- Seidl R, Cairns N, Singewald N, Kaehler ST, Lubec G (2001) Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down syndrome with Alzheimer-like neuropathology. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 363:139–145.
- Shennan DB (2008) Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion-exchangers and other swelling-activated transport pathways. *Cell Physiol Biochem* 21:15–28.
- Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V (2007) Brain edema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 6:258–268.
- Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS (2004) Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C426–C432.
- Solis JM, Herranz AS, Herrerias O, Lerma J, Martin del Rio R (1998) Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain? *Neurosci Lett* 91:53–58.
- Soupart A, Silver S, Schroöder B, Sterns R, Decaux G (2002) Rapid (24-hour) reaccumulation of brain organic osmolytes (particularly myo-inositol) in azotemic rats after correction of chronic hyponatremia. *J Am Soc Nephrol* 13:1433–1441.
- Sterns RH, Baer J, Ebersol S, Thomas D, Lohr JW, Kamm DE (1993) Organic osmolytes in acute hyponatremia. *Am J Physiol* 264:F833–F836.
- Sterns RH, Silver SM (2006) Brain volume regulation in response to hypo-osmolality and its correction. *Am J Med* 119:S12–S16.
- Stover JF, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Stocker R, Kempfski OS, Kossmann TJ (1999) Glutamate and taurine are increased in ventricular cerebrospinal fluid of severely brain-injured patients. *Neurotrauma* 16:135–142.
- Stover JF, Unterberg AW (2000) Increased cerebrospinal fluid glutamate and taurine concentrations are associated with traumatic brain edema formation in rats. *Brain Res* 875:51–55.
- Stutzin A, Torres R, Oporto M, Pacheco P, Eguiguren AL, Cid LP, Sepulveda FV (1999) Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am J Physiol Cell Physiol* 277:C392–C402.
- Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC (2008) Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 31(1):37–43.
- Takatani T, Takahashi K, Ouzumi Y, Shikata E, Yamamoto Y, Ito T, Matsuda T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J (2004) Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C949–C953.
- Tang Y, Cai D, Chen Y (2007) Thrombin inhibits aquaporin 4 expression through protein kinase C-dependent pathway in cultured astrocytes. *J Mol Neurosci* 31:83–93.
- Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T (2000) Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res* 78:131–137.
- Taouil K, Hannaert P (1999) Evidence for the involvement of K⁺ channels and K⁽⁺⁾-Cl⁻ cotransport in the regulatory volume decrease of newborn rat cardiomyocytes. *Pflügers Arch* 439:56–66.
- Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O, Pasantes-Morales H (2001) Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 79:143–151.
- Tuz K, Peña-Segura C, Franco R, Pasantes-Morales H (2004) Depolarization, exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes. *Eur J Neurosci* 19:916–924.
- Vajda Z, Promeneur D, Dóczi T, Sulyok E, Frøkiaer J, Ottersen OP, Nielsen S (2000) Increased aquaporin-4 immunoreactivity in rat brain in response to systemic hyponatremia. *Biochem Biophys Res Commun* 270:495–503.
- Vajda Z, Pedersen M, Füchtbauer EM, Wertz K, Stødkilde-Jørgensen H, Sulyok E, Dóczi T, Neely JD, Agre P, Frøkiaer J, Nielsen S (2002) Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13131–13136.
- Vázquez-Juárez E, Ramos-Mandujano G, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H (2008) On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 21:1–14.
- Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, López-Domínguez A, Pasantes-Morales H (2009) Thrombin potentiates d-aspartate efflux from cultured astrocytes under conditions of K homeostasis disruption. *J Neurochem*, in press.
- Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J (2001) Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 63:321–336.
- Verbalis JG, Gullans SR (1991) Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res* 567:274–282.
- Verkman AS (2006) Roles of aquaporins in kidney revealed by transgenic mice. *Semin Nephrol* 26:200–208.
- Verkman AS (2009) Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol* 190:359–381.
- Videen JS, Michaelis T, Pinto P, Ross BD (1995) Human cerebral osmolytes during chronic hyponatremia. A proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Invest* 95:788–793.
- Wade JV, Olson JP, Samson FE, Nelson SR, Pazdernik TL (1988) A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *J Neurochem* 51:740–745.
- Walz W (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol* 33:309–333.
- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291–300.
- Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RK (2003) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1–80.
- Wehner F (2006) Cell volume-regulated cation channels. *Contrib Nephrol* 152:25–53.
- Yaka R, Biegona A, Grigoriadis N, Simeonidou C, Grigoriadis S, Alexandrovich AG, Matzner H, Schumann J, Trembovler V, Tsenter J, Shohami E (2007) D-cycloserine improves functional recovery and reinstates long-term potentiation (LTP) in a mouse model of closed head injury. *FASEB J* 21:2033–2041.
- Yamamoto N, Sobue K, Miyachi T, Inagaki M, Miura Y, Katsuya H, Asai K (2001) Differential regulation of aquaporin expression in

- astrocytes by protein kinase C. *Brain Res Mol Brain Res* 95: 110–116.
- Yamamoto T, Rossi S, Stiefel M, Doppenberg E, Zauner A, Bullock R, Marmarou A (1999) CSF and ECF glutamate concentrations in head injured patients. *Acta Neurochir Suppl* 75:17–19.
- Yang B, Zador Z, Verkman AS (2008) Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem* 283:15280–15286.
- Yang M, Gao F, Liu H, Yu WH, Sun SQ (2009) Temporal changes in expression of aquaporin-3, -4, -5 and -8 in rat brains after permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1290:121–132.
- Yu SP (2003) Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol* 70(4):363–386.
- Yukutake Y, Yasui M (2010) Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience*, 168:885–891.
- Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT (2009) Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol* 190:159–170.
- Zeng JW, Liu XH, Zhang JH, Wu XG, Ruan HZ (2008) P2Y1 receptor-mediated glutamate release from cultured dorsal spinal cord astrocytes. *J Neurochem* 106:2106–2118.
- Zhang H, Verkman AS (2008) Aquaporin-4 independent Kir4.1 K⁺ channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci* 37:1–10.

(Accepted 25 November 2009)
(Available online 28 December 2009)