



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Mecanismos de Regulación de los  
Cotransportadores de Potasio:Cloruro**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Doctor en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:  
**ZESERGIO CARLO MELO JEREZ**

**Dr. GERARDO GAMBA**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
**Dra. MARINA GAVILANES RUIZ**  
Facultad de Química  
**Dra. LAURA ESCOBAR**  
Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. Junio, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo de tesis presenta los resultados obtenidos durante mi doctorado realizado en la Unidad de Fisiología Molecular UFM, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Bajo la tutoría del Dr. Gerardo Gamba Ayala.

El trabajo fue posible gracias a los proyectos de CONACYT 165815 para Gerardo Gamba y 132503 para Adriana Mercado.

Mis estudios de doctorado fueron apoyados por la beca del programa de excelencia otorgada por CONACYT numero 240160.

## **GRACIAS...**

A mis papás Eliecer y Emma, ustedes me educaron con amor y dedicación, me dieron herramientas para afrontar el mundo, confiaron en mí. Por ustedes soy el ser humano que soy hoy. Esto es para ustedes.

A mis hermanos Eli, Win y Harry, porque son mi apoyo y han hecho mi familia cada vez más grande con hermosos niños que me motivan a seguir adelante todos los días. Por ustedes estoy seguro de que existe un futuro y cada vez será mejor. Los amo infinitamente.

A Marcos, tu confianza y amistad son invaluable y no se pueden pagar ni con dos vidas seguidas, gracias por darme una familia en México: los Sandoval Moreno y los Nissen Oscar y Eddy.

A Gerardo “El jefe”, más que un tutor ha sido un guía y un amigo en un camino que ha estado lleno de triunfos, conocerlos a ti y a Lila es el más satisfactorio de los logros. Gracias por el apoyo, protección y las miles de enseñanzas.

A Adriana, siempre al pendiente de cada detalle, hicimos muy buenos expes y una buena amistad.

A los miembros del lab de hoy y de otros tiempos: Rocío, Juan Pablo, Adrian, María, Damián, Luz, Chelo, Erika, Diana, Paola, Lore, Lalo, Ruy, Jaz, Sil, Fer, Zai. A los miembros del lab de la Dra Norma Bobadilla: Vicky, Rox, Art, Jonatan, Rosy, Tino. Por tantos buenos momentos.

A Norma Vázquez, por todos los valiosos consejos en el laboratorio.

A las doctoras Marina Gavilanes y Laura Escobar, por todas las preguntas, criticas y sugerencias para fortalecer el proyecto.

A los miembros del jurado por su constructiva revisión de esta tesis.

A la UNAM.

## Índice

	Página
<b>Índice</b>	<b>4</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>10</b>
<b>Introducción</b>	
Cotransporte de $K^+Cl^-$	<b>12</b>
Cotransportadores de $K^+Cl^-$ (KCCs)	<b>14</b>
KCC1	<b>17</b>
KCC2	<b>18</b>
KCC3	<b>22</b>
KCC4	<b>26</b>
Mecanismos de regulación de los KCCs	<b>29</b>
Cinasas WNK	<b>31</b>
Regulación de los KCCs por WNK3	<b>32</b>
Regulación por SPAK/OSR1	<b>34</b>
Los KCCs y su relación con el riñón	<b>37</b>
El riñón	<b>38</b>
Manejo de glucosa por el riñón	<b>41</b>
Manejo de $Na^+$ y $Cl^-$ por el riñón	<b>44</b>
Secreción de hidrogeniones ( $H^+$ ) por el riñón	<b>46</b>
<b>Planteamiento del proyecto</b>	
Justificación	<b>48</b>
Hipótesis	<b>48</b>
Objetivos	<b>49</b>
Metodología	<b>50</b>

<b>Resultados</b>	<b>54</b>
Artículos relacionados con la tesis	<b>55</b>
• <i>N-terminal serine dephosphorylation is required for KCC3 cotransporter full activation by cell swelling.</i>	
<b>Zesergio Melo</b> , Paola de los Heros, Silvia Cruz-Rangel, Norma Vásquez, Norma A. Bobadilla, Herminia Pasantes-Morales, Dario R. Alessi, Adriana Mercado, Gerardo Gamba. <i>J. Biol. Chem.</i> 2013, 288:31468-31476.	
• <i>Molecular evidence for a role for K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters in the kidney.</i>	
<b>Zesergio Melo</b> , Silvia Cruz-Rangel, Rocio Bautista, Norma Vásquez, Maria Castañeda-Bueno, David B. Mount, Herminia Pasantes-Morales, Adriana Mercado, Gerardo Gamba. <i>Am. J. Physiol. Renal Physiol.</i> 2013, 305: F1402-F1411.	
<b>Discusión</b>	<b>74</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>82</b>
<b>Apéndices</b>	<b>83</b>
<b>Referencias</b>	<b>94</b>

## Resumen

Los cotransportadores electroneutros de potasio:cloruro (KCCs) son proteínas de membrana que participan en el movimiento acoplado de  $K^+$  y  $Cl^-$  hacia afuera de la células y contribuyen a mantener la homeostasis celular tanto del agua, como de los electrolitos. Se expresan en diversos tejidos como eritrocitos, intestino, sistema nervioso central y riñón; en este órgano KCC3 y KCC4 se expresan en la membrana basolateral de las células de túbulo contorneado proximal y KCC4 está presente en la membrana basolateral de la porción ascendente gruesa del asa de Henle y en células alfa-intercaladas de ducto colector. Por estas ubicaciones y la su función fisiológica, estos transportadores se han asociado a enfermedades como anemia de células falciformes síndrome de Andermann y acidosis tubular renal.

Los KCCs están involucrados en diversos procesos pero con un papel importante y muy particular en la regulación del volumen celular. La actividad de los KCCs se modula por procesos de fosforilación/defosforilación. En condiciones de isotonicidad están inactivos y fosforilados mientras que la hipotonicidad promueve su desfosforilación y consiguiente activación. Para que se den estos procesos de regulación se han encontrado dos sitios de fosforilación críticos: las treoninas 991 y 1048.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la regulación de los KCCs en diferentes condiciones fisiológicas usando modelos murinos e *in vitro* con la técnica de ovocitos de *Xenopus laevis*. Para lo cual evaluamos la expresión a nivel de proteína y RNA mensajero de KCC4 y KCC3 y además la distribución intrarenal en ratas Wistar o ratones C57 en cinco diferentes condiciones: 1) hiperglicemia después de una dosis única de estreptozotocina, 2) dieta baja en sal, 3) acidosis metabólica inducida por cloruro de amonio en solución bebible y 4) bajo y 5) alto potasio en la dieta.

En estado de hiperglicemia tanto el RNAm como la proteína de KCC3 incrementaron en corteza renal específicamente en las membranas basolaterales

del túbulo proximal; este incremento en KCC3 no se observó en otros modelos. La expresión de KCC4 aumentó en hiperglicemia, dieta baja en sal y en acidosis metabólica en la médula renal específicamente en la membrana basolateral de células alfa-intercaladas. Este aumento en KCC4 bajo el estímulo de dieta sin sal se observó también en ratones deficientes de WNK4 lo que sugiere que el incremento en KCC4 no depende de la presencia de esta cinasa. Por otro lado no hubo cambios en la expresión proteica de KCC3 y KCC4 ante una dieta baja o alta en potasio. Estos datos son consistentes con un papel para KCC3 apoyando el mecanismo de reabsorción de glucosa en túbulo proximal y para KCC4 en reabsorción de sal en asa de Henle y secreción de ácido en ducto colector.

Por otro lado demostramos que la defosforilación de un nuevo sitio aceptor de fosforilación es importante para la regulación de la actividad de KCC3a. Encontramos que el complejo activado *in vitro* formado por SPAK y su proteína reguladora MO25 fosforila a KCC3a en la serina 96. Esta fosforilación se determinó tanto en ovocitos de *Xenopus laevis* como en células HEK 293 en condiciones de isotonicidad al igual que la defosforilación en hipotonicidad. Adicionalmente la cinasa WNK3 que inhibe la función de KCC3 también promueve la fosforilación del sitio S96 como lo hace con la T991 y T1048. El cambio puntual de esta serina por alanina no tiene efecto sobre la actividad del cotransportador sin embargo la triple mutante incluyendo los otros sitios (KCC3 S96A/T991/1048A) presenta una actividad en isotonicidad mayor a la de la doble mutante que no incrementa por hipotonicidad y finalmente no puede ser inhibida por WNK3.



## **Abstract**

The potassium chloride cotransporters (KCCs) are membrane proteins that participate in the coupled movement of  $K^+$  and  $Cl^-$  out of the cell and help to maintain cellular homeostasis both the water as electrolyte. KCCs are expressed in various tissues such as erythrocytes, gut, central nervous system and kidney where KCC3 and KCC4 are expressed in the basolateral membrane of proximal tubule cells and KCC4 is present in the basolateral membrane of the thick ascending limb of the Henle's loop and alpha-intercalated collecting duct cells. Have been associated with diseases such sickle cells disease, Andermann syndrome and renal tubular acidosis.

KCCs are also involved in several processes but with a very particular and important role in cell volume regulation. Their activity is modulated by phosphorylation and dephosphorylation processes. In isotonic conditions are inactive and phosphorylated while hypotonicity promotes its dephosphorylation and consequent activation. Previously was described two critical phospho-acceptor sites: threonines 991 and 1048.

The objective of this thesis is to analyze the regulation of KCCs from two points of view: the physiological and molecular. Physiologically we evaluated the expression level of messenger RNA and protein levels and KCC3 KCC4 intrarenal distribution using Wistar rats or C57 mice at five different conditions: hyperglycemia after a single dose of streptozotocin, low salt diet, ammonium chloride induced metabolic acidosis and low to high potassium diet. In hyperglycemic state both as mRNA as protein of KCC3 specifically increased in the basolateral membranes of renal proximal tubule, this increase was not observed in other models. We found an increased expression of KCC4 in hyperglycemia, low-salt diet and metabolic acidosis in renal medulla specifically basolateral alpha-intercalated cells. This increase of KCC4 by low salt diet was also observed in WNK4 knockout mice, suggesting that KCC4 activity is not dependent on the presence of this kinase. On the other hand there were no changes in protein expression of KCC3 and KCC4 in low or high potassium diet. These data are consistent with a role for KCC3

supporting the mechanism of glucose reabsorption in the proximal tubule and for KCC4 in the salt reabsorption by loop of Henle and secretion of acid in the collecting duct.

Moreover, we found that the dephosphorylation of a new phosphorylation acceptor site is important for regulation of the activity of KCC3a. We found that the complex activated *in vitro* formed by SPAK and its regulatory protein MO25 phosphorylates serine 96 of KCC3a. This phosphorylation under isotonic conditions was determined both in *Xenopus laevis* oocytes and HEK-293 cells as well as dephosphorylation in hypotonic conditions. Additionally the WNK3 kinase that inhibits the KCC3 function also promotes phosphorylation in site S96 as it does with the T991 and T1048. The unique change of the serine to alanine had no effect on the activity however KCC3a triple mutant including the new site (KCC3 S96A-T991/1048A) has a greater activity under isotonicity when compares to the double mutant, that activity is not increased by hypotonicity and this mutant cannot be inhibited by WNK3.

## Abreviaturas

**SLC12**- Familia de genes que agrupa a los cotransportadores electroneutros acoplados a cloruro

**CCC**- Cotransportadores electroneutros acoplados a cloruro

**NEM**- N-etilmaleimida

**PP**- Proteínas fosfatasas

**KCCs**- Cotransportadores de  $K^+Cl^-$

**NCC**- Cotransportador de  $Na^+Cl^-$  sensible a tiazidas

**NKCC1/2**- Cotransportadores de  $Na^+K^+2Cl^-$  sensible a bumetanida

**STM**- Segmentos transmembranales

**SNC**- Sistema nervioso central

**RVD**- Disminución regulatoria de volumen celular

**$[Cl^-]_i$** - Concentración intracelular de cloruro

**hESTs**- Etiquetas de secuencias expresadas en humano

**RNA<sub>m</sub>**- RNA mensajero

**DNAC**- DNA complementario

**HEK-293**- Células de riñón embrionario humano

**DIOA**- Acido dihidroindeniloxi-alkanoico

**NRSE**- Elemento de silenciamiento génico restrictivo a neuronas

**GABA**- Ácido gama amino butírico

**CK-B**- creatín cinasa B

**WNK**- Cinasas sin lisina (K)

**SPAK/OSR1**- Por las siglas en ingles "Ste-20 related proline-alanine-rich kinase y Oxidative stress response 1"

**JNK**- Janus cinasas

**SILAC**- por sus siglas en inglés "stable isotope labeling of aminoacids in cell culture"

**TCP**- Túbulo contorneado proximal

**TCD**- Túbulo contorneado distal

**CC**- Conducto colector

**GLUTs**- Transportadores de glucosa

**SGLUT**- Transportadores de  $Na^+$ /glucosa

**ENaC**- Canal epitelial de  $Na^+$

**NHE-3**- Intercambiador de Na<sup>+</sup> con H<sup>+</sup>

**CLC-KA/B**- Canales de cloro específicos de riñón

**CAII**- Anhidrasa carbónica tipo II

**ATCC**- por sus siglas corporativas en ingles "American type culture collection"

**SBF**- Suero bovino fetal

**STZ**- Estreptozotocina

## Introducción

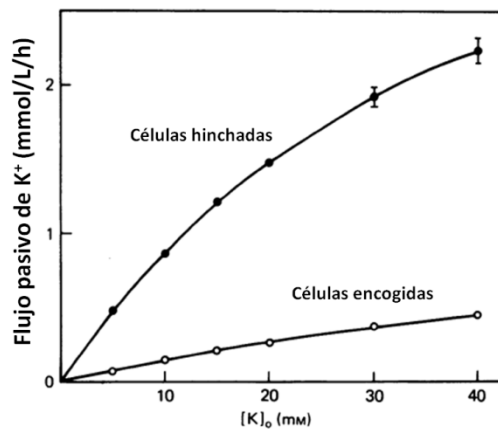
Las células poseen mecanismos para optimizar los procesos de transporte a través de la membrana. Estos les permiten responder de manera efectiva a cambios osmóticos en el ambiente para mantener una correcta homeostasis. El equilibrio entre el volumen de las células y la concentración de su medio interno, resulta importante para el mantenimiento de su metabolismo y la participación dentro de los órganos y sistemas, así como en la supervivencia del organismo en general (12). Es crucial que la concentración de iones dentro y fuera de la célula sea controlada; ésta se establece dependiendo de la osmolaridad extra e intracelular, de manera tal que el transporte iónico a través de la membrana constituye el medio más rápido y eficiente para alcanzar el equilibrio osmótico.

Para realizar estos procesos, la célula mueve iones como el sodio ( $\text{Na}^+$ ), el potasio ( $\text{K}^+$ ) y el cloro ( $\text{Cl}^-$ ) a través de diversas proteínas transportadoras, poros, canales y bombas, así como proteínas de uniones intercelulares, cuyos mecanismos efectores han sido en general identificados y estudiados a nivel fisiológico, molecular y genómico. Entre estos se encuentran los cotransportadores de la familia SLC12 (por sus siglas en inglés *Solute Carriers*). La función de las proteínas de esta familia depende del gradiente electroquímico generado por los transportadores primarios como la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa. Por esta razón son conocidos como transportadores secundarios. El transporte de iones a través de ellos se lleva a cabo acoplado al ion  $\text{Cl}^-$  en una relación estequiométrica de 1:1, por lo que esta familia ha sido llamada “cotransportadores electroneutros acoplados a cloruro (CCC)”(9).

### Cotransporte de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$

Este tipo de transporte fue descrito por primera vez hacia la década de los ochentas en eritrocitos y se ha estudiado en este tipo celular en diferentes especies, incluyendo al humano (13-14), oveja (15-17), conejo (18-20), perro (21-23), rata (24-26), ratón (27-28) entre otros. Normalmente la actividad de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa determina la alta concentración de  $\text{K}^+$  y baja de  $\text{Na}^+$  que genera un gradiente hacia el exterior de  $\text{K}^+$  usado por otros transportadores presentes en

este tipo celular. Dunham y cols. en 1981 marcaron la pauta para entender el cotransporte de  $K^+$  y  $Cl^-$ . Utilizando eritrocitos de oveja observaron que cuando aumenta el volumen de la célula también aumenta el transporte pasivo de  $K^+$  que no es sensible a ouabaína, fármaco inhibidor de la función de la  $Na^+K^+$ -ATPasa. Este proceso no sucede de la misma forma cuando las células son sometidas a encogimiento aunque estén en contacto con la misma concentración de  $K^+$  (Figura 1). En suma los resultados de este trabajo describen un transporte de  $K^+$  sensible a cambios en el volumen y además dependiente de  $Cl^-$  (3).

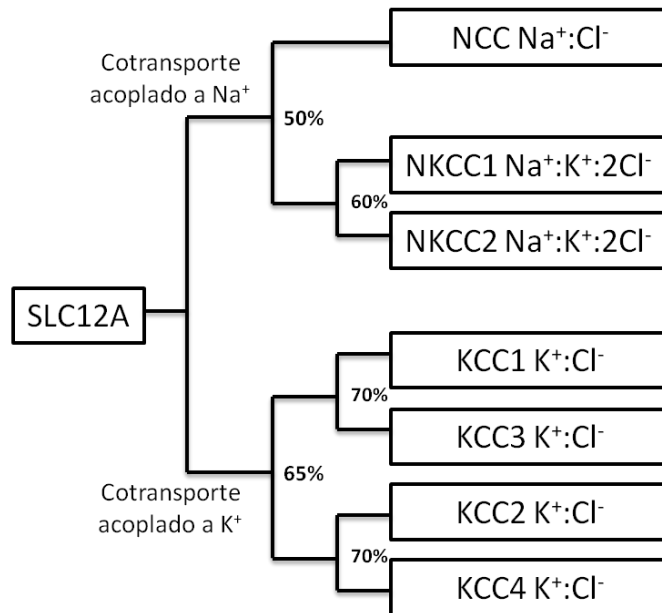


**Figura 1. Cinética del flujo pasivo de  $K^+$  en eritrocito de oveja.** Adaptado de Dunham,1981(3)

Los hallazgos de estos trabajos iniciales describieron este sistema de transporte como un sistema ubicuo, involucrado en la regulación del volumen celular por lo que se activa cuando aumenta el volumen celular, también es activado por la oxidación de grupos tiol por el reactivo N-etilmaleimida (NEM), la disminución de  $Mg^{2+}$  intracelular, la acidificación ligera (pH 7) y los inhibidores de proteínas cinasas, como es el caso de la estaurosporina y la genisteína. Por el contrario, la disminución en el volumen celular, la presencia de cationes divalentes y la presencia de inhibidores de proteínas fosfatasa (PPs) inhiben su actividad.

## Cotransportadores de $K^+Cl^-$ (KCCs)

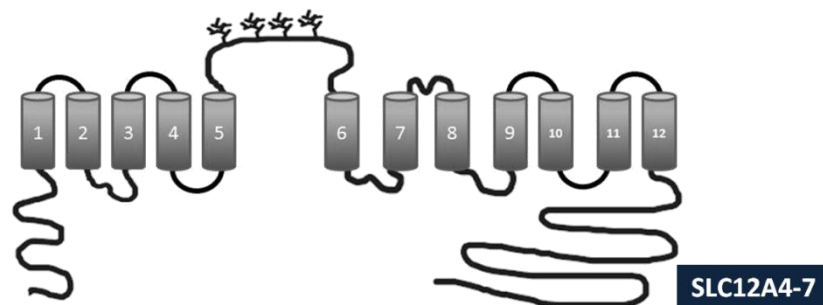
A la fecha se han identificados cuatro tipos funcionales de cotransportadores electroneutros acoplados a  $Cl^-$ , codificados en la familia de genes de los transportadores de solutos conocida como SLC. Esta familia está compuesta por siete genes y se divide en dos ramas: como lo muestra el árbol filogenético representado en la figura 2. La primera está integrada por tres genes que codifican para cotransportadores que utilizan  $Na^+$  con o sin  $K^+$  como el cotransportador de  $Na^+Cl^-$  sensible a tiazidas (NCC) y dos de  $Na^+K^+2Cl^-$  sensibles a bumetanida (NKCC1 y NKCC2). La otra rama contiene cuatro genes que codifican para los cotransportadores que traslocan  $K^+$  acompañado de  $Cl^-$ , conocidos como KCCs ( $K^+Cl^-$  cotransporter 1-4) (29). Es así como NCC, NKCC1 y NKCC2 translocan iones hacia el interior de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el transporte de sodio, mientras que los KCCs, lo hacen desde adentro hacia fuera de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el potasio.



**Figura 2. Árbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloruro (CEN).** La familia se compone de tres genes que codifican para cotransportadores que utilizan sodio como catión para acoplarse al transporte de cloro (NCC, NKCC1 y NKCC2) y otra rama compuesta por cuatro genes que codifican para cotransportadores que sólo utilizan potasio como catión acoplado al cloro (KCC1 a KCC4). Adaptado de Gamba (9)

Los genes *SLC12A4*, *SLC12A5*, *SLC12A6* y *SLC12A7* codifican para los cotransportadores de  $K^+Cl^-$  conocidos como KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4, respectivamente. Todos comparten 65-70% de identidad en su secuencia proteica y pueden agruparse en dos subramas: KCC1 con KCC3 y KCC2 con KCC4 (Figura 2). Su estructura secundaria consta de una región central de doce segmentos transmembranales (STM) flanqueados por dos extremos intracelulares amino y carboxilo de naturaleza hidrofílica, además de un asa extracelular localizada entre los STM-5 y STM-6 que contiene cuatro posibles sitios de glucosilación (30) (Figura 3).

Teniendo en cuenta que esta estructura es compartida por las cuatro proteínas de la subfamilia KCC, Weng y cols. demostraron que la presencia de glucosilación en estos cuatro sitios es importante para el correcto tráfico membranal de la proteína una vez procesada, donde ejerce su función de cotransporte. Sobre la secuencia de KCC4 este grupo, usando mutagénesis para eliminar en diferentes combinaciones los aminoácidos susceptibles a ser glucosilados, comprobaron que la ausencia de la misma previene la expresión del cotransportador en la membrana celular. Esta manipulación además le confiere mayor probabilidad de ser degradado a través de la vía de proteosoma (31). Este cambio involucra que las funciones en las que están participando los KCCs también se vean afectadas, como lo es el desarrollo y la progresión e invasión de tumores.



**Figura 3. Estructura de los cotransportadores de  $K^+Cl^-$ .** Análisis predictivos de perfil de hidropatía muestran 12 segmentos transmembranales, limitados por dominios amino y carboxilo terminales intracelulares largos, con presencia de sitios de glucosilación entre las asas 5 y 6 transmembranales.



Los KCCs son proteínas de membrana que participan en el movimiento acoplado de  $K^+$  y  $Cl^-$  hacia afuera de la célula y contribuye a mantener la homeostasis celular tanto del agua, como de los electrolitos (32). Se expresan en diversos tejidos y grupos celulares como eritrocitos, intestino, sistema nervioso central (SNC) y riñón; esta distribución sugiere su relación con enfermedades como la anemia de células falciformes, síndrome de Andermann y acidosis tubular renal (para un resumen general ver tabla 1). Además están involucrados en diversos procesos incluyendo un papel importante y muy particular en la regulación del volumen, es así como cuando la célula sufre hinchamiento generado por la disminución drástica de la osmolaridad del medio, se activa un mecanismo correctivo que depende de la activación de los KCCs con el fin de eliminar iones y agua y regresar la célula a su volumen original. A este movimiento de sales y solutos se le conoce como disminución reguladora del volumen o RVD (por sus siglas en inglés *Regulatory Volume Decrease*) (29).

La evidencia apunta a que existen KCCs en diferentes tipos celulares y tejidos como cerebro (33-35), músculo vascular liso (36-37), endotelio (38), corazón (39-40), riñón (41-43) y la mayoría de grupos celulares. En estos sitios participa no sólo en la regulación del volumen celular, sino también en la absorción transepitelial de sal, la secreción renal de  $K^+$ , la regulación de la pérdida de  $K^+$  en el miocardio durante procesos de isquemia y la regulación de la concentración neuronal de  $Cl^-$ . La participación de los cotransportadores de  $K^+Cl^-$  en la regulación del volumen celular es crucial en el riñón. Este órgano es capaz de establecer gradientes osmóticos que van desde una concentración isotónica en la corteza hasta diferentes concentraciones en la medula, es así como las células renales están expuestas a diferentes osmolaridades que le presentan por el lado basolateral el líquido intersticial y por el apical el fluido tubular. Por es necesario que el mecanismo de RVD donde participan los KCCs de manera importante se lleve a cabo correctamente en estas células (44).

Proteína	Gen en humano	Cromosoma en humano	Tamaño (AA)	Isoformas	Expresión celular	Ratón knockout	Activado en
KCC1	SLC12A4	16q22.1	1085	hKCC1a hKCC1b hKCC1c	Ubicua		Hipotonicidad
KCC2	SLC12A5	20q13	1116	hKCC2a hKCC2b	-Neuronas de la corteza -Células piramidales del hipocampo -Capa granular del cerebelo	Déficit locomotor severo , epilepsia y muerte	Isotonicidad Hipotonicidad
KCC3	SLC12A6	15q14	1150	hKCC3a hKCC3b	Ubicua *Riñon *SNC	Déficit sensorimotor y neuropatía periférica	Hipotonicidad
KCC4	SLC12A7	5p15	1083	hKCC4a hKCC4b	Ubicua *Riñon	Sordera y acidosis tubular renal	Hipotonicidad

**Tabla 1. Características generales de los KCCs.** Los Asteriscos (\*) denotan lugares de especial énfasis en el desarrollo de esta tesis donde se expresan KCC3 y KCC4

A continuación se describe cada uno de los KCCs (KCC1-KCC4) haciendo énfasis en aspectos como las características génicas, las propiedades funcionales y las funciones que van de la mano con el patrón de expresión la proteína.

### **KCC1**

Fue clonado inicialmente por Gillen y cols. en 1996, buscando fragmentos de secuencias con moderada homología con NKCC1 en la base de datos de “etiquetas de secuencias expresadas en humano” (hESTs). Encontraron una secuencia de aminoácidos con un 24-25% de homología con los otros miembros de la familia reportados previamente NKCC y NCC. De la misma manera aislaron clonas homologas de riñón de conejo y cerebro de rata (45). Los ensayos iniciales de Northern blot demostraron una amplia distribución de KCC1 en tejidos como cerebro, colon, corazón, riñón, pulmones, bazo y estómago, es por ello que a KCC1 se le conoce como la proteína “housekeeping” de esta familia de

cotransportadores. El gen del KCC1 en el humano (SLC12A4), se localiza en el cromosoma 16, en el brazo q22 (46) con un tamaño de 23 kb que codifica para 1085 aminoácidos. Muestra un alto porcentaje de conservación entre especies, con una homología de 96% entre las proteínas de humano, conejo, rata, oveja y ratón. La estructura del gen muestra 24 exones y tiene la capacidad por medio de empalme alternativo para generar 3 variantes diferentes a partir del RNA mensajero (RNAm) con diferentes extremos 3', denominadas hKCC1a, hKCC1b y hKCC1c. Estos DNA complementarios (cDNAs) codifican para proteínas de 1085, 1068 y 1011 aminoácidos, respectivamente.

La primera caracterización funcional de KCC1 fue realizada por Gillen y cols. a partir de su clonación. Este grupo realizó experimentos de expresión funcional en células HEK-293 (por las siglas en ingles Human Embryonic Kidney cells) usando la clona obtenida de conejo midiendo la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$ . Lo que encontraron luego de la transfección con el cDNA de KCC1 fue un aumento significativo de la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  que se activaba cuando las células se exponían a un medio hipotónico (45). De la misma manera, usando el sistema de expresión funcional pero ahora en ovocitos de *Xenopus laevis* Mercado y cols. al medir la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$ , mostraron que la clona de KCC1 procedente de conejo no tiene actividad en medio isotónico pero es hasta 20 veces más activo en hipotónico, actividad que es dependiente de la presencia de  $\text{Cl}^-$  (47).

## **KCC2**

Este miembro de la familia se expresa específicamente en neuronas. Codificado por el gen SLC12A5 se localiza en el cromosoma 20q13 en humanos y comprende alrededor de 30 kb divididas en 24 exones (9). KCC2 fue clonado por Payne y cols. en 1996, a partir de secuencias EST de cerebro humano con una homología del 35% con NKCC1. Obtuvieron un fragmento de 286 pb y empleando la técnica de PCR, usaron estos fragmentos como sondas para amplificar a KCC2 en una genoteca de cerebro de rata (48). Este mismo grupo se dio a la tarea de caracterizar funcionalmente a KCC2 usando células HEK-293 como modelo de expresión. Los resultados de los experimentos de captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  mostraron

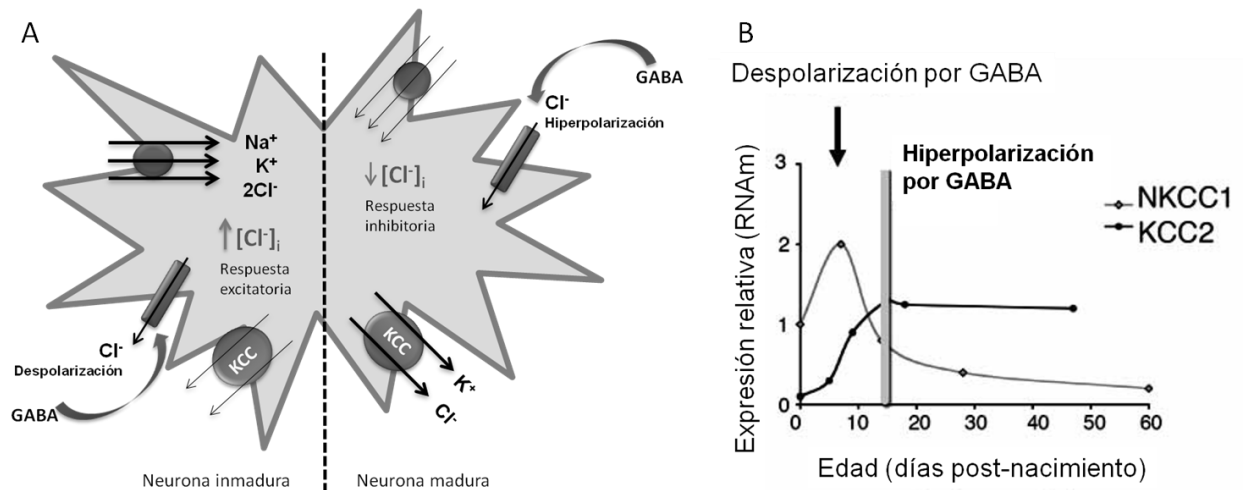
una proteína glucosilada que presentaba función en isotonicidad pero no en hipotonicidad, cuya función aumentaba en presencia de NEM. Estas mediciones mostraban una total dependencia de  $\text{Cl}^-$  y se inhibían con DIOA (ácido dihidroindeniloxi-alkanoico) (49). Más tarde en el año 2000 Strange y cols. usando el modelo de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* encontraron al igual que el grupo de Payne un transportador activo en isotonicidad pero cuya función aumenta en presencia de medio hipotónico hasta 20 veces más (50). La actividad encontrada en isotonicidad a diferencia de los demás KCCs puede ser explicada con el hallazgo de Mercado y cols. de un dominio ubicado en el extremo carboxilo terminal. Este dominio comprende desde el residuo 645 hasta el 1116 y confiere a esta proteína la capacidad de transporte incluso en condiciones de isotonicidad. A esta región se le llamó “dominio isotónico” (51).

A la fecha se conocen 2 isoformas generadas a partir de empalme alternativo de este gen: KCC2a y KCC2b. KCC2a fue el último en ser descrito pero nombrado “a” por la presencia de 40 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal codificados en el exón alternativo 1a. Las dos isoformas están solo en neuronas de sistema nervioso central, pero la diferencia radica en el momento del desarrollo celular en que se expresan; la expresión depende del desarrollo embrionario: en etapas neonatales la función de cotransporte  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$  depende de KCC2a y aproximadamente dos semanas después del nacimiento cuando ya la neurona madura, esta función es cumplida por KCC2b (52).

El patrón de transcripción de KCC2 ha sido descrito detalladamente por Kanaka y cols.. En su trabajo KCC2 se encontró únicamente en cerebro y sólo en células neuronales y no en otro tipo de células como glía ni células epiteliales de plexo coroideo. En el telencéfalo KCC2 presenta una fuerte expresión en la capa celular mitral al igual que la capa granular y glomerular del bulbo olfatorio, lugar donde se encuentra específicamente en el nervio vomero-nasal y la capa de células granulares. También se encuentra fuerte expresión en las neuronas de la corteza piriforme y la corteza cerebral, hipocampo, la amígdala, lecho nuclear de la estra terminalis, ganglio basal. En el diencefalo se muestra fuerte expresión en

tálamo e hipotálamo y de igual manera en el puente y la médula oblongada (53). Esta expresión restringida a sistema nervioso central se presume es debida a regulación transcripcional negativa en las células no pertenecientes al sistema nervioso central, esto se explica considerando la presencia en el gen SLC12A5 de un elemento de silenciamiento restrictivo de neuronas o NRSE (por sus siglas en ingles Neuronal-Restrictive Silencing Element) que se encuentra localizado en el extremo 3' del exón 1. Este fragmento de 21 pares de bases de KCC2 interactúa con proteínas nucleares de células no neuronales, lo que sugiere un papel importante de esta secuencia en la expresión específica en neuronas (54).

La respuesta de las neuronas que manejan a GABA como neurotransmisor está relacionada directamente con cambios durante desarrollo en el gradiente de cloruro, que ocurren a través de los receptores-canal y que determinan el tipo de respuesta: excitadora o inhibitora mediadas por la despolarización o hiperpolarización de la membrana respectivamente.



**Figura 4. Representación esquemática de la función y expresión de KCC2 y NKCC1.** A) La figura muestra la relación entre la maduración neuronal y el tipo de respuesta a GABA. En neuronas inmaduras la expresión y función de KCC2 se encuentran al mínimo nivel, mientras que aquellas de NKCC1 se encuentran elevadas. La regulación coordinada de ambas proteínas tienen el objetivo de aumentar la concentración de intraneuronal de Cl<sup>-</sup> a través de NKCC1, promoviendo una respuesta a GABA excitadora. En el caso de la neurona madura sucede lo contrario, la expresión y función de KCC2 aumentan y la de NKCC1 se reduce considerablemente, dando como resultado la hiperpolarización y por ende una respuesta inhibitora medida por GABA. Adaptado de Arroyo 2013(10). B) Niveles de expresión relativa de KCC2 y NKCC1 a lo largo del tiempo y correlación con la estimulación por GABA. Adaptado de Galanopoulou 2008 (11)

Es en este punto donde KCC2 y NKCC1 cumplen una función coordinada primordial para mantener de la concentración intraneuronal de  $\text{Cl}^-$  ( $[\text{Cl}^-]_i$ ). En neuronas inmaduras la  $[\text{Cl}^-]_i$  se encuentra en niveles muy altos, lo que mantiene el potencial de membrana en valores negativos en comparación con el valor basal. Esto es crucial ya que produce la apertura del canal de  $\text{Cl}^-$ , cuando se une GABA, permitiendo la salida de  $\text{Cl}^-$  en favor del gradiente de concentración, lo que rápidamente despolariza la célula y a su vez activa al cotransportador NKCC1 con el fin de recuperar el  $\text{Cl}^-$  perdido. Este estímulo media una respuesta excitadora en respuesta a GABA. En neuronas en etapa madura del desarrollo la  $[\text{Cl}^-]_i$  disminuye, al contrario de lo que sucede en neuronas inmaduras. La activación del canal de  $\text{Cl}^-$  receptor de GABA resulta en hiperpolarización de la célula, siendo la entrada de  $\text{Cl}^-$  masiva la causa de la activación de KCC2 e inhibición de NKCC1 (Figura 4A) (11). En etapas tempranas NKCC1 es el responsable de la elevada  $[\text{Cl}^-]_i$  que después del nacimiento se regula negativamente para reducir la expresión de este cotransportador. En contraste la expresión de KCC2 en neuronas de hipocampo, retinales y corticales está ausente durante etapas inmaduras de la neurona pero aparece después del nacimiento y durante la vida adulta (Figura 4B) (9, 11, 55). Otro factor que contribuye al incremento de la funcionalidad de KCC2 en etapas postnatales de la neurona es su capacidad de homodimerización. Para otros miembros de la familia de cotransportadores se conoce que su forma funcional adecuada se da por una organización de tipo dimérica como es el caso de NCC (56) y NKCC2 (57). En el caso de KCC2 el proceso de oligomerización hace que la proteína sea totalmente funcional y también se da de manera dependiente del desarrollo neuronal, lo cual correlaciona con la capacidad funcional de este KCC en estados maduros de la neurona (58). El papel fisiológico de KCC2 en el sistema nervioso central puede explicarse al observar el fenotipo del ratón deficiente de esta proteína. Estos ratones presentan una dramática reducción de la proteína de KCC2, son de menor talla que los silvestres y mostraron en su comportamiento una postura anormal incluso durante el caminar. Como característica principal presentan frecuentes ataques y convulsiones desencadenados por estímulos muy leves; además, estos ratones muestran una

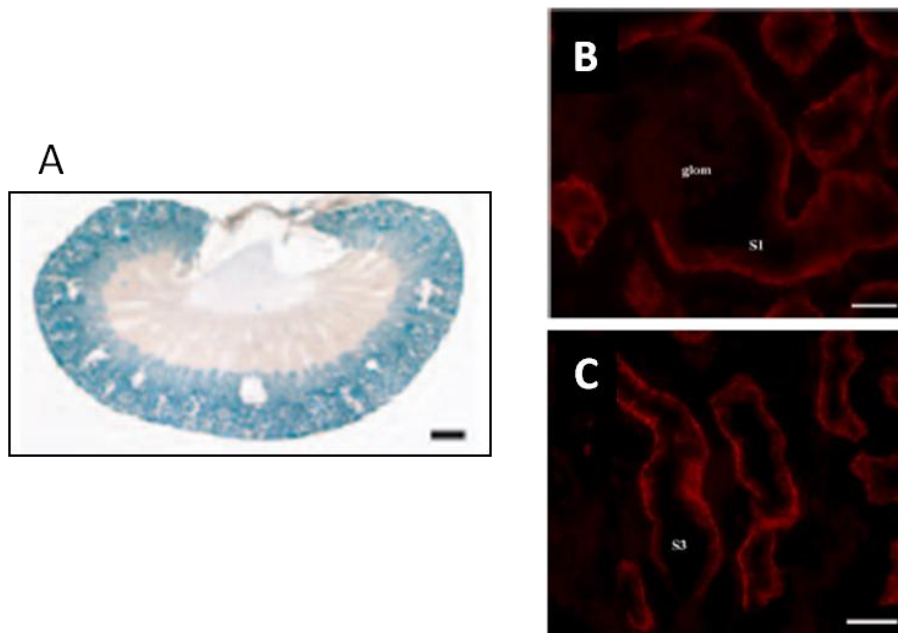
expectativa de vida mucho más corta por lo que mueren en las primeras tres semanas (59).

### **KCC3**

Este KCC fue clonado en 1999 a partir de RNA mensajero de humano por tres grupos casi simultáneamente y quedó establecido en el gen SLC12A6. El primer grupo fue el de Hiki y cols. (60), quienes usando PCR a partir de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano lograron identificar transcritos que mostraban cambios en los niveles de expresión después de ser tratadas con el factor de crecimiento para células endoteliales vasculares (VEGF). El resultado obtenido arrojó una banda que después de su respectivo análisis correspondía a un potencial transportador de membrana con un 77% de identidad con KCC1 y un 73% con KCC2. Por esta similitud le llamaron KCC3 y se determinó la secuencia primaria de los 1099 aminoácidos con un perfil de hidropatía similar al de los demás KCCs: una proteína con 12 dominios transmembrana y con dominios carboxilo y amino intracelulares. La sobreexpresión de KCC3 en células HEK-293 y posterior análisis funcional demostró que KCC3 presentaba características similares a los KCCs; es decir, un aumento de la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  con la transfección, dependiente totalmente de  $\text{Cl}^-$ , que se activó con NEM. Simultáneamente Mount y cols. usando la estrategia de análisis *in silico* aislaron no sólo a KCC3 sino también KCC4 que no se había reportado hasta ese momento (61).

KCC3 fue aislado de una librería de cDNA de músculo humano y mapeado en el cromosoma 15q14. La expresión funcional fue medida usando el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Al inyectar RNAc de KCC3 encontraron un aumento significativo en la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  en comparación con ovocitos inyectados con agua. Este incremento fue evidente sólo cuando los ovocitos se incubaban en medio hipotónico, mostro ser totalmente dependiente de  $\text{Cl}^-$  y se observó inhibición en presencia de 2 mM de furosemida, un diurético de tipo bumetamida que a altas concentraciones logra inhibir a los KCCs. En el mismo año Race y cols. aislaron un KCC3 a partir de una librería genómica de placenta humana y usando la estrategia *in silico* (62) de igual forma encontraron

un cotransportador de  $K^+Cl^-$  cuya función se activaba por NEM y considerablemente por hipotonicidad. Este gen pertenecía a un cotransportador de 1150 aminoácidos, aún de mayor tamaño que el previamente reportado por Hiki y Mount. Es importante resaltar que la diferencia del KCC que encontró este grupo radica básicamente en el exón 1, lo que marca una pauta para la denominación de diferentes isoformas conocidas como KCC3a y KCC3b, la isoforma larga, de 1150 aa y la corta, de 1099 aa respectivamente. El RNAm de KCC3a se expresa en una amplia variedad de tejidos y células como cerebro, corazón, músculo y pulmón, mientras que KCC3b es abundante especialmente en riñón (8). Estas no son las únicas isoformas probables: se generan al menos seis diferentes transcritos a partir del gen SLC12A6, usando sitios de comienzo de la transcripción alternativos, exones alternativos o empalme alternativo: KCC3a, KCC3b, KCC3a-x2M isoforma que carece de exón 2, KCC3b-x2M, KCC3a-S1 y KCC3a-S2. Estos seis transcritos codifican para diferentes extremos amino terminales (8). El estudio de la localización de estos transcritos es un aspecto importante para el trabajo que constituye esta tesis, ya que en este órgano, KCC3 se encontró corteza renal (1), específicamente en las membranas basolaterales de las células de los túbulos proximales desde el segmento S1 hasta S3 como se detalla en la Figura 5.



**Figura 5. Localización intrarrenal de KCC3.** A) Marcaje localizando KCC3 restringido a corteza renal publicado por Rust y colaboradores (1). B y C) Inmunofluorescencias que muestran la localización específica de KCC3 en túbulo contorneado proximal en segmento S1 (B) y segmento S3 (C) publicados por Mercado y cols (8).



Para interpretar el papel fisiológico de KCC3 se puede hacer una aproximación desde dos puntos de vista: fisiopatológicamente o estudiando el ratón deficiente de dicho gen. La falta de función de KCC3 está relacionada directamente con el desarrollo de una enfermedad conocida como síndrome de Andermann o neuropatía motora y sensorial hereditaria asociada con agenesia del cuerpo caloso. Este es un síndrome autosómico recesivo que se caracteriza por un retraso en el desarrollo cerebral, severa neuropatía sensorial y motora con arreflexia y grados variables de agenesia del cuerpo caloso, lo que implica nula o deficiente formación de esta estructura, así como otros síntomas relacionados con el desarrollo motor muscular. Se identificó originalmente en dos poblaciones franco-canadiense del noreste de Quebec en Canadá: la región de Saguenay-Lac-St-Jean y el condado de Charlevoix (63). En el 2002 Howard y cols. encontraron que una mutación en el gen SLC12A6 que codifica para KCC3 era la responsable de la enfermedad en la población franco-canadiense. Una posibilidad era la ausencia de una guanina en el exón 18, otra opción era la eliminación de una citosina y una guanina con una inserción de una guanina en el exón 11(64). Sólo dos casos se han descrito fuera de la población de Quebec, un caso de dos hermanos en Verona, Italia con una mutación en la arginina 675 que inserta un codón de paro y dos pacientes jóvenes masculinos y hermanos de origen turco con una mutación sin sentido en el exón 22 en la arginina 1011. Los mecanismos por los cuales estas mutaciones no permiten la función óptima de KCC3 pueden ser varios: el primero es que se produce una proteína truncada que incapaz de insertarse y establecerse en la membrana celular y por ende no logra cumplir la función de transporte (65) y el segundo mecanismo es la imposibilidad de una interacción con la creatín cinasa B (CK-B), y de esta interacción depende la consecuente activación del cotransportador para ejercer su función de transporte. La importancia de esta interacción se ha demostrado en SNC cuando KCC3 pierde totalmente la función del cotransportador (65).

Resulta muy interesante estudiar los ratones deficientes de KCC3, debido a que la supresión de este gen reproduce un fenotipo neurológico similar al observado en el síndrome de Anderman con déficit locomotor severo, neuropatía

periférica y déficit sensorial y motor, aunque no presentan la característica agenesia de cuerpo calloso. Todo esto sumado revela un papel importante de KCC3 en el desarrollo del sistema nervioso central, que no puede ser compensado por otro KCC, como KCC2, por la diferencia de localización de KCC3 que es axonal en contraste con la de KCC2 que está básicamente en el soma de la neurona. Esta ubicación diferencial marcaría un impacto en las distintas funciones de cada uno de ellos. En las neuronas de los ratones deficientes de KCC3 también se observa una marcada reducción en el crecimiento celular y trastornos en la regulación del volumen. Esto fue evidenciado porque al exponer tanto las neuronas de animales silvestres como las de aquellos deficientes de KCC3 a condiciones de hipotonicidad (230 mOsm), el volumen celular de ambas aumentó de forma similar, alrededor de un 15%. No obstante, se observó que mientras las neuronas de ratones silvestres recuperaban su volumen normal en 20 minutos, el RVD de las neuronas deficientes de KCC3 se veía reducido severamente. Por todo esto se postula a KCC3 como un factor primordial en la neurodegeneración progresiva observada en estos ratones. Un rasgo importante es el desarrollo de sordera durante el primer año de vida de estos animales y que se asocia con un proceso degenerativo de la cóclea, lugar donde se expresa KCC3 en condiciones normales al igual que en el órgano de corti y la estría vascularis (66). Una variable interesante en estos ratones es la generación de hipertensión arterial. Boettger y cols. en los ratones deficientes de KCC3 midieron la presión usando catéteres implantados crónicamente y encontraron que los ratones silvestres de 3 a 5 meses de edad presentaban una presión arterial de  $100 \pm 2$  mm Hg mientras que los deficientes de KCC3 eran de  $118 \pm 2$  mm Hg (66). El mecanismo por el cual aumenta la presión no se conoce detalladamente pero se puede correlacionar con la expresión y actividad de KCC3 en células de músculo liso vascular o en riñón, lugares cruciales para la regulación de la presión arterial. Estos datos fueron confirmados por otro estudio del mismo grupo ahora a la cabeza de Rust en el 2006, donde se analizaba más a fondo la génesis de la hipertensión en los ratones deficientes de KCC3. Un hallazgo interesante fue el aumento significativo de la  $[Cl^-]_i$  en células de músculo liso vascular en los ratones sin actividad de KCC3 aunque

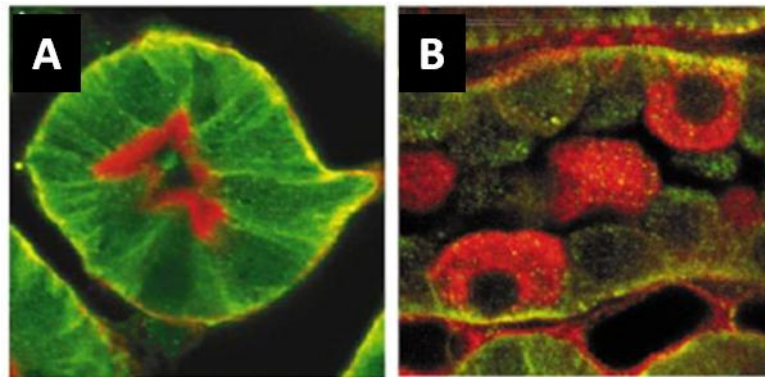
con una contractilidad normal. Algo interesante analizado en este estudio fue el efecto de sustancias vasoactivas sobre la presión arterial en estos ratones. En los que no se encontraron diferencias en comparación con el ratón silvestre ante estímulos vasoconstrictores o vasodilatadores, confirmando que el aumento en la presión arterial no debía ser atribuido a cambios en la reactividad vascular. Para buscar si el origen de la hipertensión era dado por el sistema renal examinaron los niveles de aldosterona en plasma, encontrando esta hormona moderadamente aumentada en los ratones deficientes de KCC3 y midieron también los niveles de mRNA para renina así como los niveles de  $K^+$  y  $Na^+$  plasmático sin encontrar diferencias en los dos grupos. Por otro lado observaron niveles elevados de epinefrina y norepinefrina en orina, lo que se relaciona directamente con niveles elevados de catecolaminas circulantes. Estos incrementos son el resultado de un aumento en el tono simpático y esta activación es el componente principal que lleva a una elevada presión arterial (1).

En el 2007 el grupo de Delpire también mostró un análisis de la neuropatía periférica de los ratones deficientes para KCC3. La explicación propuesta fue el hinchamiento axonal exagerado además de alargamiento de los nervios periféricos donde reportaron una acumulación de fluido periaxonal como el defecto más distinguible, confirmando así el papel de KCC3 en la regulación de volumen celular (67).

#### **KCC4**

Al igual que KCC3, KCC4 fue identificado por Mount y cols. al analizar ESTs aislados de riñón de humano y de ratón. En su trabajo encontraron que la medida del gen completo de KCC4 es 4237 pb con regiones sin traducción o UTR 5' de 165 pb y un UTR 3' de 622 pb. Este gen presenta tres codones de inicio en los cuales se puede dar el inicio de la transcripción resultando en proteínas de 1150, 1141 o 1135 aa de longitud. Al menos dos transcritos de estos fueron detectados por medio de la técnica de Northern blot, lo que explica la generación de isoformas por empalme alternativo. KCC4 conserva un alto porcentaje de identidad con los otros miembros de la familia; es así como comparte 71% de identidad con KCC2,

66% con KCC1 y con KCC3. Para la localización génica este trabajo empleó la técnica de mapeo por análisis de hibridación, mostrando que KCC4 está ubicado en el cromosoma 5 (61). La distribución en tejidos de KCC4 se ha abordado buscando niveles de expresión de RNAm, los ensayos mostraron su presencia en varios tejidos con una expresión predominante en corazón y riñón pero también en músculo, cerebro y pulmón. La localización en el riñón de KCC4 ha sido estudiada por varios grupos. En el 2002 el trabajo de Boettger y cols. demostró, por medio de inmunofluorescencia, la presencia de KCC4 en la membrana basolateral de células alfa-intercaladas donde se coexpresa con la bomba de protones de localización apical y se regula el estado ácido-base de la célula (Figura 6A). Sin embargo, también se observó KCC4 en túbulos proximales (Figura 6B) (7).



**Figura 6. Inmunolocalización de KCC4 en el riñón.** A) Marcaje de KCC4 en túbulos proximales (marca verde), el borde en cepillo de túbulo proximal es reconocido por la localización de Faloidina (marca roja). B) Las células alfa-intercaladas se reconocen por la presencia de ATPasa de protones en la membrana apical de la célula (marca roja) y de KCC4 en la membrana basolateral (marca verde). Adaptado de Boettger 2002 (7).

Otro aporte importante sobre la localización de KCC4 en el riñón provino del trabajo de Velázquez y Silva en el 2003. Aquí además de la clonación del cotransportador también demostraron la localización de KCC4 en riñón de conejos. Empleando la técnica de Northern blot, encontraron expresión de KCC4 en diversos órganos principalmente colon, corazón, pulmón y riñón. Mediante inmunofluorescencias se demostró que KCC4 se expresa en las membranas basolaterales de los túbulos proximales, se detectó alguna señal en asa de Henle y además en conducto colector. El hallazgo más interesante y que no había sido indagado hasta ese momento fue la inmunotinción de túbulos contorneados

distales, específicamente de membranas apicales, aunque no de membranas basolaterales, lo que deja abierta la pregunta sobre el papel de KCC4 en este punto de la nefrona (68).

Funcionalmente la primera caracterización de KCC4 demostró meticulosamente que este cotransportador comparte las características de la familia de los KCCs (47). Usando el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* se hizo una comparación detallada de la función de KCC1 y KCC4. En condiciones de isotonicidad no se presentó captación de  $\text{Rb}^+$  radioactivo, sin embargo cuando los experimentos se realizaron en condiciones de hipotonicidad, los ovocitos que habían sido inyectados con RNAc de KCC4 mostraban captaciones significativamente mayores indicando que tenía lugar un cotransporte de  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ . En cuanto al perfil de inhibidores en este trabajo se probó el efecto de diuréticos de asa como furosemida y bumetanida, encontrando inhibición máxima de la función a concentraciones cercanas 2 mM. La sensibilidad a DIOA, un compuesto que inhibe de manera no selectiva el transporte de  $\text{Cl}^-$ , se midió con ensayos de captación en presencia de 100 mM de este compuesto, resultando en una significativa reducción en el cotransporte a través de KCC4. Se empleó también un inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP1), la caliculina A, y como discutiremos más adelante, este dato proporcionó una idea acerca del papel del estado de fosforilación en la regulación de la actividad de los KCCs. Estos hallazgos demuestran que este cotransportador comparte similitudes en sensibilidad a algunos compuestos al igual que el resto de los miembros de la familia de los KCCs.

Los primeros resultados que asociaron a KCC4 con un evento fisiológico, fueron los obtenidos por Boettger en el 2002 donde describieron el ratón deficiente ( $\text{KCC4}^{-/-}$ ) de este cotransportador. El ratón  $\text{KCC4}^{-/-}$  mostró pérdida severa de la audición, que aparecía progresivamente después del nacimiento. La morfología histológica en general era normal cuando se comparaba con el ratón silvestre, la diferencia radicaba en que los animales deficientes de KCC4 perdían las células ciliadas de la cóclea basal, implicadas en la audición de altas frecuencias. En estos animales también se pierde el órgano de Corti en las zonas basales, aunque

en las zonas apicales algunas células ciliadas sobreviven lo que permite un pequeño porcentaje de audición residual. Un hallazgo que se analizó en el trabajo de Boettger fue la presencia de acidosis tubular renal en los ratones  $KCC4^{-/-}$ . Estos ratones mostraron un defecto en la capacidad del riñón para acidificar la orina, lo que resultaba en acumulación de ácido en el plasma. A este respecto se analizó el pH urinario de los animales y encontró que era significativamente más alcalino en comparación con los ratones silvestres y en consecuencia desarrollaban acidosis metabólica compensada (7). Considerando lo anterior y dada la expresión de  $KCC4$  específicamente en la membrana basolateral de las células alfa-intercaladas del conducto colector, se propuso la participación fisiológica de  $KCC4$  en la secreción de protones en este tipo celular. Para que estas células logren llevar a cabo correctamente la función de secreción de protones a la orina, es necesario sacar iones  $Cl^{-}$  por el lado basolateral, para así mantener activo al intercambiador basolateral de  $Cl^{-}/HCO_3^{-}$  y que de la misma forma también permanezca activa la bomba apical de protones. Además se conoce que los cotransportadores de  $K^{+}:Cl^{-}$  son capaces de transportar amonio ( $NH_4^{+}$ ) en lugar de  $K^{+}$ ; sugiriendo que  $KCC4$  es uno de los actores principales en el metabolismo renal ácido-base.

### **Mecanismos de Regulación de los KCCs**

Diversos estudios funcionales han caracterizado algunas de las señales que activan o inhiben la función de los KCCs. Es conocido que la acción de moléculas oxidantes activa a los cotransportadores de  $K^{+}:Cl^{-}$ . Entre ellos, en primer lugar se encuentra la NEM, compuesto que se agrupa dentro del tipo “tiol” y se une a ciertas regiones no conocidas del transportador logrando modificarlo y activarlo sin importar la tonicidad del medio al que están expuestas las células (69). También se conoce una variedad de oxidantes que estimulan la función de los KCCs como lo son:  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno), diamida, hidroxilamina y  $NO_2$  (dióxido de nitrógeno) entre otros y todos probados en eritrocitos de varias especies entre ellas humano (12).

Los sistemas de transducción de señales que terminan en un cambio postraducciona del transportador y que son activados por estímulos como las hormonas o los factores de crecimiento representan los factores principales para entender la regulación de la función de estas proteínas. Los primeros trabajos que intentan explicar cómo se regula la función de los KCCs se hicieron aún cuando no se conocían las proteínas responsables de este tipo de cotransporte. Aquellos trabajos, liderados por Jennings y cols. en 1990, postulaban la idea de un modelo en el que el cotransporte de  $K^+Cl^-$  estaba siendo activado por la defosforilación mediada por una fosfatasa de serinas y treoninas, probablemente la PP1a, en contraparte se inactivaba por una cinasa de serinas y treoninas cuya característica principal tenía que ser que fuera sensible a los cambios de volumen para así activar los mecanismos correspondientes; Estos estudios fueron realizados primordialmente en eritrocitos de conejo (70). El mismo grupo mostró también la importancia de la defosforilación en la correcta activación del cotransporte de  $K^+Cl^-$  usando el inhibidor de la PP1a, la caliculina A. Sus experimentos mostraron una disminución promedio en el transporte del 82%, incluso cuando las células sufrían algún proceso de hinchamiento después de ser expuestas a hipotonicidad. Efectivamente el cotransporte de  $K^+Cl^-$  también se inhibió en eritrocitos que, aunque habían sido expuestos a NEM, y al igual que la hipotonicidad es un estímulo activador, estaban en presencia de la caliculina A (71).

Kaji y cols. también confirmaron esta evidencia de manera indirecta usando ácido okadaico por su conocida acción como inhibidor de las proteínas fosfatasas PP1a (1  $\mu$ M) y PP2a (1 nM). Este trabajo muestra una contundente inhibición del cotransporte de  $K^+Cl^-$  y por consiguiente, un retraso en la respuesta al hinchamiento de los eritrocitos de humano, postulando entonces la inhibición mediada por fosforilación de la proteína encargada de este transporte gracias a que la PP1a se encontraba inhibida por el compuesto (72). De otra forma pero con el mismo objetivo, se ha estudiado el cotransporte de  $K^+Cl^-$  en presencia de la estaurosporina, un inhibidor de las cinasas de serina y treonina. Los resultados mostraron la existencia de una cinasa sensible a estaurosporina que inhibe a las proteínas fosfatasas inhibiendo a su vez a las proteínas responsables del

transporte de  $K^+$  y  $Cl^-$ , aunque por la poca especificidad de este compuesto no se podía establecer un acercamiento más fino a la o las cinasas responsables en primera instancia (73).

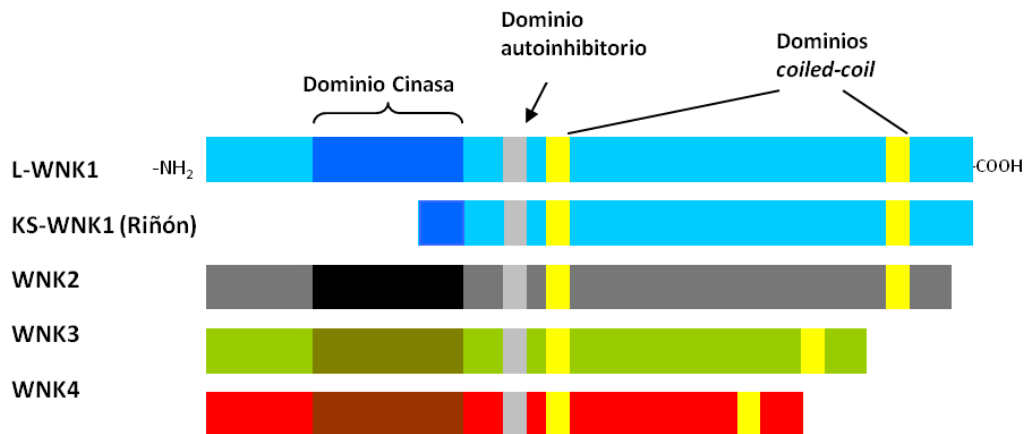
Estos estudios fueron el preámbulo para que se empezara la búsqueda de las cinasas responsables de esta fosforilación. Estudios recientes de nuestro y otros grupos importantes en el ámbito de los cotransportadores han mostrado evidencia importante de la participación de la familia de cinasas de serina y treonina conocidas como WNK en la regulación de los cotransportadores SLC12A, sugiriendo fuertemente que dichas cinasas están implicadas en la coordinación de la función de estas proteínas transportadoras.

## **Cinasas WNK**

Las WNKs forman parte de un grupo de cinasas de serina y treonina, cuyo primer miembro en ser identificado fue la WNK1, en el año 2000 por Xu y cols. (74). Fueron llamadas así debido a que son cinasas que carecen de la lisina catalítica en el subdominio II, característica de otros miembros de la superfamilia de cinasas de serina y treonina, por lo que la proteína recién identificada recibió el nombre de WNK1 por sus siglas en inglés (*With No lysine [K]*), que hace referencia a la ausencia de esta. A partir de entonces 3 miembros más de la familia fueron identificados: WNK2, WNK3 y WNK4 (Figura 7), los cuales carecen igualmente de la lisina en el subdominio II del núcleo catalítico (75). Las WNKs participan en la regulación de varios procesos, como el balance electrolítico, la señalización celular, la supervivencia, la proliferación y el desarrollo de órganos. Estas cinasas pueden interactuar físicamente o a través de fosforilación (76-77). La expresión de las WNKs en tejidos es bastante diversa llegando a decirse que presenta expresión ubicua y se ha visto que existen diferentes formas por



empalme alternativo de exones con expresión específica para cada tejido.



**Figura 7. Estructura de las WNKs.** Dominios proteicos de los cuatro miembros de la familia de las WNKs. Adaptada de San Cristobal 2008(5).

Los cuatro miembros de las WNKs poseen un dominio catalítico altamente conservado, con aproximadamente 85-90% de similitud de la secuencia. También poseen un dominio autoinhibitorio, que puede suprimir la actividad de cinasa, y numerosos motivos de interacción proteína-proteína, que incluyen de uno a dos dominios *coiled-coil* y múltiples motivos ricos en prolina. Fuera de los dominios/motivos conservados, los aminoácidos entre los miembros de la familia divergen (Figura 7) (5).

### Regulación de los KCCs por WNK3

El gen que da origen a WNK3 en humano se encuentra ubicado en el cromosoma X y consiste de 24 exones que abarcan 165 Kb. La proteína está compuesta por 1800 aminoácidos y presenta expresión ubicua aunque con más abundancia en cerebro y riñón. El primer estudio que mostró la expresión de WNK3 fue el llevado a cabo por Holden y cols. en el 2004 donde principalmente describen la clonación de esta cinasa. Aprovechan la técnica de PCR para definir los tejidos que expresan esta cinasa con cebadores específicos para alinearse el exón 18a o 18b en la secuencia de WNK3, exón que discrimina entre las diferentes isoformas de la cinasa. Usando el exón 18a se detectaron niveles en

cerebro, pulmón, placenta, hígado, páncreas y riñón. La determinación con el exón 18b mostró una expresión específica de cerebro de la isoforma que posee este exón (78). La presencia de la proteína fue observada después en dos estudios que han sido claves para la comprensión del papel de esta cinasa. El estudio de Kahle en el 2005 determinó la expresión de WNK3 en cerebro, describiéndola como la más altamente expresada en este tejido entre las cinasas de la familia de las WNKs. En su estudio los ensayos de hibridización *in situ* revelaron una importante expresión en hipocampo y giro dentado, al igual que núcleos supraóptico y supraquiasmático. La expresión de WNK3 es regulada con el estado de desarrollo, es así como a los pocos días postnatales está casi ausente, empezando a aparecer a los 21 días postnatales. Estos datos de expresión resultan interesantes porque WNK3 en este tejido comparte patrones con el cotransportador específico de neuronas KCC2. El trabajo también mostró detalladamente la expresión de WNK3 en otros epitelios secretores, usando inmunofluorescencias de cortes de ratón se observó la expresión de la cinasa en ducto pancreático y ducto biliar y en otros tejidos como tracto gastrointestinal específicamente estómago e intestino delgado (79). La expresión de WNK3 también corresponde con el patrón de expresión de KCC4. En el riñón se demostró la presencia a nivel proteico de esta cinasa en el estudio de Rinehart en el 2005 quien, usando anticuerpos específicos para reconocer a WNK3 en inmunofluorescencias, encontró que se expresa a lo largo de toda la nefrona, con una mayor expresión en túbulo contorneado proximal y la porción ascendente del asa de Henle y con más bajo nivel en túbulo distal y conducto colector (80).

La función de WNK3 y su participación en la regulación de los cotransportadores de la familia SLC12 ha sido estudiada en diferentes modelos. Empleando ovocitos de *X. laevis* se ha evaluado la función de cada uno de los cotransportadores al coinyectarlos con WNK3 silvestre y con una variante denominada WNK3-D294A, que presenta una mutación puntual que elimina su actividad cinasa. En el caso del cotransportador NCC, la coexpresión con WNK3 incrementa de manera significativa su actividad y a su vez la expresión del NCC en la membrana del ovocito. La mutante WNK3-D294A produce el efecto contrario;

es decir, reduce la actividad de NCC (80). De manera muy similar a lo observado en NCC, la actividad de NKCC1 y NKCC2 aumenta cuando se coexpresan con WNK3 silvestre, sin embargo la WNK3-D294A no inhibe la función. La regulación de estos se ha asociado al estado de fosforilación del cotransportador mediado por WNK3 (79).

Muchos de estos resultados se corroboran en el estudio de Cruz-Rangel del 2011 donde analizamos el efecto de las diferentes isoformas de WNK3 sobre la actividad de los cotransportadores SLC12. Nuestro trabajo muestra que las 4 isoformas muestran un papel activador sobre NCC y NKCCs (81). Por otro lado el efecto de la presencia de la cinasa WNK3 sobre los KCCs fue descrito a detalle en el trabajo de De los Heros en el 2006, quien mostró que aunque los ovocitos inyectados con RNAc de los KCCs fueran incubados en condiciones de hipotonicidad, que resultaría en activación de la función de estos cotransportadores. Se observó que en presencia de WNK3, esta actividad se reduce de un 80 a 98%. La cinasa logra inhibir la función de KCC2 en isotonicidad. En este trabajo se muestra un hallazgo interesante cuando en lugar de usar la WNK3 silvestre se usa la que no tiene función cinasa, es decir la WNK3-D294A. En condiciones de hipotonicidad no hay efecto sobre la actividad del cotransportador en comparación de cuando se inyecta solo el KCC, es decir el control; sin embargo en isotonicidad, condición donde se encuentran inactivos los KCCs la presencia de esta cinasa carente de función hace que la actividad aumente cientos de veces en comparación con el control (82). En el estudio de Cruz-Rangel se confirma la interacción de WNK3 con los KCCs al probar el efecto de las diferentes isoformas de la cinasa con los cuatro KCCs y sus isoformas y constatar el efecto inhibitorio sobre estos cotransportadores (81).

### **Regulación por SPAK/OSR1**

Las cinasas SPAK y OSR1 (por las siglas en inglés: (Ste-20 related proline-alanine-rich kinase y Oxidative stress response 1) comparten 66% de identidad en sus secuencias de aminoácidos y poseen una región carboxilo corta y altamente conservada, la cual se ha demostrado que constituye un dominio crítico para la

interacción con los motivos RFxV de diversas proteínas involucradas en sistemas de transporte membranar, como los son los cotransportadores electroneutros (83)

SPAK y OSR1 pertenecen al grupo de las cinasas STE-20 (84). El gen que codifica para SPAK fue clonado a partir de una línea celular de páncreas de rata. Se identificó por primera vez en un estudio en el que se analizó la expresión de cinasas que intervienen en el desarrollo de células  $\beta$  pancreáticas (85). SPAK es una proteína de 547 aminoácidos que pesa 55 kDa, se encuentra expresada en diversos tejidos en humano, presenta un dominio catalítico cinasa en el extremo amino terminal perteneciente a la subfamilia VI de las cinasas Ste-20 (86). Esta misma región de la proteína presenta un dominio rico en residuos de aminoácidos de tipo prolinas y alaninas al que se le denomina caja PAPA. Estudios en levaduras y en células de mamífero demuestran que estas cinasas participan en la regulación de las cinasas del tipo MAPKKK, fosforilándolas y mediando así la activación de estas en respuesta a estrés, particularmente a través de la vía de JNK (Janus cinasas). Por medio de un análisis de las secuencias primarias de aminoácidos del genoma humano completo, se pudo dilucidar que en NKCC1 y 2 y en KCC3 se encuentra una secuencia consenso que actúa como motivo de unión para SPAK y se encuentra definida como: [R/K]Fx[V/I]xxxxx donde x representa cualquier aminoácido (87). Teniendo en cuenta estos sitios de interacción con SPAK presentes en los cotransportadores electroneutros acoplados a Cl<sup>-</sup>, se ha dirigido especial atención hacia el entendimiento de la manera en que esta cinasa podría estar mediando eventos que terminarían en la activación o inactivación de los mismos. Es así como se encontró que la sobreexpresión de SPAK causa un significativo incremento en la actividad de NKCC1 y por el contrario, una SPAK mutante catalíticamente inactiva inhibe esta activación, lo que resulta en la disminución de la fosforilación del cotransportador (88). Por otro lado al analizar la actividad de este cotransportador en presencia de la cinasa AATYK1 y SPAK se observó el efecto contrario, no obstante cuando se realizó la mutación sobre esta cinasa del sitio de interacción con PP1 nuevamente se presentaba una activación. Es así entonces que cuando se previene la unión de la PP1 no se presenta el evento de defosforilación, aparentemente necesario

en la regulación de la actividad del cotransportador. Así que la defosforilación de SPAK por parte de PP1 es necesaria y crítica en la activación o inactivación para el control de la concentración intracelular de cloruro (89). De la misma forma en nuestro grupo se demostró que la activación de NKCC2 mediada por la concentración de cloruro intracelular requiere la interacción entre WNK3 y SPAK (90).

Diversos trabajos han postulado a las WNKs como cinasas sensibles a cambios en la tonicidad extracelular y a la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup>. Esto mediado por su asociación con SPAK y OSR1 que al final servirán como efectores de la fosforilación sobre los cotransportadores electroneutros, dándose una respuesta efectiva a los cambios de volumen celular y regulando la concentración de Cl<sup>-</sup> al interior de la célula. Esa respuesta es el resultado de la fosforilación /defosforilación de sitios importantes en los cotransportadores SLC12A. Específicamente en los KCCs la fosforilación implica inhibición, mientras que la defosforilación favorece la activación. Un estudio importante para entender la regulación por fosforilación y donde fue demostrada bioquímicamente fue propuesto por Rinehart y cols. en el 2009. La técnica de SILAC (por sus siglas en inglés *stable isotope labeling of aminoacids in cell culture*) les permitió la cuantificación de cambios dinámicos en la fosforilación de KCC3. Al pasar de isotonicidad a hipotonicidad medían el porcentaje absoluto de fosforilación de aminoácidos que pudieran ser blancos de para este cambio postraduccional. El hallazgo importante fue la identificación de dos sitios de fosforilación que en este trabajo se postularon como *únicos* en la regulación de KCC3 para restablecer el volumen celular después del hinchamiento. El ensayo se hizo tanto en células HEK-293 que expresan induciblemente y de forma estable a KCC3, como en eritrocitos que de forma endógena también lo expresan. Las treoninas 991 y 1048 se defosforilan en hipotonicidad resultando en un efecto cooperativo sobre la función de KCC3 activándolo, según este grupo, hasta el máximo de función.

Los sitios aceptores de fosforilación y los motivos que los rodean son altamente conservados en toda la familia de los KCCs, aunque no corresponden a

un motivo de fosforilación para una cinasa en específico al compararlos con sitios previamente reportados. La sustitución de estas treoninas por alaninas imita la desfosforilación mostrando una elevada función aunque la célula se encuentre en isotonicidad, siempre y cuando estén cambiados los dos sitios (91). Estos hallazgos juntos han puesto a la fosforilación a través de proteínas cinasas como las WNKs, como un mecanismo importante en la regulación molecular de los KCCs. En condiciones de hipotonicidad, donde el volumen de la célula aumenta, la respuesta es la *desfosforilación* de estos cotransportadores, que al activarse ayudan a que la célula regrese al volumen normal. En el caso contrario, durante isotonicidad o hipertonicidad se desencadena una cascada de señales que concluye con la *fosforilación* de los KCCs, inactivándolos.

### **Los KCCs y su relación con el riñón**

Hacia la década de los ochentas surgieron los primeros estudios sobre la fisiología del transporte de iones en la nefrona. La interpretación de los datos obtenidos llevó a postular la existencia de un movimiento electroneutro de  $K^+$  y  $Cl^-$  a través de las membranas celulares a lo largo de la estructura de la nefrona, principalmente en túbulo proximal (6, 92-93). Sin embargo en otras porciones de la nefrona sólo hasta hace poco tiempo se ha considerado al cotransporte de  $K^+:Cl^-$  como importante para la correcta reabsorción de iones por parte de los túbulos. Hoy conocemos que este movimiento se da por medio de los KCCs. La presencia de estas proteínas en el riñón fue demostrada primero a nivel de RNAm. El transcrito para KCC1 se demostró en lisados de riñón humano, de rata y de conejo (45). Debido a que su patrón de expresión es ubicuo, se ha limitado el estudio de su función fisiológica renal y no ha sido visto a nivel proteico en este órgano. KCC3 en sus diferentes isoformas se encontró fuertemente expresado en riñón en el estudio de Mercado y cols. tanto a nivel de transcrito como a nivel proteico (8). Con respecto a KCC4, el análisis de Boettger y cols. demuestra sin duda la presencia de este cotransportador en túbulo proximal y células alfa-intercaladas del conducto colector (7).

Para el mejor entendimiento de la función renal de los KCCs a continuación se describen algunas las funciones del riñón con particular énfasis en las que por su localización estarían particularmente involucrados los KCCs.

## **El riñón**

Es un órgano de vital importancia debido a que de su correcto funcionamiento depende la homeostasis del organismo, sus principales funciones son:

- Filtración: removiendo productos metabólicos de desecho y toxinas.
- Regulación: promoviendo el balance de líquidos, electrolitos y ácido-base.
- Producción y regulación hormonal: eritropoyesis, vitamina D, metabolismo de calcio y regulación de la presión sanguínea.

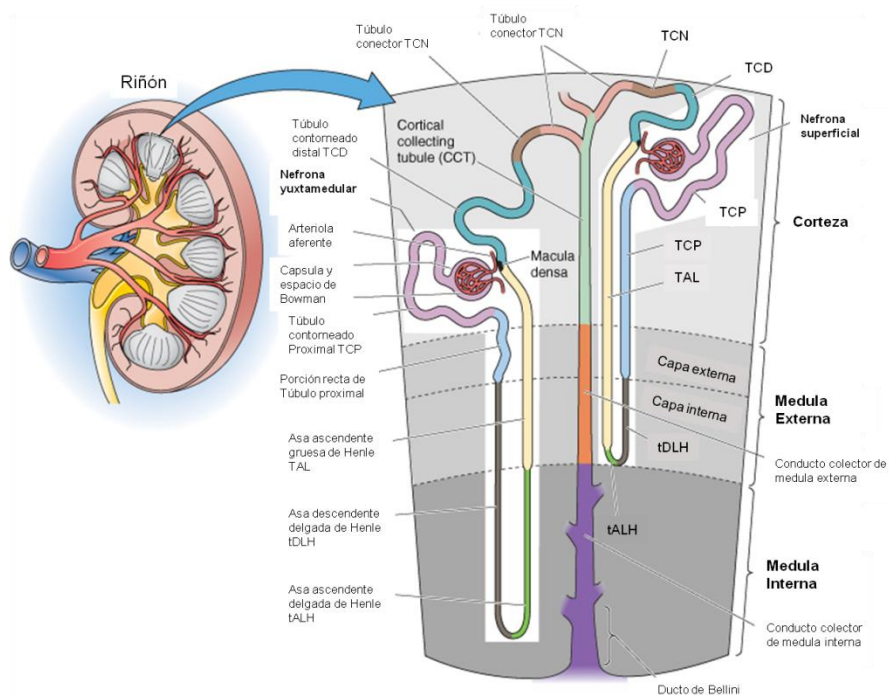
El riñón es un órgano par que se ubica en la región retroperitoneal que va desde la doceava vértebra torácica hasta la tercera vértebra lumbar. Cada riñón se encuentra recubierto por una cápsula fibrosa y la vía de entrada para vasos sanguíneos y nervios se conoce como hilio renal. Un corte sagital del riñón muestra dos capas básicas la corteza que se observa como una zona granular en la parte más externa y la médula una región más fibrosa en la zona interna (Figura 8). Las características de estas zonas son importantes para la realización de protocolos de microscopía y obtención de proteínas para análisis, porque demarcan perfectamente las zonas de la nefrona que se encuentran ahí distribuidas. La nefrona es la unidad funcional del riñón; cada uno contiene alrededor de un millón de estas. La nefrona está constituida por varios componentes entre los que destacan túbulos y vasos sanguíneos cuya finalidad es la filtración, reabsorción y secreción de metabolitos y toxinas respectivamente para al final producir alrededor de 1-2 L de orina cada 24 horas, originado de filtrar el 20% del flujo plasmático renal es decir 125 ml/min. La nefrona se inicia en el

glomérulo (Figura 8), estructura formada por un conglomerado de capilares envueltos en una organización conocida como cápsula de Bowman, en este espacio están dispuestas las arteriolas aferente y eferente, además de los capilares glomerulares. Esta conformación es la responsable de generar el líquido conocido como *ultrafiltrado glomerular*, cuya composición es idéntica a la del plasma, con excepción de las macromoléculas como albúmina, globulinas y fibrinógeno. Los capilares en el glomérulo se diferencian de otros por que presenta 3 capas: el endotelio vascular fenestrado, una membrana basal y una capa de podocitos. La función de estas capas principalmente es filtrar y prevenir el paso de proteínas plasmáticas.

El siguiente segmento es el túbulo contorneado proximal (TCP), que se divide en tres regiones S1, S2 y S3. Histológicamente la membrana apical (luminal) de esta región muestra una forma descrita como “borde en cepillo”, esta distribución asegura magnificar el área de reabsorción. En el TCP se lleva a cabo alrededor del 70% de la reabsorción del filtrado glomerular. En esta zona se expresan transportadores como los transportadores de glucosa (GLUTs) y cotransportadores, entre los que se encuentran los de  $\text{Na}^+$ /glucosa (SGLUT), KCC3 y KCC4, además de diversos transportadores de  $\text{Na}^+$  por lo que es una zona importante de reabsorción de este ion.

Avanzando en la nefrona se encuentra el asa de Henle que se divide en dos porciones, una parte descendente delgada donde sólo se reabsorbe agua y una parte ascendente gruesa totalmente impermeable al agua donde se expresan fuertemente transportadores que se dedican a la reabsorción de sal. Esto hace que sea el sitio por excelencia de concentración de la orina que al final tendrá también un efecto en la concentración plasmática de iones y por lo tanto en su osmolaridad.





**Figura 8. Estructura del riñón y la nefrona.** Adaptado de Boron y Boulpaep, Medical Physiology. 2009.(2)

El asa de Henle termina en una estructura conocida como mácula densa, punto que divide la nefrona en proximal y distal, y donde se lleva a cabo una importante función de autorregulación o mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular. Está compuesta por células especializadas que interactúan por su localización entre las arteriolas aferentes y eferentes, y se encarga de determinar o sensor la llegada de cloruro de sodio (NaCl). Este estímulo controla la resistencia de las arteriolas renales modificando la presión capilar glomerular, lo que aumenta o disminuye la filtración glomerular. Dicho mecanismo proporciona una regulación adecuada de la reabsorción de sal en la nefrona proximal, mecanismo con el que no cuenta la nefrona distal.

La nefrona distal consta en primera instancia del túbulo contorneado distal (TCD) (Figura 8). Esta sección comienza en la mácula densa y termina en la transición al túbulo conector. El TCD se divide en TCD1 y TCD2, que son responsables de alrededor del 5% de la reabsorción del filtrado glomerular y está dada en la primera porción por el cotransportador NCC y en la segunda porción por el canal epitelial de  $\text{Na}^+$  (ENaC) y NCC. Después del túbulo conector se

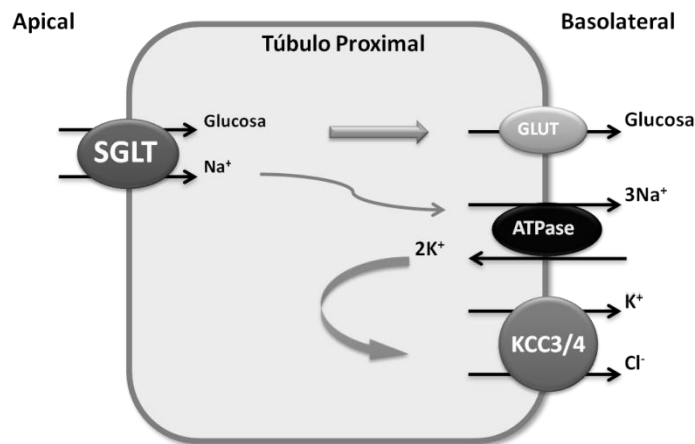
encuentra una porción de la nefrona llamada conducto colector (CC) que se encarga de la reabsorción final de sal, así como de mantener el equilibrio ácido-base. Este segmento está compuesto por dos tipos morfológica y funcionalmente diferentes de células: las células intercaladas y células principales. Las células principales expresan en la membrana apical al canal epitelial de sodio ENaC y canales de potasio, por lo que su función es la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y la secreción de  $\text{K}^+$ . Las células intercaladas se subdividen, a su vez, en dos subpoblaciones celulares, las alfa intercaladas y las beta intercaladas. Las primeras se encargan de la secreción de protones ( $\text{H}^+$ ) por la fuerte expresión de la bomba de  $\text{H}^+$  (ATPasa de  $\text{H}^+$ ) y es donde también se expresa, en la membrana basolateral, KCC4. El segundo tipo celular participa en la secreción de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) además de la reabsorción de sal y la secreción de  $\text{K}^+$ .

### **Manejo de la glucosa por el riñón.**

La glucosa plasmática no se encuentra unida a proteínas u otras macromoléculas por lo que puede ser filtrada libremente por el glomérulo. Es así como el esta estructura en un individuo sano filtra alrededor de 180 gramos de glucosa por día, lo que representa una enorme cantidad desaprovechada en orina. Es por ello que la glucosa debe ser reabsorbida en su totalidad en las primeras porciones de la nefrona (94) (4). Normalmente la glucosa se presenta en plasma en concentraciones que van desde 70-110 mg/dl pero cuando se supera la concentración conocida como “umbral”, es decir 180 mg/dl la glucosa empieza a aparecer en orina, proceso que recibe el nombre de glucosuria. El transporte de glucosa ocurre de forma transcelular esto significa que necesita una proteína transportadora secundaria de Na:glucosa, que funciona al seguir el gradiente electroquímico para el transporte de sodio generado por la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa de la membrana basolateral (95).

El proceso de reabsorción de glucosa se da casi en su totalidad en el TCP, el segmento S1, este se caracteriza por que es el punto al que le llega un flujo mayor de glucosa por lo cual el transporte se ha especializado mostrando baja afinidad por la glucosa. Mientras que el segmento final del TCP S3 es al contrario;

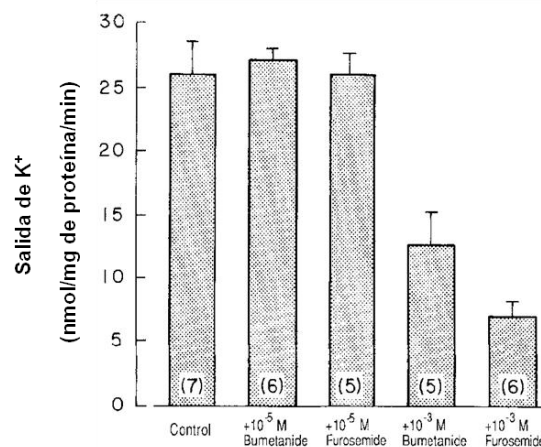
ya en este lugar llega muy bajo flujo de glucosa, por esta razón el transporte se ha especializado en presentar alta afinidad. En ambas porciones la glucosa se mueve desde la luz del túbulo hacia el interior de la célula a través del cotransportador de Na<sup>+</sup>/glucosa (SGLT). Para que este transporte sea adecuado es necesario llegar a una baja concentración de Na<sup>+</sup> en el interior de la célula en comparación con la luz tubular, para lo que se emplea la Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>-ATPasa encargada de transportar 3 iones Na<sup>+</sup> por cada 2 de K<sup>+</sup> (Figura 9), el paso hacia el intersticio está dado por los transportadores de glucosa pertenecientes a la familia GLUT por su nombre en inglés “glucose transporter” (GLUT1 y GLUT2) ubicados en el lado basolateral de la célula de TCP (Figura 9).



**Figura 9. Reabsorción de glucosa en el túbulo proximal.** Los transportadores SGLT se expresan en la membrana apical de la célula de TP mientras que los GLUT y KCCs se expresan en la basolateral donde colocalizan con la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Adaptado de Mather, 2011 (4)

En los segmentos S1 y S2 se expresa abundantemente el cotransportador SGLUT2, este es el responsable de la reabsorción de más del 90% de la glucosa. Presenta como característica principal la alta capacidad de transportar glucosa con una baja afinidad. Por el contrario el SGLUT1 expresado mayormente en el segmento S3 tiene alta afinidad por la glucosa, lo que correlaciona con las particularidades de la reabsorción de glucosa mencionadas antes (96) (97). Los estudios iniciales del transporte de glucosa en túbulo proximal de conejo demostraron la presencia de un transporte de K<sup>+</sup> sensible a diuréticos de asa como bumetanida y furosemida y totalmente dependiente de Cl<sup>-</sup>. Este trabajo

demuestra que una vez adicionada glucosa sobre túbulos extraídos de corteza de riñón de conejo se da el proceso de absorción de esta molécula orgánica hacia el interior de la célula. Al mismo tiempo también aumenta la tasa de ingreso de  $K^+$  que es a su vez superada por la salida basolateral de este ion; es decir, aumenta la pérdida neta de  $K^+$ . Para demostrar este proceso se extrajeron túbulos corticales y una vez preparados sobre una infusión de colagenasa se obtenían un 90% de TCP. El movimiento de  $K^+$  se midió usando microelectrodos que detectan los cambios en la concentración intracelular de este ion. Los resultados obtenidos detalladamente revelan un incremento en la concentración intracelular de  $Na^+$  que concuerda con la activación del transportador de  $Na/glucosa$ . El hallazgo más fuerte es precisamente la activación de flujos de  $K^+$  hacia el exterior de la célula, actividad que es atribuida al incremento en el volumen celular causado por la cantidad adicionada de glucosa, molécula osmóticamente activa. Los experimentos con  $Ba^{2+}$  descartan que esta salida se dé por canales que resultan fácilmente inhibidos con este ion. Además muestran que los diuréticos tipo furosemide ejercen inhibición de la pérdida de  $K^+$  sólo a concentraciones altas del fármaco como se puede ver en la figura 10 (6), lo que fuertemente sugería la presencia de un cotransporte tipo KCC para la efectiva reabsorción de glucosa.



**Figura 10. Efecto de bumetanida y furosemide sobre el flujo de  $K^+$  estimulado por la reabsorción de glucosa.** Adaptado de Avison 1988 (6).

Los hallazgos de este trabajo son sustentados por estudios más recientes que describen la función de los KCCs. Es así como el estudio de Mercado y cols. publicados en el año 2000 reporta a KCC3 con una importante localización en riñón específicamente a nivel de TCP en las membranas basolaterales desde el segmento S1 hasta S3. Por medio de experimentos donde se probaron dosis dependencia con diuréticos de asa, encontraron efecto sólo a concentraciones altas de estos fármacos (10 mM) (8), igual a la inhibición vista antes por Avison (6). Estos datos confirman no sólo la presencia de KCC3 a nivel de TCP sino también su activación generada por el hinchamiento celular subsecuente de una sobrecarga de glucosa en este punto de la nefrona.

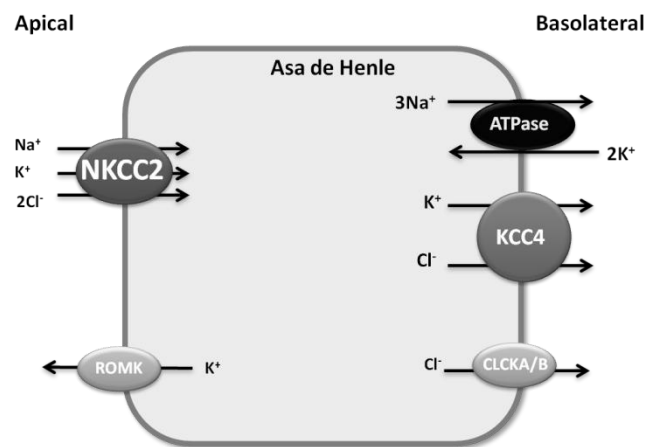
### **Manejo de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> por el riñón**

Una de las principales funciones del riñón es mantener y regular el volumen de fluido extracelular del organismo, esto se logra regulando la cantidad de NaCl que se excreta en la orina. Con una filtración glomerular normal aproximadamente son filtrados 25.500 mmol/día de Na<sup>+</sup> pero sólo una pequeña cantidad es excretada a través de la orina, lo que equivale a 1.5 Kg de sal de mesa reabsorbiéndose por día. La reabsorción de Na<sup>+</sup> (acompañada de Cl<sup>-</sup>) se realiza a lo largo de toda la nefrona pero en orden de cantidad reabsorbida, se encuentra en primer lugar al TCP seguido del asa de Henle, el TCD y al final el conducto colector. Esta reabsorción puede darse de forma transcelular y paracelular, esta última se realiza a través de las uniones estrechas entre célula y célula y está manejada por el gradiente electroquímico que se presenta al atravesar el túbulo. Para objeto de esta tesis es importante recalcar en la reabsorción transcelular que depende de diferentes proteínas transportadoras. En cada una de las regiones de la nefrona donde se observe la reabsorción de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> se encuentran diversos transportadores que facilitan este paso a través de la célula.

En la membrana apical de los túbulos proximales se expresan transportadores que acoplan el paso del Na<sup>+</sup> a una gran variedad de moléculas y solutos como la glucosa, aminoácidos, fosfatos y lactato, entre otros. También existe en esta región el intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE-3). El segundo paso es

llevado a cabo por la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa de expresión ubicua, que en conjunto con el cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  se encargan de hacer llegar el  $\text{Na}^+$  al extremo basolateral donde va a llegar al plasma nuevamente.

El líquido tubular con  $\text{Na}^+$  remanente llega al asa de Henle donde va a ser reabsorbido mayormente en la porción ascendente gruesa, lugar donde se encuentra expresado el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$  o NKCC2. Este cotransportador pertenece a la familia SLC12 representa el blanco de los fármacos conocido como “diuréticos de asa”. El mecanismo molecular de la reabsorción de sal en esta fracción de la nefrona está a cargo en primer lugar de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa. Esta bomba generando un gradiente ayuda a que el sodio entre a través de NKCC2; sin embargo, el paso total hacia el intersticio se da usando las proteínas transportadoras ubicadas en la membrana basolateral de la célula, como lo son la propia  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa y canales de cloro (CLC-KA/B) y como parte de la propuesta de esta tesis importantemente KCC4 (98) (99) (Figura 11).



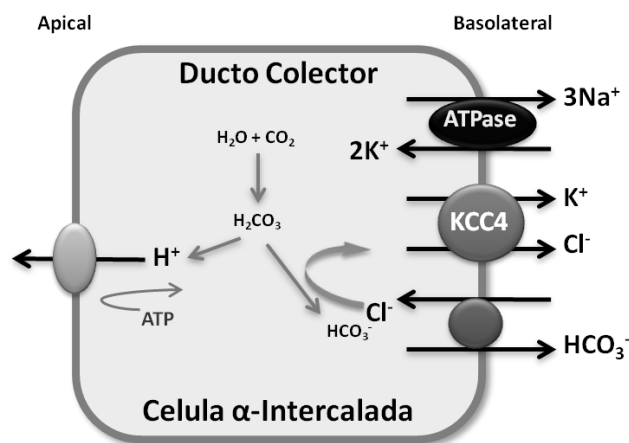
**Figura 11. Mecanismo de reabsorción de sal en la porción gruesa del asa ascendente de Henle.** NKCC2 se expresa en la membrana apical junto con el canal de  $\text{K}^+$  (ROMK) y a su vez en la membrana basolateral están KCC4 acompañado de canales de  $\text{Cl}^-$  y la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa.

## Secreción de Hidrogeniones ( $H^+$ ) por el riñón

El riñón juega un papel fundamental en la remoción de iones hidrógeno ( $H^+$ ) del organismo. Con el fin de que exista un balance entre ácidos y bases, el riñón cuenta con varios mecanismos que van desde la secreción hasta la amortiguación de estos iones que en exceso podrían resultar en daños severos. En la nefrona proximal los  $H^+$  son secretados principalmente por intercambiadores de  $Na^+ : H^+$  que funcionan por el gradiente establecido por la  $Na^+ : K^+$ -ATPasa basolateral y al mismo tiempo se da la reabsorción de bicarbonato, principal sustancia amortiguadora del plasma. En este punto al igual que en el resto de la nefrona, la anhidrasa carbónica tipo II (CAII) juega un papel fundamental en la producción del bicarbonato que será transportado al intersticio y de iones  $H^+$  cuyo destino final será la orina para ser secretados.

Las células de la nefrona especializadas en llevar a cabo la secreción activa de  $H^+$  se localizan distalmente en el conducto colector y se conocen como células alfa intercaladas (Figura 12). El proceso en esta célula se da en varias etapas, en la primera el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) que se encuentra disuelto intracelularmente debe reaccionar con el agua para formar ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ); una vez en esta forma, se disocia en iones bicarbonato que pueden ser reabsorbidos hacia el intersticio a través del intercambiador  $Cl^- : HCO_3^-$  también conocido como Pendrina (100) (101); entonces, más  $H^+$  que serán secretados por la ATPasa apical de  $H^+$ . Este proceso se acopla con el movimiento de  $Cl^-$  que debe ser recirculado para el óptimo funcionamiento del mecanismo y lo cumple KCC4 que se expresa en la membrana basolateral de estas células. La importancia de KCC4 en el control del mecanismo ácido-base ha sido demostrada por Boettger y cols. al señalar la incapacidad de los ratones  $KCC4^{-/-}$  para acidificar la orina al compararlos con los ratones con el gen normal (pH urinario:  $7.3 \pm 0.1$  vs  $6.4 \pm 0.1$ ) y correlacionando con ese dato también se acumula  $Cl^-$  intracelular en las células alfa-intercaladas. Este ratón que no expresa KCC4 muestra un fenotipo que coincide con acidosis tubular renal (7).

Otro aspecto del metabolismo ácido-base que maneja el riñón es la producción de amonio ( $\text{NH}_4$ ) o amoniogénesis y su excreción. Este proceso se da cuando en el riñón se metaboliza el aminoácido glutamina generando como resultado dos moléculas de  $\text{NH}_4$  y  $\text{HCO}_3^-$ . El  $\text{NH}_4$  producido se excreta a través de la orina y el  $\text{HCO}_3^-$  es reabsorbido hacia la sangre para su posterior uso como amortiguador, reemplazando al perdido en la titulación de ácidos no volátiles. En este proceso también es importante destacar la participación de los KCCs que son capaces de transportar  $\text{NH}_4$  en lugar de  $\text{K}^+$  cuando así se requiera (102).



**Figura 12. Mecanismo de la secreción de  $\text{H}^+$  en célula alfa-intercalada en conducto colector.** KCC4 se expresa en la membrana basolateral acompañado por el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa entre otros. En lado opuesto la bomba ATPasa de  $\text{H}^+$ .

Observando la evidencia relacionada con la localización de los KCCs en el riñón se ha sugerido su papel potencial en funciones en las que apoyarían el transporte de moléculas o iones para el funcionamiento de este órgano. Hasta ahora estas posibilidades no habían sido exploradas, al menos en modelos animales para lograr la evidencia molecular del aporte de los KCCs a la fisiología renal. Por otro lado las herramientas bioquímicas permitieron encontrar otro factor que influye directamente en la actividad de KCC3: un nuevo sitio de fosforilación. Este hallazgo es importante para entender los mecanismos de regulación de este cotransportador que serán abordados en esta tesis.



## **Justificación**

Al igual que los estudios moleculares, la actualidad de la ciencia traslacional nos proporciona datos importantes sobre la función de las proteínas a nivel fisiológico y muy poco en realidad se conoce acerca del aporte fisiológico de los KCCs en el riñón. Aunque se ha estudiado la localización de los KCCs en la nefrona aun no se ha determinado con modelos animales el papel de estos cotransportadores en diversos procesos llevados a cabo por el riñón. Además, experimentos que mostraron diferencias en la función de KCC3 con mutaciones en las treoninas 991 y 1048 imitando desfosforilación nos llevaron a pensar en la existencia de un sitio adicional que participa en la regulación de esta proteína.

## **Hipótesis**

1. Existe un tercer sitio de fosforilación importante para la activación/inhibición de KCC3 mediada por cambios en el volumen celular (hinchamiento) y la acción de proteínas reguladoras como fosfatasas y cinasas.
2. Los KCCs participan en las siguientes funciones renales:
  - a. Regulan el volumen celular en TCP cuando se presenta transporte de glucosa.
  - b. Participan en la reabsorción de sal.
  - c. mantienen un equilibrio en el estado acido-base promoviendo la eficiente salida de hidrogeniones hacia la orina.

## **Objetivo general**

Estudiar los mecanismos de regulación de los KCCs tanto molecularmente usando herramientas bioquímicas y de biología molecular, como fisiológicamente apoyándonos de los modelos animales (ratas Wistar macho y ratones C57) para obtener respuestas acerca de la actividad de estos cotransportadores en diferentes estados patológicos que permiten entender la realidad fisiológica.

## **Objetivos moleculares específicos**

1. Identificar la existencia de nuevos sitios de fosforilación en KCC3a apoyándonos en la evidencia de que KCC3a T991A/T1048A no alcanza la función del cotransportador silvestre en un sistema de expresión funcional heteróloga.
2. determinar por mapeo de sitios de fosforilación usando espectrometría de masas.
3. Demostrar la importancia de los nuevos sitios identificados por el ensayo de espectrometría de masas ante cambios en la tonicidad del medio.
4. Examinar la correlación entre la función de KCC3 y la presencia de la cinasa WNK3 y la respectiva fosforilación del cotransportador.
5. Investigar si la eliminación de estos nuevos sitios repercute en la actividad de KCC3.

## **Objetivos fisiológicos específicos**

Evaluar la expresión de los KCCs que predominan en riñón (KCC3 y KCC4) ante estímulos que comprometen la función de este órgano. Analizando la expresión a nivel de RNAm con PCR en tiempo real y el nivel de las proteínas usando Western blot, inmunohistoquímica, inmunofluorescencias.

## Metodología

En esta sección se presenta un resumen de la metodología usada en el desarrollo de esta tesis. Los protocolos más detallados se encuentran descritos en los artículos publicados presentes en la sección de resultados.

**Modelos de expresión funcional heteróloga.** Para realizar los ensayos de expresión funcional de KCC3 y KCC4 en su forma mutada en los sitios de fosforilación, se usó la inyección o la transfección de RNA o DNA complementario para que una vez, en la célula modelo de estudio, se lleve a cabo la síntesis de las proteínas a estudiar.

**Ovocitos de *Xenopus laevis*.** Los ovocitos se obtienen de ranas hembras mantenidas en bioterio en condiciones de temperatura controlada de 16°C y humedad de 65%. Los ovocitos son extraídos mediante una incisión abdominal de ranas anestesiadas con tricaina al 0.17%. Luego son incubados por 1 hora en agitación suave en solución ND96 sin calcio en presencia de colagenasa B. Los ovocitos obtenidos son lavados con ND96, desfoliculados manualmente y dejados a 16°C hasta el siguiente día cuando serán inyectados con 50 nL de cRNA a una concentración que varía de 0.2 a 0.4 µg/µL. El RNAc es transcrito in vitro usando el kit *T7 RNA polimerase Mmessage Mmachine* (Ambion, Austin, Tx) a partir de cDNA de KCC3 de humano y KCC4 de ratón. En los experimentos de coinyección se usa la misma concentración de cRNA y 0.1 µg/µL de cRNA transcrito de WNK3. Los ovocitos ya inyectados son incubados a 16°C de 48 a 72 horas en ND96 suplementado con piruvato de sodio y gentamicina. Dos horas antes del ensayo de captación los ovocitos son cambiados a isetionato de sodio que provee un medio libre de Cl<sup>-</sup>.

**Mutagénesis sitio dirigida usando PCR.** Se realiza de acuerdo a la técnica de *Stratagene*. Este sistema se usa para crear mutaciones puntuales cambiando, borrando o insertando aminoácidos. Emplea una DNA polimerasa de alta fidelidad en un sistema de PCR, el producto final es tratado con la endonucleasa de restricción *DpnI*, que actúa específicamente sobre DNA metilado

o hemimetilado, asegurando así que las cadenas molde sin la mutación sean eliminadas. Este proceso fue usado para hacer las mutaciones en los sitios de fosforilación de KCC3a, así: KCC3 T991A/T1048A y S96A/T991A/T1048A. Estas mutaciones fueron confirmadas por secuenciación y subclonadas en el vector de expresión en el que está insertada la clona silvestre hKCC3a-pGEMHE.

**Ensayos de captación.** Dos días después de la inyección, la actividad de los KCCs se determina midiendo la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  dependiente de cloro en condiciones hipotónicas (~110 mOsm) o isotónicas (~220 mOsm). Los ovocitos son pre-incubados por un periodo de 30 minutos en un medio hipotónico o isotónico libre de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en presencia de 1mM de ouabaina, que previene la activación de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa. Posteriormente son incubados a 32°C por 60 minutos en un medio hipotónico o isotónico libre de  $\text{Na}^+$ , suplementado con 1mM de ouabaina y  $1\mu\text{Ci } ^{86}\text{Rb}^+/\text{mL}$ . Cuando la captación se mide en medio isotónico, éste se prepara suplementando los medios de pre-incubación y captación con sacarosa para alcanzar la tonicidad isosmolar. Al final los ovocitos son lavados con solución de captación a 4°C y son disueltos con SDS al 10%. Finalmente se mide la captación total de  $^{86}\text{Rb}^+$  en presencia o ausencia de  $\text{Cl}^-$  como control en un contador de centelleo líquido.

**Células HEK-293.** Son una línea celular derivada de riñón de embrión humano. Son muy fáciles de crecer y transfectar por lo que son ampliamente usadas en investigación. Fueron obtenidas de ATCC (American type culture collection) cultivadas a 37°C bajo atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  en medio MEM (Sigma-Aldrich) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, penicilina-estreptomicina 50 uds/mL-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y bicarbonato de sodio 2.2 g/L. Se usaron células HEK-293 previamente transfectadas de manera estable con el plásmido pCDNA3.1 con el marco de lectura abierto de la cinasa WNK3 humana y células HEK-293 sin transfectar. Sobre ambas se hizo una transfección transitoria de KCC3a-pCMV5. El proceso de transfección se hace usando el método de fosfato de calcio o liposomas catiónicos comercialmente llamado lipofectamina 2000 (Invitrogen). Cuando las células llegan a confluencia de 80% se realiza la

transfección. Para el método del fosfato de calcio se usan 5 µg de DNAC resuspendido en CaCl<sub>2</sub> y mezclado con 150 µl de buffer HEPES-salino (50 mM de HEPES, 280 mM de NaCl y 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.05), esta mezcla se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se coloca con las células por 6 horas. Al final de este periodo de tiempo las células se lavan dos veces con PBS y luego dejadas por 48 h en medio MEM suplementado. Para el proceso con lipofectamina, se prepara el complejo lipofectamina-DNA con 2 µg de DNA disueltos en 125 µl de medio MEM sin SBF y 5µl de lipofectamina disuelta en 125 µl de MEM. Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos y se coloca en los platos con las células previamente lavadas con MEM sin SBF. La transfección ocurre en 4 horas, tiempo en el que se cambia el medio por el MEM suplementado. Después de 48 horas se lavan las células con PBS a 4°C, se remueven las células con buffer de lisis adicionado con inhibidores de proteasas y son centrifugadas para limpiar de detritos celulares que van a quedar en el fondo de los tubos.

**Modelos animales.** Para la realización de los modelos animales se usaron ratas macho de la cepa Wistar provistas por los bioterios del INCMNSZ y el INCICH, de acuerdo a los procedimientos estipulados por la comisión federal mexicana para experimentación y cuidados animales (NOM-062-ZOO-2001) y además aceptados por los comités de ética animal de las dos instituciones.

Estudiamos cinco grupos experimentales: el grupo 1 recibió una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 60mg/kg de peso, marca Sigma) (103) (104). 72 horas después de la administración del fármaco se determinó la concentración de glucosa en sangre y sólo las ratas con más de 20 mmol/L fueron consideradas diabéticas y seguidas por las siguientes cuatro semanas. Como control se usaron animales inyectados con solución de buffer de citratos y ambos grupos tuvieron acceso libre a alimento y agua. Los animales del grupo 2 fueron alimentados con una dieta baja en NaCl durante 8 días. Este modelo se realizó tanto en ratones silvestres como en ratones deficientes de WNK4 (WNK4<sup>-/-</sup> KO) descritos previamente por Castañeda-Bueno y cols. (105). Los animales fueron alimentados con 20 gramos por día de dieta baja en sal (0.01-0.02% NaCl) y agua

libre (106). El grupo 3 recibió una solución de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) durante 8 días (107) (108) y agua corriente para los animales control. Los grupos 4 y 5 son animales con dieta baja (0%) o alta (5%) de  $\text{K}^+$  respectivamente durante 8 días, los animales control de estos grupos recibieron dieta de 1.2% de  $\text{K}^+$ .

Pasado el periodo de tratamiento en cada uno de los modelos, los animales fueron anestesiados y uno de los riñones fue perfundido con solución salina y removido rápidamente para aislar corteza de medula para los ensayos de PCR en tiempo real y *Western blot*, mientras que el otro fue colocado en paraformaldehído al 4% para ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

***Western blotting.*** Para analizar la cantidad de proteína de KCC3 y KCC4 y el estado de fosforilación de KCC3 se usaron anticuerpos previamente caracterizados contra KCC3 total (8), KCC4 (109) y fosfoanticuerpos contra los sitios de KCC3: S96 (residuos 80-94), T991 (residuos 984-998) y T1048 (residuos 1041-1055) gentilmente donados por la Dra. Paola de los Heros de la unidad de proteómica de la Universidad de Dundee. Cuando la proteína proviene de riñón de animales de experimentación, el órgano se corta y separa en corteza y medula. 50  $\mu\text{g}$  del riñón son homogenizados en buffer de lisis adicionado con inhibidores de proteasas y de fosfatasas. Una vez cuantificadas estas muestras son corridas en geles de SDS-PAGE al 7.5%. El ensayo se realiza con los respectivos anticuerpos específicos.

## Resultados

Los resultados aportados durante el desarrollo de esta tesis han sido publicados en dos artículos originales incluidos a continuación donde se explica detalladamente cada resultado; por lo tanto no serán descritos en este apartado. Los artículos antes mencionados son:

- **Zesergio Melo**, Paola de los Heros, Silvia Cruz-Rangel, Norma Vásquez, Norma A. Bobadilla, Herminia Pasantes-Morales, Dario R. Alessi, Adriana Mercado, Gerardo Gamba. *N-terminal serine dephosphorylation is required for KCC3 cotransporter full activation by cell swelling*. J. Biol. Chem. 2013, 288:31468-31476.
- **Zesergio Melo**, Silvia Cruz-Rangel, Rocio Bautista, Norma Vázquez, Maria Castañeda-Bueno, David B. Mount, Herminia Pasantes-Morales, Adriana Mercado, Gerardo Gamba. *Molecular evidence for a role for K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters in the kidney*. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2013, 305: F1402-F1411.

## N-terminal Serine Dephosphorylation Is Required for KCC3 Cotransporter Full Activation by Cell Swelling\*

Received for publication, April 8, 2013; and in revised form, August 12, 2013. Published, JBC Papers in Press, September 16, 2013. DOI 10.1074/jbc.M113.475574

Zesergio Melo<sup>†1,2</sup>, Paola de los Heros<sup>§</sup>, Silvia Cruz-Rangel<sup>¶</sup>, Norma Vázquez<sup>‡</sup>, Norma A. Bobadilla<sup>‡</sup>, Herminia Pasantes-Morales<sup>¶</sup>, Dario R. Alessi<sup>§</sup>, Adriana Mercado<sup>||</sup>, and Gerardo Gamba<sup>†3</sup>

From the <sup>†</sup>Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, 14000 Mexico City, Mexico, the <sup>§</sup>Medical Research Council Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit, College of Life Sciences, University of Dundee, Dow Street, Dundee DD1 5EH, Scotland, United Kingdom, the <sup>¶</sup>División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico, and the <sup>||</sup>Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

**Background:** KCC3 lacking the two known phosphorylation sites is still regulated by cell swelling and WNK3.

**Results:** Dephosphorylation of serine 96 is necessary for full activation of the cotransporter.

**Conclusion:** Serine 96 is a third phospho-site involved in KCC3 regulation.

**Significance:** The finding of new phosphorylation sites sheds light on an increasingly complex regulation of K<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporters.

The K<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter (KCC) activity is modulated by phosphorylation/dephosphorylation processes. In isotonic conditions, KCCs are inactive and phosphorylated, whereas hypotonicity promotes their dephosphorylation and activation. Two phosphorylation sites (Thr-991 and Thr-1048) in KCC3 have been found to be critical for its regulation. However, here we show that the double mutant KCC3-T991A/T1048A could be further activated by hypotonicity, suggesting that additional phosphorylation site(s) are involved. We observed that *in vitro* activated STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) complexed to its regulatory MO25 subunit phosphorylated KCC3 at Ser-96 and that in *Xenopus laevis* oocytes Ser-96 of human KCC3 is phosphorylated in isotonic conditions and becomes dephosphorylated during incubation in hypotonicity, leading to a dramatic increase in KCC3 function. Additionally, WNK3, which inhibits the activity of KCC3, promoted phosphorylation of Ser-96 as well as Thr-991 and Thr-1048. These observations were corroborated in HEK293 cells stably transfected with WNK3. Mutation of Ser-96 alone (KCC3-S96A) had no effect on the activity of the cotransporter when compared with wild type KCC3. However, when compared with the double mutant KCC3-T991A/T1048A, the triple mutant KCC3-S96A/T991A/T1048A activity in isotonic conditions was significantly higher, and it was not further increased by hypotonicity or inhibited by WNK3. We conclude that serine residue 96 of human KCC3 is a third site

that has to be dephosphorylated for full activation of the cotransporter during hypotonicity.

The K<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporters (KCCs)<sup>4</sup> constitute a branch of the electroneutral cation-coupled chloride cotransporter family SLC12 composed of four members: KCC1 to KCC4. Following the driving force imposed by the Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:ATPase, the KCCs translocate ions from the inside to the outside of the cell participating in fundamental physiological processes such as regulatory volume decrease, trans-epithelial ion transport, and reduction of intracellular chloride concentration. Erythroid function and differentiation, cancer cell growth and invasiveness, arterial blood pressure regulation, and neuronal excitability are some of the important roles of these membrane proteins (1–3). Inactivating mutations of the *Slc12a6* gene encoding KCC3 are the cause of a complex neurological disease known as agenesis of the corpus callosum with peripheral neuropathy, also referred as Andermann syndrome (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 218000) (4–6). Moreover, in addition to reproducing this disease, the KCC3 knock-out mouse model also develops arterial hypertension (7).

The other branch of the SLC12 family is composed of the Na<sup>+</sup>-coupled chloride cotransporters, generally called N(K)CCs, that following the driving force imposed by the Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:ATPase translocate ions from the outside to the inside of the cell, thus having similar important roles as the KCCs in many physiological aspects, but in the opposite direction (1). As expected, NKCC and KCC activity is reciprocally regulated. Phosphorylation promoted by cell shrinkage, intracellular chloride depletion, or protein phosphatase inhibitors increases NKCCs and reduces KCC activity, whereas, dephosphorylation

\* This work was supported by Grants 132503 and 165815 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) (to A. M. and G. G., respectively), and by the Grant 091415 from the Wellcome Trust (to D. R. A. and G. G.).

✂ Author's Choice—Final version full access.

<sup>†</sup> This work was submitted to fulfill the requirements for a doctorate of philosophy in the Biochemical Science Ph.D. program of the Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>‡</sup> Supported by a scholarship from CONACYT-Mexico.

<sup>‡</sup> To whom correspondence should be addressed: Molecular Physiology Unit, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, 14000 Mexico City, Mexico. Tel.: 5255-5513-3868; E-mail: gamba@biomedicas.unam.mx.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: KCC, K<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter; N(K)CC, Na<sup>+</sup>-coupled chloride cotransporter; Bis-Tris, 2-(bis(2-hydroxyethyl)amino)-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; WNK, with no lysine kinase; SPAK, STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase.



associated with cell swelling, intracellular chloride accumulation, or protein phosphatases decreases NKCC function and triggers KCCs (8).

For NKCCs, a cluster of 3–5 highly conserved threonine/serine residues, localized in the N-terminal domain, has been identified as a key regulator of the cotransporter activity (9, 10). Phosphorylation of these sites by kinases SPAK and oxidative stress-responsive kinase 1 (OSR1) in response to osmotic stress increases their activity. In contrast, for the KCC branch, two threonine residues at the C-terminal domain have been shown to be critical for KCC3 activity regulation (11). Phosphorylation of these sites renders the cotransporter inactive, and it becomes active after dephosphorylation. Here we show, however, that the N-terminal domain serine 96 of human KCC3a fulfills the characteristics for a third phosphorylation site involved in regulation of this cotransporter.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Mutagenesis and Constructs**—Mutant constructs were prepared with the QuikChange mutagenesis system (Stratagene) and custom-made primers (Sigma). All mutations were confirmed by sequencing and subcloned back into the appropriate expression constructs.

**Functional Expression of KCCs**—We assessed the activity of wild type or mutant KCC3 or KCC4 using the heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocytes as described previously (12–15). In brief, mature oocytes were injected with wild type or mutant KCC3 or KCC4 cRNA at 10 ng/oocyte, and 3 days later, the activity of the cotransporter was determined by assessing the Cl<sup>-</sup>-dependent, <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake in isotonic or hypotonic conditions. cRNA for injection was transcribed *in vitro* from KCCs cDNA linearized at the 3' using the T7 RNA polymerase mMESAGE kit (Ambion). All experimental data are based on a minimum of three different experiments. Our institutional committee on animal research approved the use of *X. laevis* frogs.

**Expression and Purification of GST-tagged SPAK DA, KCC3a(1–175), and NKCC2(1–174) in Escherichia coli**—All pGEX-6P-1 constructs were transformed into BL21 *E. coli* cells, and 1-liter cultures were grown at 37 °C in LB medium (100 µg/ml ampicillin) until the absorbance at 600 nm was 0.8. Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (30 µM) was then added, and the cultures were grown for further 16 h at 26 °C. Cells were isolated by centrifugation, resuspended in 40 ml of ice-cold lysis buffer, and sonicated (Branson Digital Sonifier; ten 15-s pulses with a setting of 45% amplitude) to fragment DNA. Lysates were centrifuged at 4 °C for 15 min at 26,000 × g. The GST fusion proteins were affinity-purified on 0.5 ml of glutathione-Sepharose and eluted in buffer A containing 0.27 M sucrose and 20 mM glutathione.

**KCC3a Phosphorylation Site Mapping by SPAK**—GST-KCC3a(1–175) and GST-NKCC2(1–174) (10 µg) purified from *E. coli* were incubated with active SPAK (Carna Biosciences STLK3 (STK39), product number: 07-130) (1 µg) or kinase-inactive SPAK GST-SPAK(D212A) (1 µg) also purified from *E. coli* at 30 °C for 60 min in buffer A containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM [γ-<sup>32</sup>P]ATP (~15,000 cpm/pmol) in a total reaction volume of 25 µl. The reaction was terminated by the addition of

LDS sample buffer. Dithiothreitol (DTT) was added to a final concentration of 10 mM, and the samples were heated at 95 °C for 4 min and cooled for 20 min at room temperature. Iodoacetamide was then added to a final concentration of 50 mM, and the samples were left in the dark for 30 min at room temperature to alkylate cysteine residues. The samples were subjected to electrophoresis on a Bis-Tris 10% polyacrylamide gel, which was stained with colloidal blue and then autoradiographed. The phosphorylated GST-KCC3a(1–175) and GST-NKCC2(1–174) bands were excised, cut into smaller pieces, and washed sequentially for 10 min on a vibrating platform with 1 ml of the following: water; 1:1 (v/v) mixture of water and acetonitrile; 0.1 M ammonium bicarbonate; 1:1 mixture of 0.1 M ammonium bicarbonate and acetonitrile; and finally acetonitrile. The gel pieces were dried and incubated for 16 h at 30 °C in 25 mM triethylammonium bicarbonate containing 5 µg/ml trypsin as described previously (10, 16). Following tryptic digestion, >95% of the <sup>32</sup>P radioactivity incorporated in the gel bands was recovered, and the samples were chromatographed on a Vydac 218TP5215 C<sub>18</sub> column (Separations Group, Hesperia, CA) equilibrated in 0.1% trifluoroacetic acid in water. The column was developed with a linear acetonitrile gradient (see Fig. 2B, diagonal line) at a flow rate of 0.2 ml/min, and fractions of 0.1 ml were collected.

**Phospho-peptide Sequence Analysis**—Isolated phospho-peptides were analyzed by LC-MSMS on a Thermo Scientific Orbitrap Classic. Raw files were processed using the Raw2msm application, and the resultant data were searched against an in-house database using Mascot search engine software. The site of phosphorylation of all the <sup>32</sup>P-labeled peptides was determined by solid-phase Edman degradation on an Applied Biosystems 494C sequencer of the peptide coupled to Sequelon-AA membrane (Applied Biosystems) as described previously (17).

**Antibodies**—The following antibodies were raised in sheep and affinity-purified on the appropriate antigen: KCC3 total (residues 1–175 of human KCC3a), KCC3 phospho-Ser-96 (residues 80–94 or 89–103 of human KCC3a), KCC3 phospho-Thr-982 (residues 975–989 or 984–998 of human KCC3a), and KCC3 phospho-Thr-1039 (residues 1032–1046 or 1041–1055 of human KCC3a). Secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase used for immunoblotting were obtained from Pierce. Specificity of phospho-antibodies was assessed using protein extracts from HEK293 transfected with KCC3 cDNA.

**Stable and Transient Cell Lines and Cell Culture**—A stably transfected HEK293 cell line developed for a previous study (19) that had pCDNA3.1 expression vector with the open reading frame of full-length human with no lysine kinase 3 (WNK3) was used to transiently transfect full-length human KCC3a. To generate the transient cell lines, pre-cultures of HEK293-WNK3 underwent passages every 2–3 days to keep the cells in their exponential growth phase. 2 h before transfection, the cell suspension was centrifuged (300 × g for 5 min), resuspended in fresh medium at 5 × 10<sup>6</sup> cell/ml, and plated on 60-mm diameter dishes (60% confluence). Then, cells were transfected at 37 °C with the plasmid DNA or empty vector using the calcium phosphate method. Briefly, 5 µg of the full-length KCC3a was suspended in CaCl<sub>2</sub> solution at a final concentration of 0.3 M

### KCC3 Ser-96 Phosphorylation

and mixed with 150  $\mu$ l of 2 $\times$  HEPES-buffered saline (in mM: 50 HEPES, 280 NaCl, and 1.5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.05) dropwise while mixing gently. The mixture was left at room temperature for 30 min and then incubated with the cells for 6 h in 37 °C. Cells were then washed two times with 1 $\times$  phosphate-buffered saline (PBS) and placed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 50 units/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, and 1 mg/ml G418 in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C. 48 h after transfection, cells were exposed to isotonic (in mM: 160 NaCl, 5 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 10 HEPES, pH 7.4) or hypotonic 30% solutions (obtained by reduction of NaCl concentration) for 30 min. After treatment, the cells were harvested in ice-cold lysis buffer (in mM: 20 Tris/HCl, pH 7.4, 1 EDTA, 50 NaCl, 1 EGTA, 0.5 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 2 $\beta$ -glycerophosphate, and 1% Triton X-100), incubated for 10 min and then scraped. Cells homogenates were sonicated and centrifuged (11,000  $\times$  g for 20 min), and finally the supernatants were collected.

**Immunoblotting**—Groups of 10–20 oocytes were injected with cRNA from various constructs, transferred to Eppendorf tubes, and homogenized at 4 °C in lysis buffer (in mM: 10 Tris-HCl, 150 NaCl, 1 EDTA, 1% Triton (10  $\mu$ l/oocyte)) supplemented with protease and phosphatase inhibitor mixture (Roche Diagnostics). After clearing the lysate by centrifugation at 10,000  $\times$  g at 4 °C for 30 min, total protein was collected from the supernatant. Western blotting was carried out using previously characterized anti-KCC3 rabbit polyclonal antibodies (14) and the specific phospho-antibodies mentioned above. Total protein equivalent to one oocyte was separated in 7.5% polyacrylamide gels, transferred onto membranes (PVDF; Amersham Biosciences), blocked, and incubated overnight with the specific antibody at 3  $\mu$ g/ml in TBST, 5% milk at 4 °C. After several washes with TBST (Tris-buffered saline/Tween 20, in mM: 100 Tris/HCl, 150 NaCl, and 0.1% Tween 20, pH 7.5), membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody in blocking solution (1:7000, GE Healthcare Bioscience) and visualized by chemiluminescence (Amersham Biosciences ECL-Plus, GE Healthcare).

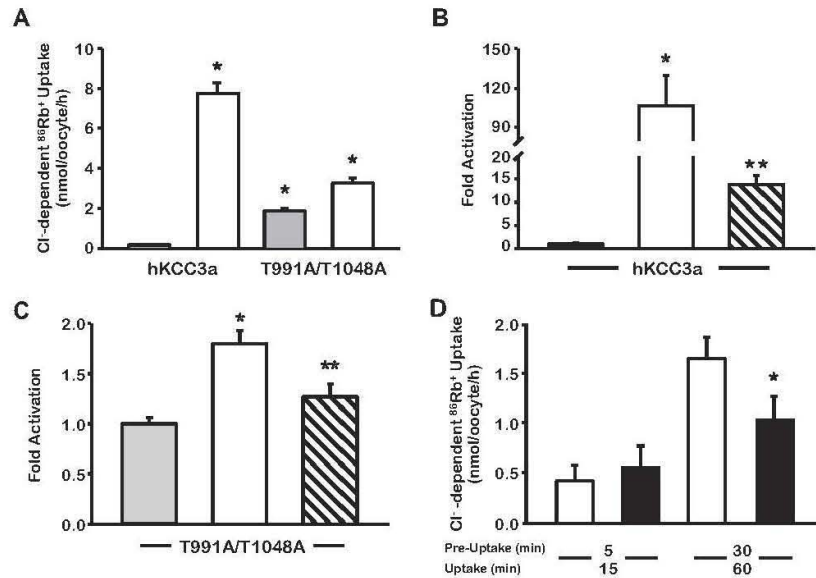
Cells cultured on 60-mm dishes were washed and then scraped into lysis buffer. Cell homogenates were sonicated and clarified by centrifugation (11,000  $\times$  g for 5 min), and protein concentration was determined by the Bradford method. Then, 25  $\mu$ g of protein was separated by SDS-PAGE (7.5% acrylamide gel) and transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with TBST containing 5% (w/v) nonfat dried milk and incubated overnight at 4 °C, with rabbit primary antibodies anti-KCC3 (1:1000) (14), anti-KCC3 phospho-Ser-96, anti-KCC3 phospho-Thr-991 (3  $\mu$ g/ml plus 2  $\mu$ l/ml non-phospho-peptide), or anti- $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology). After further washing, blots were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:5000; Zymed Laboratories Inc.), except for KCC3 phospho-Ser-96 and phospho-Thr-991 that were incubated with an anti-sheep secondary antibody for 1 h at room temperature. Chemiluminescent reaction was assayed using ECL<sup>®</sup>-Plus Western blot detection reagents (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations, and bands were visualized with exposure to Kodak Bio-Max light films (Sigma).

**Statistical Analysis**—Statistical significance is defined as two-tailed  $p < 0.05$ , and the results are presented as mean  $\pm$  S.E. The significance of the differences between two groups was tested by Student's  $t$  test, and the significance of the differences for three or more groups was tested by one-way analysis of variance with multiple comparisons using Bonferroni's correction.

### RESULTS

**Evidence for Additional Phosphorylation Sites for KCC3 Regulation**—The functional properties of wild type KCC3 (Fig. 1, A and B) were compared with those of the double mutant KCC3-T991A/T1048A (Fig. 1, A and C), in both isotonic and hypotonic conditions. As shown previously (14), wild type KCC3 was inactive in isotonic conditions ( $0.26 \pm 0.053$  nmol/oocyte/h) and incubation in hypotonicity dramatically increased its activity ( $7.83 \pm 0.94$  nmol/oocyte/h;  $p > 0.001$ ). As reported by Rinehart *et al.* (11), we observed that <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake in oocytes injected with the mutant KCC3-T991A/T1048A cRNA revealed a significant activity in isotonic conditions ( $2.0 \pm 0.13$  nmol/oocyte/h;  $p < 0.01$  versus wild type in isotonicity). However, when oocytes were incubated in hypotonicity, a further increase in activity was observed ( $3.45 \pm 0.40$  nmol/oocyte/h;  $p < 0.0001$  versus uptake in isotonicity). Additionally, as depicted in Fig. 1, B and C, and reported previously for wild type KCC3 (15, 18, 19), the activity of both wild type KCC3 and KCC3-T991A/T1048A in hypotonic conditions was significantly reduced by co-expression with the WNK3 ( $2.98 \pm 0.37$  and  $2.87 \pm 0.046$  nmol/oocyte/h, respectively,  $p < 0.05$  versus the absence of WNK3). These observations suggested that there might be an additional phosphorylation site(s) that has to be dephosphorylated to achieve full activation of the cotransporter. This proposal differs from that of Rinehart *et al.* (11) where dephosphorylation of threonines 991 and 1048 was suggested to be sufficient for full activation of the cotransporter. In their study, however, wild type KCC3 was incubated in hypotonic conditions for a total of 8 min, whereas it has been reported that KCCs require longer incubation times to reach full activation (20–22). Thus, it is possible that the activity of the double mutant KCC3-T991A/T1048A in isotonicity was higher than wild type KCC3 in hypotonicity because this latter was not yet fully active at the time of the uptake assay. To assess this possibility, we measured the activity of wild type KCC3 and the double mutant KCC3-T991A/T1048A after 5 or 30 min of pre-uptake incubation followed by 15–60 min of uptake (Fig. 1D). Thus, total time of exposition to hypotonicity was 20 min in the shorter groups and 90 min in the longer groups. As shown in Fig. 1D, when using a shorter period of hypotonic incubation, the Cl<sup>−</sup>-dependent <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake was similar between wild type and double mutant KCC3-T991A/T1048A injected oocytes ( $0.45 \pm 0.25$  versus  $0.54 \pm 0.35$  nmol/oocyte/h;  $p =$  not significant), whereas when using a longer period of exposition to hypotonic medium, the Cl<sup>−</sup>-dependent, <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake induced by wild type was significantly higher than the double mutant.

**SPAK Kinase Phosphorylates KCC3 at Ser-96**—The evidence shows that phosphorylation and activation of the NKCCs in the N-terminal domain by SPAK and OSR1 mediate WNK kinase signaling (23–26). Therefore we decided to analyze the effect of



**FIGURE 1. Evidence for additional phosphorylation sites in KCC3.** *A*, functional expression assay shows the activity of wild type (*WT*) KCC3 and KCC3-T991A/T1048A under isotonic (gray bars) and hypotonic (open bars) conditions. \*,  $p < 0.01$  versus human KCC3a (*hKCC3a*) in isotonic condition. *B* and *C*, fold activity of WT KCC3a (*B*) or KCC3a-T991A/T1048A (*C*) taking isotonic conditions as 100% (gray bars) and normalizing accordingly the effect of hypotonic conditions alone (open bars) or hypotonic conditions plus co-injection with WNK3 cRNA (hatched bars). \*,  $p < 0.01$  versus isotonic control. \*\*,  $p < 0.05$  versus hypotonicity without WNK3. *D*, time dependence of WT KCC3a activity (open bars) when compared with KCC3a-T991A/T1048A (black bars) in hypotonic conditions was measured after 5 or 30 min of pre-uptake incubation. \*,  $p < 0.01$  versus wild type.

SPAK on the phosphorylation of KCC3. To test this, a fragment of the cotransporter encompassing the N-terminal cytoplasmic domain, equivalent to the region that SPAK phosphorylates on NCC, NKCC1, and NKCC2 (10, 16), was phosphorylated in the presence of catalytically active recombinant SPAK complexed to its regulatory MO25 subunit (27). Strikingly, this revealed that active wild type but not kinase-inactive SPAK directly phosphorylated the N-terminal fragment of KCC3 encompassing residues 1–175 to a similar extent as the phosphorylation of the N-terminal domain of NKCC2 (Fig. 2*A*).

SPAK phosphorylated KCC3(1–175) in a time-dependent manner, showing an ~18-fold increase in phosphorylation when compared with phosphorylation by active SPAK in the absence of MO25 (data not shown).  $^{32}\text{P}$ -labeled KCC3(1–175) was digested with trypsin and analyzed by chromatography on a  $\text{C}_{18}$  column for phospho-site mapping. One major  $^{32}\text{P}$ -labeled phospho-peptide was observed (Fig. 2*B*). A combination of solid-phase Edman sequencing and mass spectrometry (Fig. 2*C*) revealed that this encompassed a peptide phosphorylated at Ser-96. Mutating Ser-96 to Ala prevented phosphorylation of KCC3 by SPAK, thereby confirming that this residue represents the major site of phosphorylation (data not shown).

The sequence alignment of the four  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$  cotransporters shows that the potential phosphorylation site Ser-96 is unique to KCC3 because it is only present in KCC3a and KCC3b isoforms (Fig. 3*A*), but not in the other KCCs. The double mutant KCC4-T926A/T980A, which is homologous to KCC3-T991A/T1048A, but lacks the Ser-96 residue, is also active in isotonic conditions, but cannot be further increased in hypotonicity

(Fig. 3*B*). Thus, in contrast to KCC3, in the KCC4 isoform that lacks the Ser-96 site, elimination of the two known sites at the C-terminal domain results in full activation of the cotransporter in isotonicity, suggesting that the presence of Ser-96 in KCC3 is responsible for the different functional behavior between KCC3-T991A/T1048A and KCC4-T926A/T980A toward hypotonicity.

**KCC3 Serine 96 Becomes Dephosphorylated during Cotransporter Activation by Hypotonicity**—We next substituted the serine 96 on wild type KCC3 to produce the KCC3-S96A mutant. As shown in Fig. 4*A*, similar to wild type KCC3, the KCC3-S96A was inactive in isotonic conditions and was dramatically stimulated by incubation in hypotonicity. The activation was fully prevented by co-expression with WNK3 (Fig. 4*B*). Thus, mutation of Ser-96 by itself has no effect on the behavior of KCC3 toward isotonic or hypotonic conditions, as well as to the known inhibitory action of WNK3 on the cotransporter (15, 18, 19).

We next generated phospho-specific antibodies that efficiently recognize KCC3 phosphorylated at Ser-96, Thr-991, or Thr-1048. Mutation of the phosphorylated residue to a non-phosphorylatable Ala residue prevented recognition, confirming the specificity of the phospho-specific antibodies (Fig. 5*A*). As shown in Fig. 5*B*, we were able to demonstrate that wild type KCC3 overexpressed in *X. laevis* oocytes is indeed phosphorylated at these three residues in isotonic conditions, when the cotransporter is inactive, and is considerably dephosphorylated following incubation in hypotonic conditions, when KCC3 becomes active. We also observed the expected effect of WNK3 kinase co-expression; in the presence of WNK3, dephosphory-

## KCC3 Ser-96 Phosphorylation

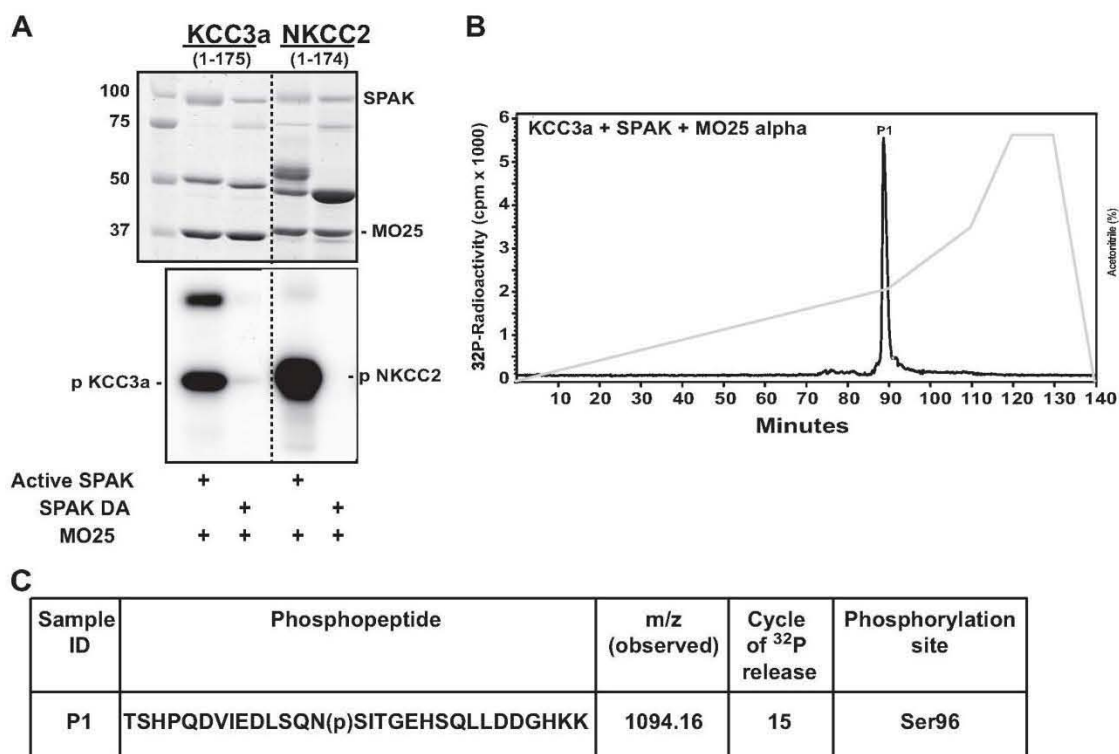


FIGURE 2. *In vitro* identification of KCC3 phosphorylation sites by SPAK. A, GST-KCC3(1–175) and GST-NKCC2(1–174) were expressed in *E. coli* and phosphorylated with the active and kinase inactive (DA) forms of SPAK in the presence of 10  $\mu$ M MO25 $\alpha$ . Dotted lines between autoradiographs and gels indicate that these were undertaken on separate gels. p, phosphorylated. B, phosphorylated GST-KCC3(1–175) was digested with trypsin and chromatographed on a C18 column. The peak fraction containing the major <sup>32</sup>P-labeled peptides is labeled P1. C, summary of the mass spectrometry and solid-phase Edman sequencing data obtained after phospho-peptide analysis.

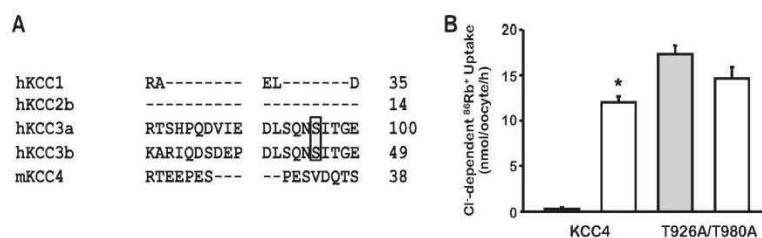
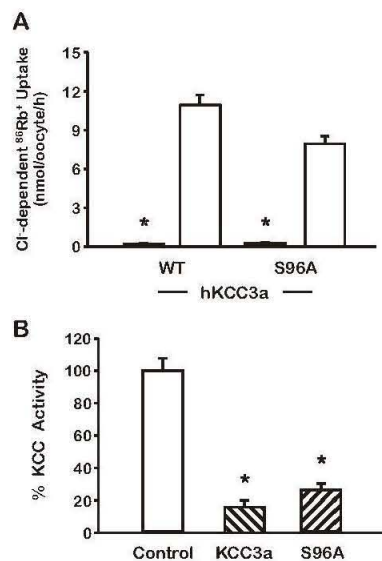


FIGURE 3. Serine 96 is unique to KCC3. A, KCCs sequence alignment of the N-terminal domain fragment revealed that Ser-96 of KCC3a (Ser-45 in KCC3b as shown the gray shaded box) is not present in other KCCs and thus is unique to KCC3. h, human; m, mouse. B, KCC4 Rb<sup>+</sup> uptake of WT KCC4 and KCC4-T926A/T980A under isotonic (gray bars) and hypotonic (open bars) conditions. n = 8–9 experiments, \*, p < 0.0001 versus KCC4 in isotonicity.

lation of the three sites was partially precluded. This correlates with the uncompleted activation of KCC3 in hypotonic conditions that occurs in the presence of this kinase (15, 18, 19). Similarly, in the double mutant KCC3-T991A/T1048A, Ser-96 also appeared phosphorylated in isotonic conditions and dephosphorylated after hypotonicity, and this was partially prevented by WNK3. These observations were corroborated using HEK293 cells transiently transfected with KCC3 cDNA and HEK293 cells stably transfected with WNK3 cDNA that were, in addition transiently transfected with KCC3 cDNA (19). As shown in Fig. 5C, HEK293 cells expressed KCC3 protein after transfection. In isotonic con-

ditions, both Ser-96 and Thr-991 were phosphorylated, and the signal for each phospho-antibody disappeared when cells were incubated in hypotonicity, in which KCC activity is known to be increased (19). In addition, in HEK293 cells stably transfected with WNK3, Ser-96 and Thr-991 were phosphorylated in both isotonic and hypotonic conditions, consistent with the known inhibition that WNK3 exerts on KCC3 activity (15, 18, 19). All these observations together suggested that although Ser-96 is not a unique or a master site for KCC3 regulation, it behaves as phospho-sites Thr-991 and Thr-1048 and it seems to be a third site playing a role in full activation/inhibition of the cotransporter.

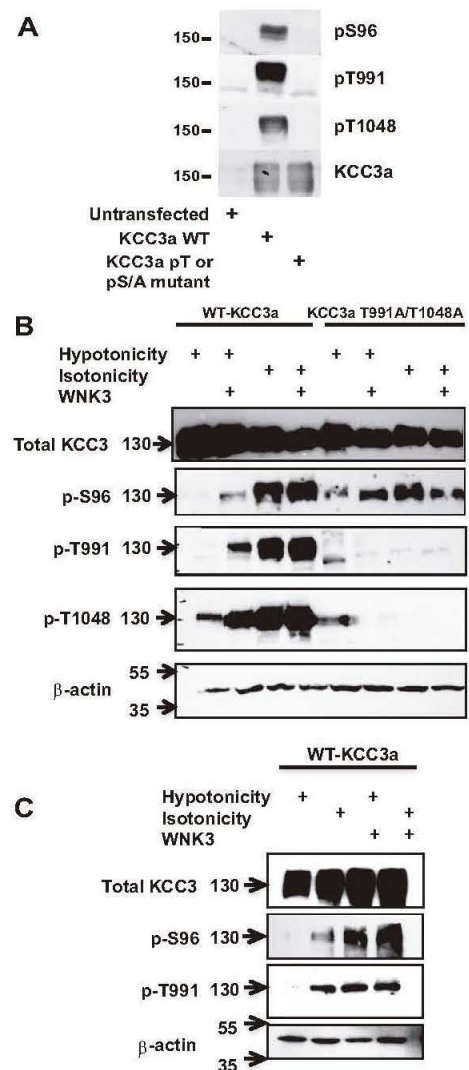


**FIGURE 4. Elimination of serine 96 by itself had no effect on the KCC3 behavior.** *A*, functional expression assay of WT KCC3a and mutant KCC3a-S96A shows no difference in hypotonic activation (open bars), with no basal expression under isotonic conditions (gray bars).  $n = 4$ ,  $p < 0.0001$  versus hypotonicity. *B*, similarly to WT KCC3a, the activity of mutant KCC3a S96A in hypotonic conditions is inhibited by WNK3 (hatched bars).  $n = 4$ ,  $p < 0.0001$  versus control.

*Serine 96 Is a Third Site Involved in Regulation of KCC3 Activity*—Because Ser-96 residue in the double mutant KCC3-T991A/T1048A was phosphorylated and dephosphorylated similarly as in the wild type KCC3a, but elimination of this site alone had no effect on the cotransporter behavior (Fig. 4), to find out the role of serine 96 on the regulation of KCC3, we substituted the Ser-96 for alanine in the double mutant KCC3-T991A/T1048A to create the triple mutant KCC3-S96A/T991A/T1048A. In parallel experiments, functional expression of the double and triple mutant revealed that both were active in isotonic conditions (Fig. 6A). However, the level of activity was significantly higher in the triple mutant than in the double mutant ( $4.97 \pm 0.57$  versus  $1.86 \pm 0.15$  nmol/oocyte/h;  $p < 0.0001$ ), suggesting that the absence of phosphorylation in serine 96 contributed to higher activity of the triple mutant KCC3 in isotonic medium. This is supported by the findings observed during incubation of oocytes in hypotonic conditions. Further activation of the double mutant was noted (Figs. 1, A and C, and 6B), whereas no additional effect of hypotonicity was detected in the triple mutant (Fig. 6B). The  $\text{Cl}^-$ -dependent,  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake of the triple mutant in isotonicity and hypotonicity was  $4.97 \pm 0.57$  and  $5.23 \pm 0.57$  nmol/oocyte/h, respectively ( $p =$  not significant). In addition, co-injection of oocytes with WNK3 cRNA was able to significantly reduce the activity of wild type and double mutant KCC3 in hypotonic conditions, but no inhibitory effect was observed upon the triple mutant (Fig. 6C).

## DISCUSSION

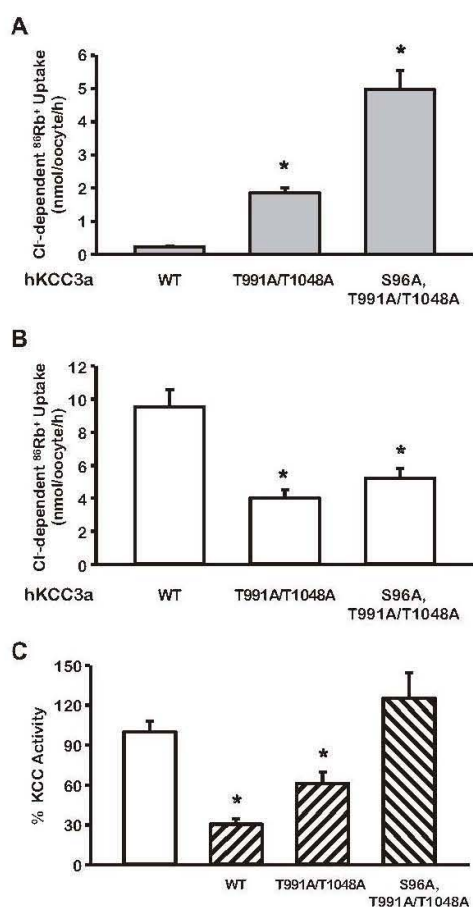
In the present study, we provide functional and biochemical evidences suggesting that full activation by cell swelling of the



**FIGURE 5. Serine 96 becomes phosphorylated under isotonic conditions and in co-expression with WNK3.** *A*, characterization of KCC3a phosphorylation sites using phospho-specific antibodies. HEK293 cells were transfected with WT human KCC3a or the indicated mutant forms (pT or pS). At 36 h after transfection, cells were lysed, and total cell extracts were immunoblotted with KCC3a total and phospho-specific antibodies. Similar results were obtained in 2 separate experiments. *B*, representative immunoblotting of total protein extracted from oocytes injected with WT KCC3a or KCC3a-T991A/T1048A cRNA with or without WNK3 cRNA and under hypotonicity or isotonicity maneuvers, as stated. *C*, representative immunoblotting of total proteins extracted from HEK293 cells transfected as stated. Blots were performed using specific antibody against total KCC3 and phospho-antibodies directed to Ser-96, Thr-991, and/or Thr-1048 of KCC3a and  $\beta$ -actin as loading control.

$\text{K}^+:\text{Cl}^-$  cotransporter isoform KCC3 is only achieved after dephosphorylation of three distinct residues, two of which are located at the C-terminal domain (threonine residues 991 and 1048) and were reported previously by Rinehart *et al.* (11). The third residue, proposed in this study, is the serine 96 located at the N-terminal domain.

## KCC3 Ser-96 Phosphorylation



**FIGURE 6. Serine 96 is a third site involved in regulation of KCC3a activity.** A and B, functional expression assay was assessed in isotonic (A) or hypotonic (B) conditions in oocytes injected with cRNA for WT KCC3, KCC3 double mutant (T991A/T1048A), or KCC3 triple mutant (S96A/T991A/T1048A) as stated. \* $p < 0.001$  versus WT. C, the triple mutant KCC3a S96A/T991A/T1048A is no longer sensitive to WNK3 (hatched bars) inhibition. The open bar shows the effect of WNK3 upon wild type or mutants KCC3, as stated.  $n = 3$ , \* $p < 0.001$  versus white bar.

Our proposal for the requirement of a third site dephosphorylation to achieve complete activation of KCC3 differs from conclusions presented by Rinehart *et al.* (11). They observed, on the one hand, that double mutant KCC3-T991A/T1048A exhibited similar activity in both isotonicity and hypotonicity, and on the other hand, that activity of the double mutant in isotonicity was higher than that shown for wild type KCC3 when cells were incubated in hypotonic conditions. Thus, they suggested that Thr-991 and Thr-1048 were the only two residues required for cell swelling to induce KCC3 activation. However, although we observed significant activity of the double mutant KCC3-T991A/T1048A in isotonic conditions, we also documented that incubation of oocytes in hypotonicity further increased the activity of the double mutant KCC3-T991A/T1048A (Fig. 1A). The observed increase was sensitive to WNK3 (Fig. 1C). Because WNK3 cannot phosphorylate neither

Thr-991 nor Thr-1048 in the double mutant KCC3-T991A/T1048A, this observation suggested that it was probably reducing the cotransporter activity by phosphorylating Ser-96. In addition, we showed that wild type KCC3 activity in hypotonic medium was significantly higher than that of the double mutant KCC3-T991A/T1048A in the same conditions (Fig. 1A). The reason for the discrepancy appears to be the time of exposure to the hypotonic medium. Rinehart *et al.* (11) used a total of 8 min, whereas we used longer exposure times. In this regard, it has been suggested that time of exposure to hypotonicity is associated with activation of the cotransporter (20–22). This is supported by our observations in Fig. 1D in which no difference between wild type and double mutant KCC3-T991A/T1048A was observed at a short period of incubation, whereas a significant difference was observed with longer exposure to hypotonic medium. Because the double mutant KCC3-T991A/T1048A is already active in isotonicity, then at a short period of incubation in hypotonicity, the activation of wild type KCC3 is not yet enough to reveal a difference. Thus, our functional observations suggested that at least a third phosphorylation site was involved in the regulation of KCC3 by extracellular osmolarity.

The potential phosphorylation site Ser-96 in KCC3 was detected by mass spectrometry. Because in the Na<sup>+</sup> coupled-chloride cotransporters of the SLC12 family NCC, NKCC1, and NKCC2 regulatory phosphorylation sites have been detected at the N-terminal domain (28–31), and it has been demonstrated that SPAK is the kinase responsible for the phosphorylation of these sites (10, 16), we analyzed the effect of SPAK, complexed with its regulatory subunit MO25 (27), on the phosphorylation of the N-terminal domain of KCC3. NKCC2 N-terminal domain was used as positive control. Following this strategy, phosphorylation of Ser-96 in the KCC3a N-terminal domain was detected. Rinehart *et al.* (11) did not observe this site, probably due to methodological differences. On the one hand, what they did was to compare KCC3 phosphorylation status in isotonicity versus hypotonicity, whereas we directly applied SPAK/MO25 into the *in vitro* reaction. On the other hand, they analyzed KCC3 extracted from cells after 5 min of exposure to hypotonic conditions, which, as was discussed above, could not be enough time to allow a complete dephosphorylation of the cotransporter to detect a difference in this site.

Specific phospho-antibodies against Ser-96, Thr-991, and Thr-1048 were raised and used to demonstrate that indeed, in isotonic conditions in which KCC3 is inactive, all three sites were phosphorylated. Incubation of oocytes in hypotonicity resulted in decreased phosphorylation of the three sites, suggesting that dephosphorylation of these sites is coupled with activation of the cotransporter. Supporting this conclusion, when oocytes were co-injected with WNK3 cRNA, a kinase that is known to inhibit the KCCs (15), the activity and dephosphorylation of KCC3 in the three sites were partially precluded. Similar observations were obtained for Ser-96 and Thr-991 sites in HEK293 cells. Finally, the behavior of mutant S96A alone and in the context of the triple mutant S96A/T991A/T1048A also supports that Ser-96 is a third site involved in the modulation of the cotransporter activity. The absence of Ser-96 alone had no effect on KCC3 activity in isotonic conditions or its behavior

toward activation by hypotonicity and inhibition by WNK3, suggesting that the C-terminal domain sites Thr-991 and Thr-1048 are hierarchically higher. However, elimination of Ser-96 in the absence of the other two sites resulted in a KCC3 that is more active than the double mutant in isotonic conditions and cannot be neither further activated by hypotonicity nor inhibited by WNK3, indicating that Ser-96 participates in the regulation of KCC3 activity.

The physiological relevance of a third site for regulation of the KCC3 cotransporter activity will require further investigation. This site is not present in other KCCs. Indeed, KCC4 in which both C-terminal domain threonine residues were eliminated (KCC4-T926A/T980A) resulted in full activation in isotonic conditions, suggesting that in this isoform no other sites are involved. Similarly, for NKCCs, between three and five different phosphorylation sites involved in their regulation have been located at the N-terminal domain, from which the master one is conserved (Thr-60 in human NCC), whereas some of the others are unique to one isoform (9, 24).

The presence of a third site suggests that KCC3 in some cells, tissues, or circumstances requires fine-tuning for its regulation. In this regard, it is worth noticing that we have shown before that an alternatively spliced isoform of KCC3a lacking exon 2 (KCC3a-x2M) is present in several human tissues (14). Exon 2 encodes for a 15-amino acid residue peptide in which Ser-96 is included. Thus, the major consequence of this splicing could be to produce KCC3 variants with and without Ser-96. Supporting the role of Ser-96 in the regulation of KCC3, we have reported previously that the speed of activation by hypotonicity of the KCC3a-x2M clone, lacking exon 2, is significantly faster than KCC3a containing exon 2 (14), suggesting that the absence of Ser-96 decreases the time required for full activation of the cotransporter because there is not a third site that has to be dephosphorylated. It will thus be interesting in future work to define which cells within a tissue are expressing variants with or without exon 2 or to raise knock-in mice of the different phosphorylation sites to explore the physiological consequence of the three different sites.

Phosphorylation/dephosphorylation processes modulate the activity of the SLC12 cotransporters. Several studies support that promoting phosphorylation by cell shrinkage, activating kinases, or inhibiting protein phosphatases increases the activity of the NKCCs and inhibits the KCCs, thus increasing intracellular chloride concentration, cell volume, and transcellular ion transport capacity. In contrast, promoting dephosphorylation by cell swelling, inhibiting kinases, or activating protein phosphatases reduces the NKCCs and activates the KCCs, thus decreasing intracellular chloride concentration, cell volume, and transcellular ion transport. Because the mode of operation of these secondary transporters is still far from being understood, it is not clear at the moment how the phosphorylation or dephosphorylation of one site can affect the transport activity of the protein, particularly because it is believed that this occurs with proteins that are already in the plasma membrane (9, 11, 32). Thus, affecting trafficking by the phospho-status of the protein does not seem to be the answer. One possibility could be that phosphorylating or not phosphorylating certain residues changes the structure of the protein, opening or closing

pores or turning binding sites for ions more or less accessible, thus changing the transport capacity of the cotransporter. Another possibility is that phosphorylation on a given cotransporter could be modulating its ubiquitylation, thus indicating that phosphorylation/dephosphorylation processes also affect the amount of total cotransporter (33).

In summary, our data support that serine 96 in KCC3 is a third phosphorylation site implicated in the regulation of the cotransporter activity.

## REFERENCES

- Gamba, G. (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electro-neutral cation-chloride cotransporters. *Physiol. Rev.* **85**, 423–493
- Adragna, N. C., Di Fulvio, M., and Lauf, P. K. (2004) Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J. Membr. Biol.* **201**, 109–137
- Chen, Y. F., Chou, C. Y., Ellory, J. C., and Shen, M. R. (2010) The emerging role of KCl cotransport in tumor biology. *Am. J. Transl. Res.* **2**, 345–355
- Howard, H. C., Mount, D. B., Rochefort, D., Byun, N., Dupré, N., Lu, J., Fan, X., Song, L., Rivière, J. B., Prévost, C., Horst, J., Simonati, A., Lemcke, B., Welch, R., England, R., Zhan, F. Q., Mercado, A., Siesser, W. B., George, A. L., Jr., McDonald, M. P., Bouchard, J. P., Mathieu, J., Delpire, E., and Rouleau, G. A. (2002) The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat. Genet.* **32**, 384–392
- Uyanik, G., Elcioglu, N., Penzien, J., Gross, C., Yilmaz, Y., Olmez, A., Demir, E., Wahl, D., Scheglmann, K., Winner, B., Bogdahn, U., Topaloglu, H., Hehr, U., and Winkler, J. (2006) Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology* **66**, 1044–1048
- Salin-Cantegrel, A., Rivière, J. B., Shekarabi, M., Rasheed, S., Dacal, S., Laganière, J., Gaudet, R., Rochefort, D., Lesca, G., Gaspar, C., Dion, P. A., Lapointe, J. Y., and Rouleau, G. A. (2011) Transit defect of potassium-chloride Co-transporter 3 is a major pathogenic mechanism in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *J. Biol. Chem.* **286**, 28456–28465
- Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didié, M., Beck, F. X., Boettger, T., Schubert, R., Ehmke, H., Jentsch, T. J., and Hübner, C. A. (2006) Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ. Res.* **98**, 549–556
- Flatman, P. W. (2002) Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1566**, 140–151
- Gamba, G. (2012) Regulation of the renal Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter by phosphorylation and ubiquitylation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303**, F1573–F1583
- Richardson, C., Sakamoto, K., de los Heros, P., Deak, M., Campbell, D. G., Prescott, A. R., and Alessi, D. R. (2011) Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *J. Cell Sci.* **124**, 789–800
- Rinehart, J., Maksimova, Y. D., Tanis, J. E., Stone, K. L., Hodson, C. A., Zhang, J., Risinger, M., Pan, W., Wu, D., Colangelo, C. M., Forbush, B., Joiner, C. H., Gulcicek, E. E., Gallagher, P. G., and Lifton, R. P. (2009) Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell* **138**, 525–536
- Mercado, A., de los Heros, P., Vázquez, N., Meade, P., Mount, D. B., and Gamba, G. (2001) Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of *Xenopus laevis* oocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C670–C680
- Mercado, A., Song, L., Vázquez, N., Mount, D. B., and Gamba, G. (2000) Functional comparison of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters KCC1 and KCC4. *J. Biol. Chem.* **275**, 30326–30334
- Mercado, A., Vázquez, N., Song, L., Cortés, R., Enck, A. H., Welch, R., Delpire, E., Gamba, G., and Mount, D. B. (2005) NH<sub>2</sub>-terminal heterogeneity in the KCC3 K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F1246–F1261

## KCC3 Ser-96 Phosphorylation

15. de Los Heros, P., Kahle, K. T., Rinehart, J., Bobadilla, N. A., Vázquez, N., San Cristobal, P., Mount, D. B., Lifton, R. P., Hebert, S. C., and 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
16. Richardson, C., Rafiqi, F. H., Karlsson, H. K., Moleleki, N., Vandewalle, A., Campbell, D. G., Morrice, N. A., and Alessi, D. R. (2008) Activation of the thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J. Cell Sci.* **121**, 675–684
17. Campbell, D. G., and Morrice, N. A. (2002) Identification of protein phosphorylation sites by a combination of mass spectrometry and solid phase Edman sequencing. *J. Biomol. Tech.* **13**, 119–130
18. Cruz-Rangel, S., Melo, Z., Vázquez, N., Meade, P., Bobadilla, N. A., Pasantes-Morales, H., Gamba, G., and Mercado, A. (2011) Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**, C601–C608
19. Cruz-Rangel, S., Gamba, G., Ramos-Mandujano, G., and Pasantes-Morales, H. (2012) Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells. *Pflugers Arch.* **464**, 317–330
20. Bianchini, L., Fossat, B., Porthé-Nibelle, J., Ellory, J. C., and Lahlou, B. (1988) Effects of hyposmotic shock on ion fluxes in isolated trout hepatocytes. *J. Exp. Biol.* **137**, 303–318
21. Lauf, P. K. (1988) Volume and anion dependency of ouabain-resistant K-Rb fluxes in sheep red blood cells. *Am. J. Physiol.* **255**, C331–C339
22. Lauf, P. K., and Adragna, N. C. (2000) K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol. Biochem.* **10**, 341–354
23. Pacheco-Alvarez, D., Vázquez, N., Castañeda-Bueno, M., de-Los-Heros, P., Cortes-González, C., Moreno, E., Meade, P., Bobadilla, N. A., and 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
24. Richardson, C., and Alessi, D. R. (2008) The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J. Cell Sci.* **121**, 3293–3304
25. Vitari, A. C., Thastrup, J., Rafiqi, F. H., Deak, M., Morrice, N. A., Karlsson, H. K., and Alessi, D. R. (2006) Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem. J.* **397**, 223–231
26. Vitari, A. C., Deak, M., Morrice, N. A., and Alessi, D. R. (2005) The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem. J.* **391**, 17–24
27. Filippi, B. M., de los Heros, P., Mehellou, Y., Navratilova, I., Gourlay, R., Deak, M., Plater, L., Toth, R., Zeqiraj, E., and Alessi, D. R. (2011) MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases. *EMBO J.* **30**, 1730–1741
28. Ponce-Coria, J., San-Cristobal, P., Kahle, K. T., Vazquez, N., Pacheco-Alvarez, D., de Los Heros, P., Juárez, P., Muñoz, E., Michel, G., Bobadilla, N. A., Gimenez, I., Lifton, R. P., Hebert, S. C., and 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
29. Pacheco-Alvarez, D., Cristóbal, P. S., Meade, P., Moreno, E., Vazquez, N., Muñoz, E., Díaz, A., Juárez, M. E., Giménez, I., and Gamba, G. (2006) The Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J. Biol. Chem.* **281**, 28755–28763
30. Giménez, I., and Forbush, B. (2005) Regulatory phosphorylation sites in the NH<sub>2</sub> terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F1341–F1345
31. Darman, R. B., and Forbush, B. (2002) A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J. Biol. Chem.* **277**, 37542–37550
32. Pedersen, N. B., Hofmeister, M. V., Rosenbaek, L. L., Nielsen, J., and Fenton, R. A. (2010) Vasopressin induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter in the distal convoluted tubule. *Kidney Int.* **78**, 160–169
33. Hossain Khan, M. Z., Sohara, E., Ohta, A., Chiga, M., Inoue, Y., Isobe, K., Wakabayashi, M., Oi, K., Rai, T., Sasaki, S., and Uchida, S. (2012) Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 456–461



## Molecular evidence for a role for $K^+$ - $Cl^-$ cotransporters in the kidney

Zesergio Melo,<sup>1</sup> Silvia Cruz-Rangel,<sup>2</sup> Rocio Bautista,<sup>2</sup> Norma Vázquez,<sup>4</sup> María Castañeda-Bueno,<sup>1</sup> David B. Mount,<sup>3</sup> Herminia Pasantes-Muñoz,<sup>2</sup> Adriana Mercado,<sup>2</sup> and Gerardo Gamboa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidades Fisiología y Diet. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México; <sup>2</sup>División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México; <sup>3</sup>Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, México; <sup>4</sup>Renal Division, Veterans Affairs Boston Healthcare System and Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Submitted 7 July 2013; accepted in final form 19 September 2013.

Melo Z, Cruz-Rangel S, Bautista R, Vázquez N, Castañeda-Bueno M, Mount DB, Pasantes-Muñoz H, Mercado A, Gamboa G. Molecular evidence for a role for  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporters in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1402–F1411, 2013. First published October 2, 2013; doi:10.1152/ajprenal.00390.2013.  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter (KCC) isoforms 3 (KCC3) and 4 (KCC4) are expressed at the basolateral membrane of proximal convoluted tubule cells, and KCC3 is present in the basolateral membrane of the thick ascending loop of Henle's limb and  $\alpha$ -intercalated cells of the collecting duct. Little is known, however, about the physiological roles of these transporters in the kidney. We evaluated KCC3 and KCC4 mRNA and protein expression levels and intrarenal distribution in male Wistar rats or C57 mice under five experimental conditions: hyperglycemia after a single dose of streptozotocin or low-salt diet, metabolic acidosis induced by ammonium chloride in drinking water, and low- or high- $K^+$  diets. Both KCC3 mRNA and protein expression were increased during hyperglycemia in the renal cortex and at the basolateral membrane of proximal tubule cells but not with a low-salt diet or acidosis. In contrast, KCC4 protein expression was increased by a low-sodium diet in the whole kidney and by metabolic acidosis in the renal outer medulla, specifically at the basolateral membrane of  $\alpha$ -intercalated cells. The increased protein expression of KCC4 by a low-salt diet was also observed in WNK4 knockout mice, suggesting that upregulation of KCC4 in these circumstances is not WNK4 dependent. No change in KCC3 or KCC4 protein expression was observed under low- or high- $K^+$  diets. Our data are consistent with a role for KCC3 in the distal tubule glucose reabsorption mechanism and for KCC4 in salt reabsorption of the thick ascending loop of Henle's limb and acid secretion of the collecting duct.

**$K^+$ - $Cl^-$  cotransporter; acidosis; diabetes; low-salt diet**

The transmembrane movement of  $K^+$  and  $Cl^-$  across the plasma membrane is accomplished by a group of secondary active transport proteins known as  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporters (KCCs). This transport system was originally described in red blood cells as a swelling- and *N*-ethylmaleimide-activated,  $Cl^-$ -dependent,  $K^+$  efflux mechanism (31, 36, 30, 31), with a particular role in the regulation of cell volume. When cells swell, the activation of KCCs help to eliminate ions and return the cell to its original volume, a process known as regulatory volume decrease (RVD). Later on, it was observed that KCCs are present in many tissues, in which they play important roles beyond cell volume regulation. One outstanding example is the critical role that KCC2 plays in modulating the intracellular  $Cl^-$  concentration, which, in turn, is critical to define the

response (hyperpolarizing or depolarizing) of ionotropic neurotransmitter receptor, ligand-gated  $Cl^-$  channels in the postsynaptic membrane (2).

KCCs are members of the SLC12 family of solute transporters, in which four different genes, *SLC12A4* to *SLC12A7*, encode for KCC1–KCC4 isoforms. Three of these transporters, KCC1, KCC3, and KCC4, are expressed in several tissues, including the kidney, whereas KCC2 is neuron specific (17). The presence of KCC1 in the kidney has been suggested only a demonstration of the presence of its mRNA transcripts (20), whereas the presence of KCC3 and KCC4 have been identified at both mRNA and protein levels (6, 38, 10). The expression of KCC3 protein is located in the basolateral membrane of proximal convoluted tubule (PCT) cells (38), whereas KCC4 protein is present in the basolateral membrane of the PCT as well as in the basolateral membrane of the thick ascending limb (TAL) of Henle's limb and  $\alpha$ -intercalated cells of the collecting ducts (6, 40).

While much information regarding the role of KCCs in central nervous system physiology has been reported (5, 27, 36), little is known about their role in renal physiology. Avison et al. (4) presented evidence for a  $Ca^{2+}$ -insensitive but furosemide-sensitive  $K^+$  transport mechanism compatible with a KCC system in the basolateral membrane of PCT cells that is stimulated by increased  $Na^+$ /glucose transport in the apical membrane, suggesting that transcellular glucose transport requires high rates of  $K^+$  recycling in the basolateral membrane. Greger and Schlatter's (21) data supported the presence of an electroneutral  $K^+$ - $Cl^-$  cotransport system in the basolateral membrane of TAL cells. Anurim et al. (2) observed the existence of an apical  $K^+$ - $Cl^-$  cotransport system in distal convoluted tubule (DCT) cells that was particularly active in the presence of a low luminal  $Cl^-$  concentration, suggesting that such a role could provide a  $K^+$  secretory pathway with a low-salt diet. Finally, the development of KCC4 knockout mice revealed that the absence of KCC4 is associated with renal tubular acidosis (6). However, until now, none of these potential roles have been explored in animal models using molecular tools. Thus, the goal of the present work was to determine the behavior of KCC3 and KCC4 mRNA and protein expression during hyperglycemia, salt restriction, metabolic acidosis, and  $K^+$  diet. Our data are consistent with an important role of KCCs as cotransporters in the renal handling of glucose, salt, and protons.

### METHODS

**Animal models.** Male Wistar rats weighing 250–300 g or male C57 mice weighing 20–25 g were provided by our animal facility. All

Address for reprint requests and other correspondence: G. Gamboa, Molecular Physiology Unit, Vaso de Quiroga no. 15, Tlalpan 14000, México City, México (e-mail: gamboa@biomedicinas.unam.mx).

animal procedures were performed in accordance with the Mexican Federal Regulation for Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-2001) and were approved by our Institutional Animal Care Committees. All rodents were housed in regular polypropylene cages with 3 rats/male/mice with 12:12-h light-dark cycles and at a constant temperature and humidity of 20°C and 65%, respectively. On the first and last days of the experiment, animals were placed in metabolic cages (Nalgene) to determine 24-h water intake and urinary electrolyte excretion and osmolality. After animals were euthanized, serum electrolytes, creatinine, and osmolality were determined.

**Experimental procedures.** We studied five experimental groups. *Group 1* consisted of rats given a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; 60 mg/kg body wt, Sigma) (29, 42). Seventy-two hours after STZ administration, the blood glucose concentration was determined (Accu-Chek sensor control, Roche Diagnostics), and only rats with a postprandial blood glucose level of >200 mg/dl were considered diabetic and were followed for the next 4 wk. Animals were fed with regular NaCl chow (0.9% NaCl chow, rat, 50H, Harlan) and tap water. As a control, we used rats housed with a single intraperitoneal injection of citrate buffer solution (0.1 M, pH 4.4) and were fed with regular chow and tap water. *Group 2* was given a low NaCl intake for 8 days. This model was performed in wild-type mice and WNK4<sup>-/-</sup> knockout mice, which have been previously described (8). These animals were fed with low NaCl chow (0.0–0.02% NaCl chow, TD96128, Harlan) and tap water (8, 39). *Group 3*, which consisted of both rats and mice, was given free access to a drinking solution with 280 mM NH<sub>4</sub>Cl for 8 days (1, 4). Control animals for *groups 2* and *3* consisted of rats or mice that were simultaneously carried through all procedures and fed similar amounts of regular chow diet and tap water. *Groups 4* and *5* consisted of mice given either a low- or high-K<sup>+</sup> diet for 8 days, respectively. Control (1.28 K<sup>+</sup>), low-K<sup>+</sup> (0.8 K<sup>+</sup>), and high-K<sup>+</sup> (5% K<sup>+</sup>) diets were obtained from TestDiet (St. Louis, MO) and were prepared by modifying the AIN-93M semipurified diet. The low-K<sup>+</sup> diet was used as a base, and lithium potassium citrate was added to generate the control and high-K<sup>+</sup> diets (8). After a 2-day period of adaptation to the control powder diet, the diet was changed to a low- or high-K<sup>+</sup> diet for some animals, whereas the control group continued to receive the control diet. At the end of day 8, mice were killed, and kidneys were removed.

After each experimental treatment period, animals were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg), and kidneys were perfused with saline solution and rapidly removed. The cortex and medulla from one kidney were isolated and frozen in liquid nitrogen, whereas the other kidney was placed in 4% paraformaldehyde to carry on the immunohistochemical assays.

**Preparation of renal tissue.** The cortex, medulla, or whole kidney was homogenized (0.1 g tissue/ml) in buffer solution containing 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6), and a protease cocktail inhibitor complete 1 tablet per 10 ml (Roche Diagnostics). Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4°C, and supernatants were used to measure the total protein expression. The protein concentration was measured with the Bradford method using BSA, as is standard with the Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA).

**Immunoblot analysis.** Western blot analysis of KCC3 and KCC4 proteins was performed using previously characterized affinity-purified rabbit polyclonal antibodies specific for the 19 residue peptides KCC3 KKARNAYLNNSNYEGDEY (38) and KCC4 AERTLEPDSFNVIXIISPT (28) encoded within exon 3 of the *NCC2E4* gene and exon 1 of the *NCC2E3* gene, respectively.

Crude membrane protein was isolated from the renal cortex and medulla, and samples of 100 µg were separated by 7.5% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 1% bovine dry milk (Bio-Rad) in 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, and 0.5% Tween 20 (pH 7.6) (TBST). Membranes were then incubated overnight with rabbit polyclonal antibodies

against either KCC3 (1:1,000) or KCC4 antibodies (1:500) in TBST and 5% milk at 4°C. After being washed three times in TBST, membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary peroxidase-conjugated secondary antibody in blocking solution (1:7,000 GE Healthcare Bioscience). Antigen-antibody complexes on the immunoblots were visualized after an intensive wash using enhanced diaminobenzidine (Amersham ECL-Plus system, GE Healthcare Bioscience).

**Immunohistochemistry.** Tissues were retrograde perfused via the mesenteric vein with ice-cold PBS and then kept in a vial containing 4% paraformaldehyde until use. Kidneys were removed and embedded in para-Ten, and sagittal sections were cut to 1.5 µm thickness. Antigen retrieval was performed by incubating the slides in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6) for 15 min at 80°C. Samples were preincubated for 1 h at room temperature with 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS and permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS for 2 min. Blockade was performed with 1% BSA, 5% FBS, and 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature. Samples were then incubated with rabbit anti-KCC4 antibodies (1:200) in the same solution for 45 min at room temperature. Incubation without anti-KCC antibodies served as a negative control. After being washed with 0.1% Triton X-100 in PBS, sections were incubated with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (donkey anti rabbit, 1:1,000, Amersham) for 90 min at room temperature. Samples were then washed with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min and incubated with 0.01% diaminobenzidine tetrahydrochloride as chromogen (Sigma) for 10 min followed by a counterstain with Meyer hematoxylin. Samples were washed in PBS, dehydrated in an ethanol-xylol train, and mounted on coverslips with Permount mounting media (Electron Microscopy Sciences). Slides were observed under ×10 and ×40 objectives with a bright-light Nikon (Niphe 80) microscope, and images were captured with a Coolpix-4300 Nikon digital camera with four megapixels of resolution.

**Immunoprecipitation.** Rat or mice kidneys were prepared for immunoprecipitation as described above. Tissue sections (10 µm thickness) were incubated for 20 min in PBS with 1% BSA and 5% normal goat serum (NGS) and then incubated with primary antibodies diluted in PBS, DSA, and NGS. An antigen retrieval step was included that required 10 min of incubation in 0.1% SDS diluted in PBS, DSA, and NGS. Sections were rinsed with PBS and NaCl and then with standard PBS. They were then incubated with the KCC4 affinity-purified antibody and diluted in 1% BSA and PBS (1:200) overnight at 4°C. After incubation, sections were washed, incubated with secondary antibodies (FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:250), Zymed) or Cy5-labeled anti-rabbit antibody (1:1,000, Molecular Probes) at room temperature for 1 h, then washed again. To identify acid-secreting  $\alpha$ -intercalated cells, anti-H<sup>+</sup> subunit of H<sup>+</sup>-ATPase was used as a marker (1:100, gift of Dr. Laura Arriza [34]). Tissues were mounted on coverslips with Vectastain (Vector Labs). Slides were stained, and images were obtained with a ×40 oil-immersion objective mounted on a confocal inverted microscope (Olympus Fluoview FV1000). Image analysis was performed using ImageJ software (version 1.36b, National Institutes of Health).

**Real-time RT-PCR.** Total RNA was extracted from frozen renal cortex and medulla tissue using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription was carried out with 1.0 µg of total RNA using 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) and random primers. RNA integrity was analyzed by electrophoresis. KCC3 and KCC4 mRNA were quantified by real-time RT-PCR with the ABI Prism 5000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The ABI TaqMan probes used were KCC3R-NR (5'-GCCCTCTTCACTCCCTCTCTGCTTCGG-3') and Rn18S25XLM1 (5'-CCAGTCTGCTGGACCTGTCACAAAGCT-3') for KCC3 and KCC4, respectively. As an endogenous control, rat glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was used. Relative quantification of KCC3 and KCC4 gene expression was performed with the comparative threshold cycle (C<sub>t</sub>) method (37).

**Functional expression of KCC4 in *Xenopus laevis* oocytes.** We assessed the activity of KCC4 under different extracellular pH conditions using the heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocytes following our previously detailed procedures (9, 10, 31, 38). In brief, single V-VI oocytes extracted from anesthetized female frogs were injected with KCC4 cDNA at 10 ng/oocyte, and 3 days later, the activity of the cotransporter was determined by assessing Cl<sup>-</sup>-dependent <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> uptake under hypotonic conditions using similar pre-uptake and uptake solutions that were pH titrated from 6.0 to 8.0. cDNA for injection was transcribed *in vitro* from KCC4 cDNA linearized at the 3' end using the T7 RNA polymerase mMESSAGE kit (Ambion).

**Statistical analysis.** Statistical significance was defined as two-tailed *P* values of <0.05, and results are presented as means ± SE. The significance of differences between two groups was tested using the Student *t* test; the significance of differences among three or more groups was tested using one-way ANOVA with multiple comparisons using the Bonferroni correction.

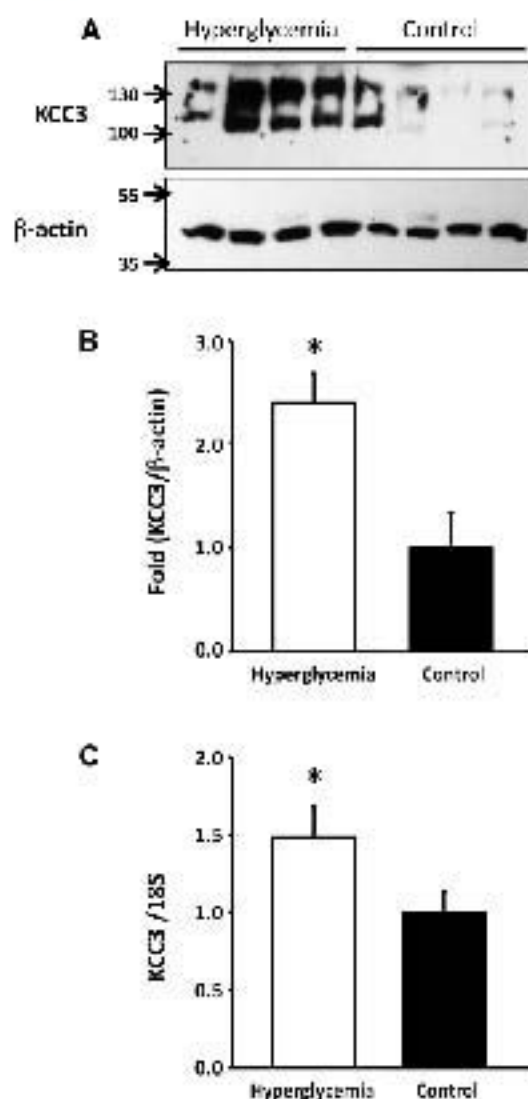
## RESULTS

**Group 1: animals with STZ-induced diabetes mellitus developed hyperglycemia.** As shown in Table 1, on the day of euthanization, serum glucose levels were 304 ± 72 mg/dl in the STZ-treated group and 48 ± 9 mg/dl in the control group (*P* < 0.001). This was reflected by an increased level of glucose in the urine. Although no differences were observed in serum creatinine or urinary salt excretion between diabetic and control groups, a significant increase in acid and K<sup>+</sup> secretion was observed in the diabetic group. Hyperglycemic rats exhibited a significant increase in KCC3 expression in the renal cortex at both mRNA and protein levels. As shown in Fig. 1, expression of KCC3 in the renal cortex was ~2.1 ± 0.28 fold higher in hyperglycemic rats than in control rats. This was accompanied by increased expression at the mRNA level. RT-PCR analysis revealed a 1.5 ± 0.19-fold higher level of KCC3 transcripts in the hyperglycemic group than in the control group (*P* < 0.05). In contrast, no significant differences in KCC4 protein and mRNA expression were detected in the renal cortex between control and hyperglycemic animals (data not shown). In the renal medulla, however, hyperglycemic animals exhibited a small but nevertheless significant increase in KCC4

**Table 1. Body weight and plasma and urine values of hyperglycemic rats followed for 30 days after streptozotocin injection**

	Control Rab	Hyperglycemic Rab	<i>P</i> Value
Final body weight, g	272.4 ± 19.5	232.8 ± 14.46	<0.05*
Plasma			
Na <sup>+</sup> , meq/l	146.35 ± 0.53	149.42 ± 1.61	<0.05*
K <sup>+</sup> , meq/l	4.76 ± 0.15	4.8 ± 0.17	<0.05*
Cl <sup>-</sup> , meq/l	111.18 ± 2.45	109.58 ± 1.27	NS
Glucose, mg/dl	65.2 ± 8.98	304.1 ± 72.18	<0.05*
CO <sub>2</sub> , mmol/l	17.34 ± 1.85	21.20 ± 0.39	NS
Creatinine, μg/dl	0.48 ± 0.03	0.45 ± 0.02	<0.05*
Urine			
Glucose, mg/dl	17.8 ± 3.17	330.5 ± 53.48	<0.05*
Creatinine, μg/dl	41.92 ± 10.24	23.51 ± 5.08	NS
Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> , meq/mg	0.35 ± 0.04	0.68 ± 0.19	NS
K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> , meq/mg	1.41 ± 0.04	2.18 ± 0.21	<0.05*
Cl <sup>-</sup> /OCl <sup>-</sup> , meq/mg	0.72 ± 0.08	0.91 ± 0.24	NS
pH	6.54 ± 0.10	5.66 ± 0.19	<0.05*

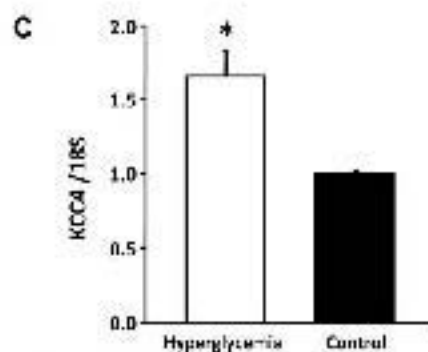
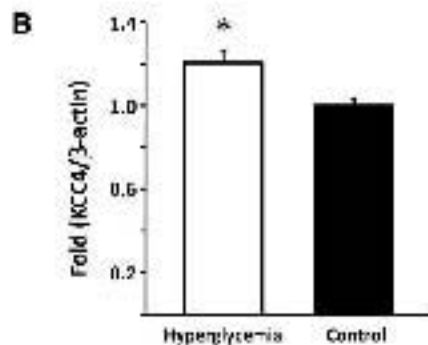
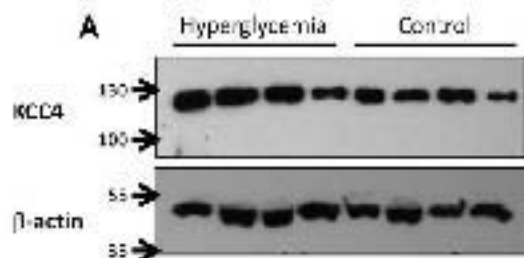
Values are means ± SE; *n* = 6 rats/group. Cl<sup>-</sup>, Chloride ion; NS, not significant. \*Significant difference.



**Fig. 1. KCC3 cotransporter (KCC3) expression is increased in the renal cortex of hyperglycemic rats.** A: Western blot analysis of renal cortex protein lysate from streptozotocin (STZ) treated (*n* = 4) or vehicle treated (*n* = 4) rats. Blots were exposed to anti-KCC3 affinity-purified antibody as previously described (28), or commercially available anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology). B: densitometric analysis of the blot shown in A. Cl<sup>-</sup> mRNA level expression measured through real-time PCR with specific primers for KCC3 (KCC3-3R-5'-T-GGCTGCTGATGCTGCTGCTGCTGG-3', *n* = 6) vs. control rats.

protein of 1.2 ± 0.06-fold (*P* < 0.05), which was associated with increased expression at the mRNA level of 1.7 ± 0.16-fold (*P* < 0.05; Fig. 2).

**Group 2: effect of a low-salt diet in mice.** As shown in Fig. 3, Western blot analysis revealed that in whole kidneys from control mice, KCC3 and KCC4 protein expression were very robust. KCC4 was increased by 1.53 ± 0.16-fold (*P* < 0.05) in the kidneys of mice fed a low-salt diet, whereas KCC3 expression was not affected. We also assessed the effect of a low-salt diet on KCC3 and KCC4 expression from renal kidney proteins in WNK4<sup>-/-</sup> mice. This enabled us to take advantage of tissue

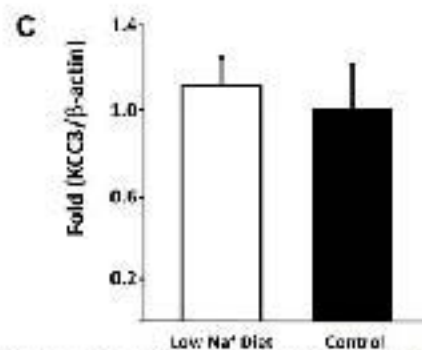
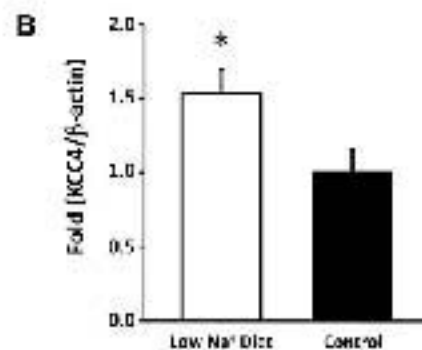
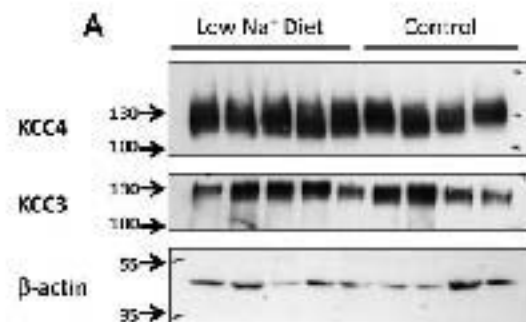


**Fig. 2.** Effect of hyperglycemia on KCC4 expression in the renal medulla. **A:** Western blot analysis of renal medulla protein lysates from 512 treated ( $n = 4$ ) or vehicle-treated ( $n = 4$ ) rats. Blots were exposed to anti-KCC4 affinity-purified antibodies, as previously described (25), or anti- $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology). **B:** densitometric analysis of the blot shown in **A**. **C:** mRNA level expression measured through real-time PCR with specific primers for KCC4 (F:0153550; r1: 5'-CCATGTCCTCC4CCCTTA-CAATCT-3'; P: 0165) and  $\beta$ -actin.

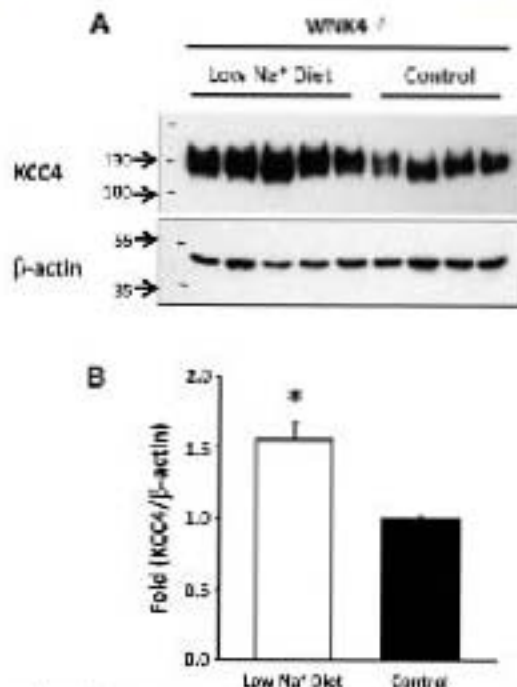
from animals that were already studied under these experimental conditions in our laboratory and for which the physiological data for exposure to a low-salt diet have already been gathered (8). Because WNK4 is required for the modulation of renal  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter expression by a low-salt diet (8), we analyzed the effect of this experimental maneuver on KCC4 expression in  $\text{WNK4}^{-/-}$  mice. As shown in Fig. 4, however, increased expression of KCC4 during salt restriction remained evident in  $\text{WNK4}^{-/-}$  mice at 1.55  $\pm$  0.11-fold over the control group, suggesting that upregulation of this cotransporter is not dependent on WNK4 activity.

**Group 3: metabolic acidosis.** To induce metabolic acidosis, male Wistar rats or C57 mice were exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  at a

concentration of 280 mM in drinking water for 8 days, which is a known method for inducing this metabolic disturbance (1, 41). As consistent with previous reports for this model, after 8 days, blood pH,  $\text{Pco}_2$ , and  $\text{HCO}_3^-$  concentration remained similar between acidotic and control rats (Table 2). However, animals exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  revealed significantly higher urinary  $\text{Cl}^-$  excretion and lower urinary pH, indicating the active secretion of protons in the kidney. Mice showed similar differences between control and acidotic animals in urinary pH (acidotic animals:  $5.25 \pm 0.17$  vs. control animals:  $6.41 \pm 0.36$ ,  $P < 0.01$ ). Because our KCC3 and KCC4 antibodies were raised against mouse sequences, clearer Western Blots



**Fig. 3.** Effect of a low-salt diet in mice. **A:** Western blot analysis of KCC4 and KCC3 in kidneys from mice exposed to a low-salt ( $n = 2$ ) or normal salt (control,  $n = 4$ ) diet. Blots were exposed to anti-KCC4, anti-KCC3, or anti- $\beta$ -actin antibodies. **B:** densitometric analysis of the KCC4 blot shown in **A**.  $P < 0.05$  vs. control mice. **C:** densitometric analysis of the KCC3 blot shown in **A**.



**Fig. 4.** Upregulation of KCC4 by a low-salt diet does not require WNK4 expression. **A** and **B**, Western blot analysis (**A**) and densitometric analysis (**B**) of KCC4 from kidney protein of WNK4<sup>-/-</sup> mice exposed to a low-salt ( $n = 5$ ) or normal salt (control;  $n = 4$ ) diet. Blots were exposed to anti-KCC4 or anti-β-actin antibodies. \* $P < 0.05$  vs. control mice.

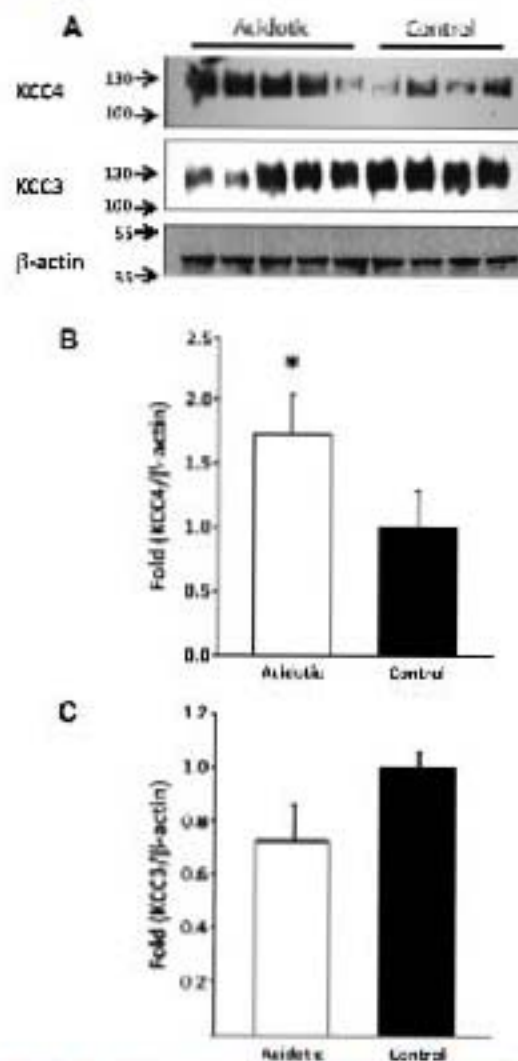
from total kidney proteins were observed using mouse rather than rat proteins. Thus, Western blot analyses from acidic mice and their respective control mice are shown in Fig. 5. The expression of KCC4 was significantly higher in acidic mice versus their respective control mice. In contrast, no significant changes were observed for KCC3 expression.

Because it has been previously shown that intercalated cells express KCC4 in the basolateral membrane and that the elimination of this cotransporter in KCC4 knockout mice results in renal tubular acidosis (6, 19), we reasoned that the

**Table 2. Blood gasometry and plasma and urine values of mice exposed to 380 mM NH<sub>4</sub>Cl solution for 8 days**

	Control Mice	Acidotic Mice	<i>P</i> Value
<b>Blood</b>			
pH	7.30 ± 0.05	7.27 ± 0.05	NS
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> , mmHg	70.22 ± 1.59	72.01 ± 1.59	NS
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mmol/L	18.25 ± 0.17	16.75 ± 0.08	NS
Blood urea, g/L	45.5 ± 1.5	37.56 ± 1.51	<0.05*
<b>Plasma</b>			
Na <sup>+</sup> , mg/dl	149.24 ± 1.53	146.50 ± 2.2	NS
K <sup>+</sup> , mg/dl	3.47 ± 0.26	3.23 ± 0.8	NS
Cl <sup>-</sup> , mg/dl	117.54 ± 1.16	114.25 ± 1.68	<0.05*
CO <sub>2</sub> , mmol/L	21.22 ± 0.50	14.93 ± 3.16	NS
Creatinine, mg/dl	0.51 ± 0.02	0.50 ± 0.02	NS
<b>Urine</b>			
Creatinine, mg/dl	69.52 ± 3.27	55.41 ± 6.54	NS
pH (8 days)	6.624 ± 0.12	5.78 ± 0.05	<0.05*

Values are means ± SE;  $n = 5$  mice/group. \*Significant difference.



**Fig. 5.** Metabolic acidosis-induced upregulation of KCC4 in the mouse kidney. **A**, Western blot analysis of whole kidney protein lysates of mice treated with NH<sub>4</sub>Cl ( $n = 5$ ) or vehicle ( $n = 4$ ) for 8 days. Blots were exposed to anti-KCC4, anti-KCC3, or anti-β-actin antibodies. **B**, densitometric analysis of the KCC4 blot shown in **A**. \* $P < 0.05$  vs. control (100%). **C**, densitometric analysis of the KCC3 blot shown in **A**.

increased expression of KCC4 in both acidic and hyperglycemic cells must be in intercalated cells of the collecting duct. To assess this possibility, we first needed to demonstrate that our antibody indeed localized KCC4 in these cells in the rat kidney. Figure 6*A* shows a collecting duct. Some cells in this duct were positive at the basolateral membrane using the anti-KCC4 antibody and are shown in green. Figure 6*B* shows that the same cells were positive in the apical membrane (shown in red) using antibodies against the proton pump (25). For KCC4, there was basolateral staining with some intracellular staining. Merge analysis clearly showed that both signals overlapped in the same cell but not in the same membrane, indicating that indeed KCC4 antibodies recognize KCC4

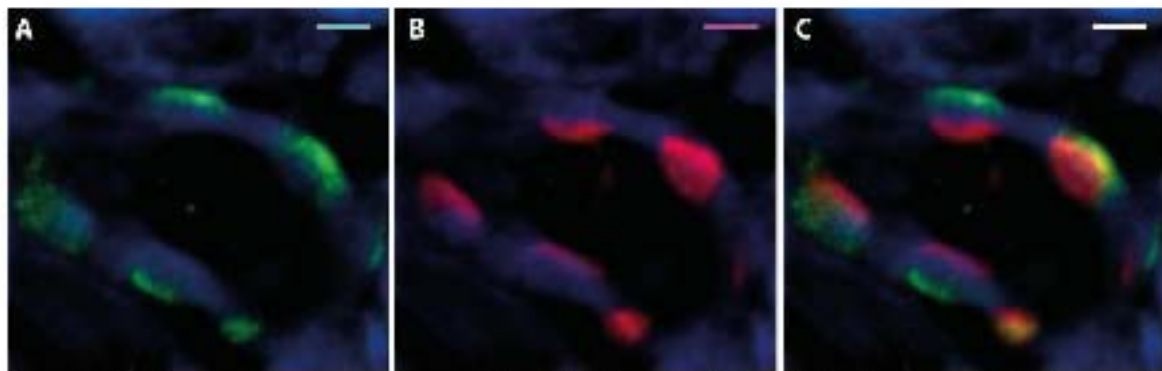


Fig. 6. Immunolocalization of KCC4 protein expression in rat kidneys. A: KCC4 antibody detected KCC4 protein (green) at the basolateral membrane of collecting duct cells. B: proton pump antibody labeled (red) the apical membrane of  $\alpha$ -intercalated cells from the collecting duct. C: dual labeling with KCC4 (FITC secondary) and NaATPase- $\beta$  antibody (Cy5 secondary) indicated that KCC4 is expressed in  $\alpha$ -intercalated cells from the collecting duct at the basolateral membrane, whereas the proton pump has an apical localization. Scale bars = 5  $\mu$ m.

expression in the basolateral membrane of  $\alpha$ -intercalated cells (Fig. 6C). As shown in Fig. 7, immunohistochemical analysis of sections from the renal outer medulla from animals with hyperglycemia or exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  revealed a similar pattern of increased expression of KCC4 in the basolateral membranes of  $\alpha$ -intercalated cells compared with control animals. Thus, metabolic acidosis is associated with increased expression of KCC4. Hyperglycemia also resulted in a similar observation. However, this result was unlikely to be due to increased glucose transport because no apical glucose transport occurs in this nephron region. Because hyperglycemia is often associated with metabolic acidosis, we believe that this could be secondary to acidosis, as observed in rats exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Finally,

the role of KCC4 in the acid secretion capacity of the collecting duct is also supported by the modulation of KCC4 activity by external pH. As shown in Fig. 8, oocytes injected with KCC4 cRNA, in which 2 days later we assessed  $\text{Cl}^-$ -dependent  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake during cell swelling, revealed that the higher the external pH, the lower the KCC4 activity.

**Groups 4 and 5: low- and high- $\text{K}^+$  diets.** Figure 9 shows representative Western blots and the corresponding densitometric analysis of total renal proteins from mice fed with either low- or high  $\text{K}^+$  diets for 4 days. Proteins were blotted with anti-KCC4 or anti-KCC3 antibodies, with  $\beta$ -actin as a loading and transfer control. No effect of changes in  $\text{K}^+$  diet was observed for either KCC4 or KCC3 expression.

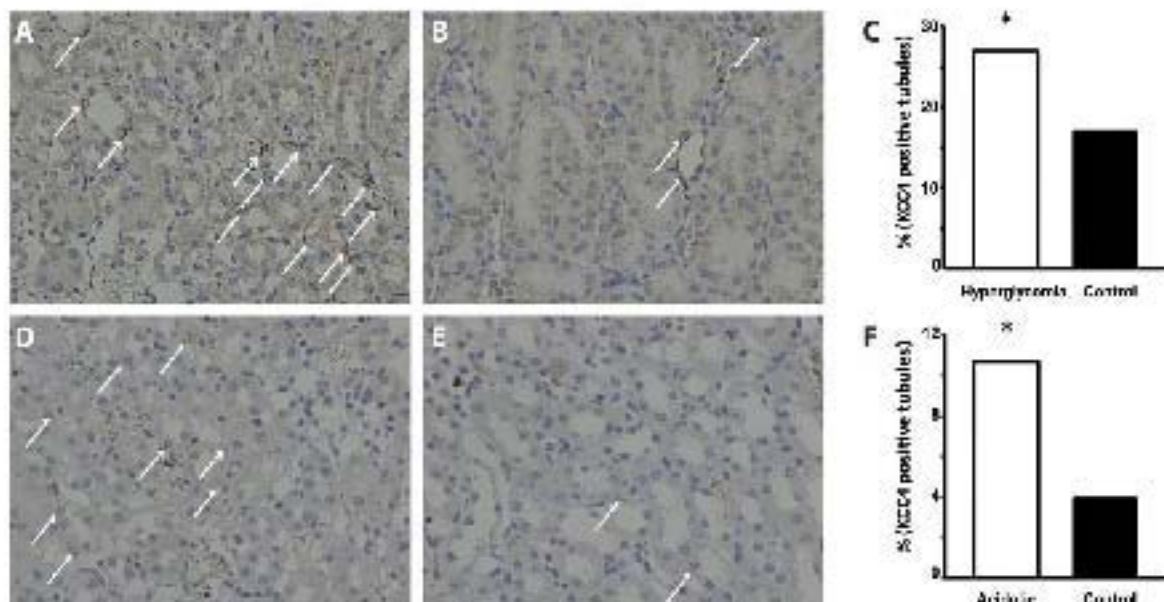


Fig. 7. Immunohistochemical analysis of renal outer medulla sections from hyperglycemic and acidotic rats. A and B: kidney slices from 812-treated (A) and vehicle-treated (B) rats exposed to anti-KCC4 antibody and detection solutions. Magnification:  $\times 40$ . C: semi-quantification of KCC4-positive tubules between KCC4 in hyperglycemic compared with control rats.  $^*P < 0.001$  vs. control rats. D and E: kidney slices from acidotic (D) and control (E) rats exposed to anti-KCC4 antibody and detection solutions. Magnification:  $\times 40$ . F: semi-quantification of KCC4-positive tubules between KCC4 in  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -treated compared with control rats.  $^*P < 0.001$  vs. control rats. KCC4-positive tubules are shown by the white arrows.

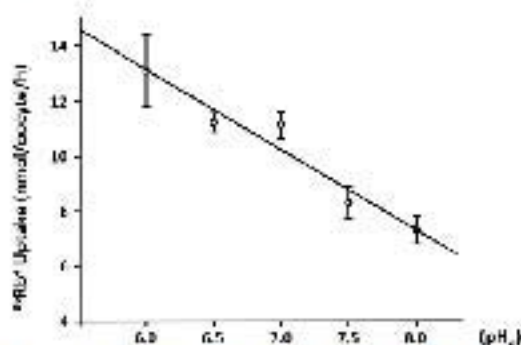


Fig. 8. KCC4 activity is modulated by external pH ( $\text{pH}_e$ ). *Macropus rufus* cosyetes were injected with 10 ng KCC4 cDNA to assess the effect of  $\text{pH}_e$  on  $\text{Cl}^-$ -dependent  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake during hypotonic conditions. Preuptake and uptake inhibitors were pH titrated from 6.0 to 8.0. A negative correlation between KCC4-mediated  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake and  $\text{pH}_e$  was found ( $r^2 = 0.91$ ,  $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

KCCs play important roles in cell volume regulation because they provide a pathway for ion efflux during RVDs in swollen cells (24). They are also critical for the modulation of the intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration, which is particularly important in neurons because the response to neurotransmitters acting on the postsynaptic ligand-gated  $\text{Cl}^-$  channel depends on the potential equilibrium of this anion. Additionally, inactivation mutations of KCC2 result in Andersen's syndrome, a severe inherited neurological disease with peripheral neuropathy as

sociated with agenesis of the corpus callosum (12, 25, 45). Because of this, a tremendous amount of information (10, 14, 22, 36, 45) has been produced in this area since the molecular identification of KCCs (5, 27). A third fundamental role for KCCs is transepithelial  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  transport. The expression of these transporters has been documented in several epithelial cells either at the apical or basolateral membranes (17). Recent work has suggested an important role for KCC3 and KCC4 in acid secretion in the stomach (13–15), KCC3 knockout mice develop arterial hypertension (44), and KCC4 knockout mice exhibit renal tubular acidosis (6). Despite these and the known expression of these transporters along the nephron, little is known about their physiological role in the kidney.

In the present study, we analyzed the effect of five different experimental models on the expression of KCC3 and KCC4 because the localization of these transporters along the nephron has already been described (6, 38, 39) and physiological studies (4, 21, 26, 48) have suggested the presence of KCCs in nephron regions and proposed potential roles for these membrane proteins.

We (38) have previously shown that KCC3 is heavily expressed along the basolateral membrane of the PCT and no other region of the nephron exhibits expression of this transporter. In contrast, KCC4, in addition to being expressed in PCT cells, is also present in the basolateral membrane of the TAL and  $\alpha$ -intercalated cells of the collecting duct (6, 49). Avison et al. (4) observed that in rabbit proximal tubule cells, the addition of glucose to the tubule suspension resulted in a significant increase of intracellular  $\text{Na}^+$  by 30% and a decrease

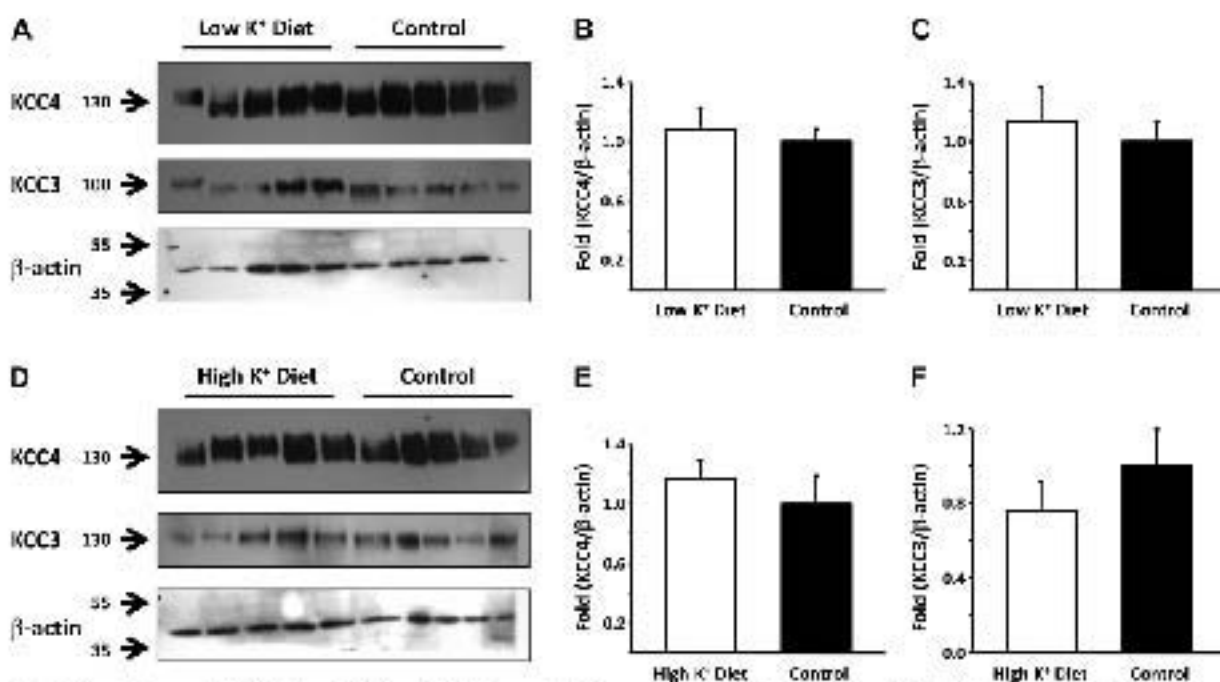


Fig. 9. Effect of low- and high- $\text{K}^+$  diets on KCC3 and KCC4 expression in the mouse kidney. *A*: Western blot analysis of KCC3 and KCC4 in whole kidneys of *C57BL/6* mice fed a control ( $n = 5$ ) or low- $\text{K}^+$  ( $n = 5$ ) diet. Blots were exposed to anti-KCC3 or anti-KCC4 antibodies, and anti- $\beta$ -actin used as a loading control. *B* and *C*: densitometric analysis of the KCC4 (*B*) and KCC3 (*C*) blots shown in *A*. *D*: Western blot analysis of KCC3 and KCC4 in whole kidneys of mice fed a control ( $n = 5$ ) or high- $\text{K}^+$  ( $n = 5$ ) diet. Blots were exposed to anti-KCC3 or anti-KCC4 antibodies, and anti- $\beta$ -actin used as a loading control. *E* and *F*: densitometric analysis of the KCC4 (*E*) and KCC3 (*F*) blots shown in *D*.

of intracellular  $K^+$  by a similar percentage. They defined the basolateral  $K^+$  efflux pathways that could explain this decrease and showed that at least part of the  $K^+$  efflux was  $Ba^{2+}$  insensitive and significantly reduced by furosemide or bumetanide at 1  $\mu$ M concentration but not at 10  $\mu$ M. By that time, Suzuki et al. (48) demonstrated the presence of a  $K^+$ -Cl $^-$  cotransport system in the basolateral membrane of the proximal tubules. In addition, from our characterization of KCCs, we know that  $K^+$  transport by KCC3 (38) and KCC4 (37) is  $Ba^{2+}$  insensitive and is inhibited by loop diuretics at 1  $\mu$ M but not at 10  $\mu$ M. We thus reasoned that KCC3 and/or KCC4 could serve as the basolateral KCC system, as both are known to be activated by cell swelling. This provides a pathway to increase the rate of glucose transport, as proposed by the diagrams shown in Fig. 10. In this scenario, the active entrance of  $Na^+$  and glucose through the apical membrane, which occurs together with water (33), would be expected to increase the cell volume. This, in turn, activates, probably among others, the basolateral  $K^+$ -Cl $^-$  pathway that extrudes  $K^+$ , which help to decrease the intracellular  $K^+$  concentration. This is done to keep  $Na^+$ - $K^+$  ATPase activity at maximum because the pump activity is highly sensitive to intracellular  $K^+$  (3). In a more chronic scenario, it could be possible that in the steady state of chronic hyperglycemia, the swelling effect of apical  $Na^+$ -glucose cotransport is offset by a loss of water basolaterally due to the 3  $Na^+$  out/2  $K^+$  in stoichiometry of the pump (the so-called "dehydrating effect of the pump"), an equimolar efflux of glucose, and  $K^+$ -Cl $^-$  loss via KCC3/KCC4. In this regard, we observed a significant increase in KCC3 but not KCC4 expression at both the mRNA and protein levels in hyperglycemic rats. Thus, our data suggest that it is predominantly KCC3, rather than KCC4, that is the cotransporter providing this regulatory effect in this portion of the kidney nephron. This is supported by the observations of Boeltger et al. (7) in a study in which the RVD in isolated perfused proximal straight tubules from wild-type, KCC3 $^{-/-}$ , and KCC4 $^{-/-}$  mice was compared. After exposure to hypotonicity, wild-type mice increased their cell volume by +10%. RVD was significantly impaired in KCC3 $^{-/-}$  mice, whereas it was

only marginally affected in KCC4 $^{-/-}$  mice. The antibody used in this study recognized both KCC3a and KCC3b variants of KCC3. Therefore, it is not known which one is increased. However, we (38) have previously observed that KCC3b is the predominantly expressed isoform in the kidney. We also showed in that study that there were basically no differences in the functional properties of these isoforms.

Data from *in vitro* perfused cortical TALs from rabbits allowed Greger and Schlatter (21) to propose the presence of a  $K^+$ -Cl $^-$  cotransport mechanism in the basolateral membrane. According to the results of immunofluorescence in the kidney, this seems to be KCC4 (6, 49). In the TAL, virtually all  $K^+$  enters the cell through the apical  $Na^+$ - $K^+$ -2Cl $^-$  cotransporter (NKCC2) and is recycled to the luminal fluid by apical  $K^+$  channels, such as the renal outer medullary  $K^+$  channel (ROMK) (18). Thus, KCC4 in the basolateral membrane is unlikely to be there for the purpose of trans-epithelial  $K^+$  transport. Reasonable possibilities for this are that KCC4 constitutes another pathway for Cl $^-$  extrusion of the cell or that it provides a mechanism for the basolateral extrusion of  $K^+$  that enters the cell through  $Na^+$ - $K^+$  ATPase. This would prevent an increase in the intracellular  $K^+$  concentration that inhibits the activity of the pump. In any case, KCC4 activity would be particularly required when salt reabsorption on the TAL is increased, as during a low-salt diet. Our data revealed a significant upregulation of KCC4 expression in total protein lysates of mice exposed to a low-salt diet. This observation suggests that KCC4 could be the cotransporter responsible for the previous proposal (21), that under activation of TAL salt transport capacity, a KCC plays a role in the cell's  $K^+$  and Cl $^-$  extrusion (Fig. 10).

Based on our data suggesting that KCC4 plays a role in salt reabsorption of the TAL, KCC4 could be a potential explanation for the difference in the age of onset of Bartter's syndrome type I or II, which begins at birth or before as polyhydramnios. This is in contrast to type III, which usually becomes apparent in the first year of life or later (22). Types I and II are due to inactivating mutations of NKCC2 and ROMK, respectively, which completely prevent salt reabsorption in the TAL. Type

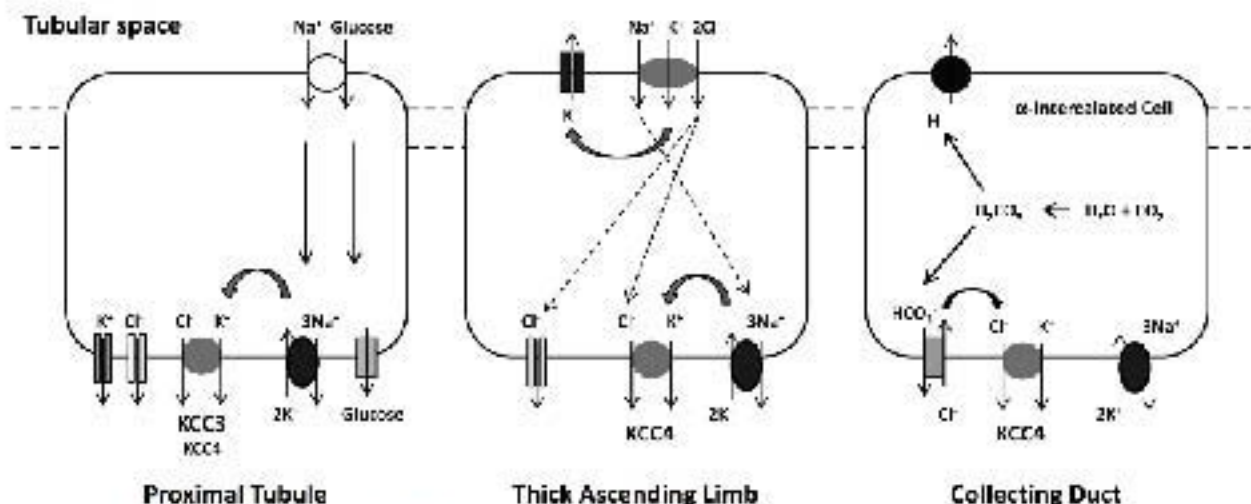


Fig. 10. Proposed roles for KCC3 and/or KCC4 in the kidney. See text for an explanation.



III is due to mutations in the basolateral  $\text{Cl}^-$  channel  $\text{ClC-Kb}$ , which prevents  $\text{Cl}^-$  extrusion from the cell and eventually reduces the activity of NKCC2 because this transporter is highly sensitive to the intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration (45). Hence, it is possible that KCC4 activity is able to maintain the intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration at a level that allows some activity of NKCC2 for some time after birth in children with Bartter's syndrome type III.

Regulation of the thiazide sensitive  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter during a low-salt diet and/or angiotensin II infusion is dependent on the presence of WNK4 kinase (8). The WNK4-induced inhibitory effect on the  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter is switched to stimulatory in the presence of angiotensin II (16). Because KCC1 activity is also inhibited by WNK1 (19), we took advantage of our WNK4 total knockout mouse model to explore whether the observed upregulation at a low-salt diet could also be dependent on WNK4. However, we observed that upregulation of KCC4 expression occurred in WNK4<sup>-/-</sup> mice similar to that in wild-type mice, indicating that this kinase is not required.

Our data support the proposal that KCC4 plays an important role in acid-base metabolism in the kidney. This was originally suggested by the fact that KCC4 knockout mice develop renal tubular acidosis (6). The expression of KCC4 at the basolateral membrane of  $\alpha$ -intercalated cells was increased in rats exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in drinking water and in hyperglycemic rats, which are known to be associated with a certain degree of metabolic acidosis. Additionally, the activity of KCC4 strongly negatively correlates with higher extracellular pH. Lower pH correlates with higher KCC4 activity (Fig. 8). Thus, our data are consistent with the model proposed by Boediger et al. (6), that KCC4 in the basolateral membrane of  $\alpha$ -intercalated cells of the collecting duct could be critical for keeping the intracellular concentration of  $\text{Cl}^-$  low so that basolateral  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger remains active. This serves to exclude  $\text{HCO}_3^-$  from the cell, allowing the continuous production of  $\text{H}^+$  to be secreted in the apical membrane (Fig. 10).

A previous study (47) has shown that KCC1 expression at the basolateral membrane of the colonic epithelium is increased during a low- $\text{K}^+$  diet, suggesting that KCC1 might play a role in  $\text{K}^+$  absorption in this circumstance. We found, however, no change in KCC3 or KCC4 expression in the kidney after exposing mice to both low- and high  $\text{K}^+$  diets, suggesting that these cotransporters probably are not involved in the renal response to changes in dietary  $\text{K}^+$ , in which the roles of  $\text{K}^+$  channels have been extensively demonstrated (25). Finally, a potential role for a KCC transporter in the DCT remains to be elucidated. Amorim et al. (2) obtained evidence for a  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransport mechanism in the apical membrane of the DCT that could be of particular importance to  $\text{K}^+$  secretion during low  $\text{Cl}^-$  concentration states. However, expression of neither KCC3 nor KCC4 was observed in the apical membrane of the DCT. One possibility is that KCC1 could be the transporter responsible for this observation, but a detailed analysis using an anti-KCC1 antibody has been performed in renal tissue.

In summary, our data are consistent with proposals stating that specific KCCs play a role in glucose, salt, and acid-base metabolism in the kidney.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This authors thank Dr. Norma Uribe, Ricardo Aguirre, and Susana Rodríguez for the technical help with the histopathological preparations, Gabriel Cossío-Mendoza for confocal microscopy, and Jonathan Bernado-Chined for real-time PCR. The anti-VATPase B and anti-secretin  $\alpha$ -transcribed cell antibodies were gifts from Mónica Meléndez.

This work was presented in part at Experimental Biology Meetings in San Diego, CA, in 2012 and in Boston, MA in 2013.

#### GRANTS

This work was supported by Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) Grants 15250 (to A. Morade) and 110810 (to G. Granizo) and by National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grant T14-DK-070754 (to D. B. Mount). Z. Melo was supported by a scholarship from CONACYT, Mexico and is a graduate student in the Biochemical Science PhD program of the Universidad Nacional Autónoma de México.

#### DISCLOSURES

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

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: Z.M., R.R., D.B.M., H.P.M., A.M., and G.G. conception and design of research; Z.M., S.C.R., R.R., N.V., M.C., D.A.M., and G.G. performed experiments; Z.M., S.C.R., R.R., N.V., M.C., D.B.M., A.M., and G.G. analyzed data; Z.M., S.C.R., R.R., N.V., M.C., D.B.M., H.P.M., A.M., and G.G. interpreted results of experiments; Z.M., S.C.R., V.C.-D., A.M., and G.G. prepared figures; Z.M., A.M., and G.G. drafted manuscript; Z.M., S.C.R., A.M., and G.G. edited and revised manuscript; Z.M., S.C.R., R.R., N.V., M.C., D.B.M., H.P.M., A.M., and G.G. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

- Amorim J, Amorim M, Honeckey M, Lutschner M, Knudsen B, Mue D, Prütz PA, Agreus R, Dammrich M. The sodium-coupled NHE3 protein shuttles to and kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 271: F917–F925, 1996.
- Amorim JB, Bailey MA, Musa-Aziz R, Giebisch G, Malin G. Role of luminal anion and pH in distal tubule potassium secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F581–F588, 2003.
- Aprilia A. 2011. Human South Asian: to screen and prevent chronic and acute renal failure. *Indian J Physiol Occup Physiol* 55: 195–199, 2011.
- Ashton MJ, Gullans SR, Oprian T, Giebisch G.  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  fluxes stimulated by  $\text{Na}^+$ -coupled glucose transport, evidence for a  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{K}^+$  exit pathway in rabbit proximal tubules. *J Membr Biol* 105: 199–202, 1988.
- Baouze P, Arokkainen MS, Kivonen U, Kalli K. Calcium chloride cotransporter and channels. *Channels* 6: 87–93, 2006.
- Bautzger T, Hübner CA, Müller H, Rost MK, Beck TX, Jentsch TJ. Deletion and renal tubular acidosis in mice lacking the  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter Kcc4. *Nature* 416: 874–878, 2002.
- Bautzger T, Rost MK, Moker H, Seifenhedder T, Schwitzer M, Keating DJ, Faulhaber J, Elmke H, Pfeider C, Scheel O, Lemke B, Hübner J, Leisner R, Page BC, Volkl H, Hübner CA, Jentsch TJ. Loss of  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced survival threshold. *EMBO J* 22: 5425–5434, 2003.
- Castaneda-Bueno M, Carvajales-Pérez LG, Vasquez N, Uribe N, Kamavara S, Morla T, Bahallilla NA, Douret A, Alsi DR, Gamboa G. Activation of the renal  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 7929–7934, 2009.
- De Luca-Harris P, Kahl KT, Rindhart J, Bahallilla NA, Vasquez N, San Cristobal P, Mount DB, Latham RP, Holbert SC, Gamboa G. WNK5 regulates the basally required for  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter activation via a thiazide-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1976–1981, 2004.
- Delpire E, Mount DB. Human and mouse phenotypes associated with defects in cation chloride cotransport. *Ann NY Acad Sci* 64: 330–345, 2000.
- Dunham PB, Ellory JC. Passive potassium transport in low-passed in sheep red cells: dependence upon cell volume and chloride. *J Physiol* 318: 511–520, 1981.

12. Dupre N, Howard HC, Mathieu J, Karpati G, Vanasse M, Bouchard JP, Carpenter S, Boulton GA. Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol* 54: 9-18, 2003.
13. Fujii T, Fujita K, Takeguchi N, Sakai H, Fumoto H. K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter in the acid-secreting mechanism of gastric parietal cells. *Mol Brain Res* 44: S11-S12, 2011.
14. Fujii T, Takahashi Y, Ikari A, Morii M, Tabuchi Y, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H. Functional association between K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter-4 and H<sup>+</sup>-ATPase in the apical membrane of gastric parietal cells. *J Biol Chem* 284: 610-619, 2009.
15. Fujii T, Takahashi Y, Ikari Y, Fujita K, Morii M, Tabuchi Y, Asano S, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H. K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter-3a up-regulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in lipid rafts of gastric fundal parietal cells. *J Biol Chem* 282: 6809-6817, 2007.
16. Gagnon KB, Delpire E. Physiology of NKCC1 cotransporter: lessons from inherited human genetic mutations and genetically engineered mouse models. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C105-C114, 2012.
17. Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of the electrogenic cation-chloride cotransporter. *Physiol Rev* 85: 423-490, 2005.
18. Gamba G, Friedman PA. Thick ascending limb: the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Physiol Rev* 89: 61-76, 2009.
19. Garzon-Mendi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno F, Delpire E, Gamba G. WNK4 kinase is a negative regulator of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1197-F1207, 2007.
20. Gillen CM, Bell S, Payne JA, Furlough TB. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 273: 16337-16344, 1998.
21. Greger R, Schlatter E. Topography of the apical membrane in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Physiol Rev* 39: 523-561, 1983.
22. Hebert SC. Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 547-554, 2003.
23. Hebert SC, Desir G, Gleiblich G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 82: 319-371, 2002.
24. Hoffmann EK, Lambert IH, Pallesen SE. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Regulul Res* 88: 163-177, 2009.
25. Howard HC, Mount DB, Buchdahl D, Byun N, Dupre N, Lu J, Fan X, Song L, Riviero JB, Pevsner C, Horst J, Simionati A, Landis B, Welch R, England R, Zhou TD, Maricich A, Sessa WB, George AL, Jr, McDonald MP, Bouchard JP, Mathieu J, Delpire E, Boulton GA. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe prepubertal neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Dev Genet* 32: 391-392, 2002.
26. Ishihashi K, Bector FC, Jr, Barry CA. Chloride transport across the apical membrane of renal proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F1590-F1578, 2000.
27. Kahle KT, Staley KJ, Nabel BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB. Roles of the cation chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4: 490-505, 2008.
28. Karadshah MI, Byun N, Mount DB, Delpire E. Localization of the KCC4 potassium chloride cotransporter in the nervous system. *Neurosci Lett* 325: 381-391, 2004.
29. Karamanlyak EB, Hersons DJ, Mallory G. The synthesis of <sup>14</sup>C-styrene-oxidase and its distribution and quantitation in the rat. *Biochem J* 142: 675-683, 1974.
30. Krogsgaard DM. The response of duck erythrocytes to hypertonic media. Further evidence for a volume-regulating mechanism. *J Gen Physiol* 38: 305-313, 1971.
31. Laif PK, Tsug BE. A fibroblast-dependent K<sup>+</sup> flux induced by N-ethylmaleimide is genetically low K<sup>+</sup> sheep and goat erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 1427-1428, 1981.
32. Liyak MJ, Schmittgen TB. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods* 25: 102-108, 2001.
33. Loike JD, Hildeman S, Kwang K, Xu M, Cao L, Vera JC, Silverstein SC, Fischberg J. Sodium glucose cotransporter display volume and pH/Cl<sup>-</sup> dependent water permeability. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C1771-C1779, 1996.
34. Mdelcorder Hernandez MB, Barrios ML, Orozco LA, Luna Arias JP. The vascular ATPase from *Feathered ibis*: molecular cloning of the gene encoding for the β subunit and its subcellular localization in its protein. *BMC Microbiol* 8: 232, 2008.
35. Maricich A, de Los Heros P, Vazquez N, Mendi T, Mount DB, Gamba G. Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of *Yersinia enterocolitica*. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C670-C680, 2001.
36. Maricich A, Mount DB, Gamba G. Electrogenic cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res* 29: 17-25, 2004.
37. Maricich A, Song L, Vazquez N, Mount DB, Gamba G. Functional comparison of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem* 275: 20226-20234, 2000.
38. Mercedo A, Vazquez N, Song L, Cortes R, Enck AB, Welch R, Delpire E, Gamba G, Mount DB. Anionic channel heterogeneity in the KCC2 K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1248-F1251, 2005.
39. Morano G, Morina A, Maricich A, Herrera JP, Gomez Salazar J, Cortes Renteria R, Hebert SC, Gamba G. Bicoumplement Na<sup>+</sup> couple cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism. *Hypertension* 31: 1007-1010, 1998.
40. Mount DB, Maricich A, Song L, Xu J, George Delpire E, Jr, Gamba G. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16357-16362, 1999.
41. Nowell M, Kampik NB, Alhulaybi M, Eladidi B, Wessner CA. Induction of tubulohyalinosis with ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) in mice and rats: species differences and technical considerations. *Cell Physiol Biochem* 26: 1059-1071, 2005.
42. Osorio H, Coronel I, Arellano A, Frazao M, Escalante B, Barchiesi R. Ursodeoxycholic acid decreases sodium glucose cotransporter (SGLT2) expression and oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Diab Res Clin Pract* 93: 376-380, 2010.
43. Ponce-Coria J, San Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, De Los Heros P, Juarez P, Blumiz E, Michel G, Boudadilla NA, Gimenez I, Lifton RP, Hebert SC, Gamba G. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK1 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8457-8462, 2008.
44. Rast MB, Faulkner J, Rudack MK, Phaffes U, Maritzen T, Didi M, Beck FX, Bostiger T, Schuster R, Elmke H, Jonckheer TJ, Haller CA. Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res* 98: 549-556, 2006.
45. Salin-Camargue A, Riviero JB, Shukarali M, Ruckhoff S, Dhaul N, Lacomere J, Grudet R, Rochefort D, Lescr G, Gaspar C, Dion PA, Lapointe JY, Ronkeau GA. Trash defect of potassium-chloride cotransporter 3 is a major pathogenic mechanism in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *J Biol Chem* 286: 28156-28165, 2011.
46. San Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi TH, Chao D, Kahle KT, Long Q, Boudadilla NA, Hebert SC, Alessi DK, Lifton RP, Gamba G. Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4384-4389, 2009.
47. Sangra P, Brill SR, Sangra S, Faruqi B, He, Bishar HJ. Basolateral K-Cl cotransporter regulates water potassium absorption in potassium depletion. *J Biol Chem* 275: 30815-30816, 2000.
48. Suzuki S, Ishihashi K, Yoshitama N, Shihata T. KCl cotransport across the basolateral membrane of rabbit renal proximal straight tubules. *J Clin Invest* 81: 194-199, 1988.
49. Velazquez H, Silva T. Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: expression in distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: 199-208, 2002.

## Discusión

Entre las funciones más importantes de los KCCs se encuentra su participación en la regulación del volumen celular, promueven la salida de iones durante el proceso conocido como RVD resultado del hinchamiento celular. Participan también en el proceso de modular la concentración intracelular de  $\text{Cl}^-$ , crucial especialmente en neuronas, cuya respuesta a la interacción de neurotransmisores como GABA con sus receptores es fundamental para la excitabilidad neuronal. La tercera función de estos cotransportadores está relacionada con el transporte transepitelial de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .

Al respecto se conoce que estos cotransportadores están fuertemente expresados en epitelios como en intestino, conducto pancreático y estomago donde se conoce que juega un papel fundamental para la correcta secreción de ácido. La función epitelial en este aspecto se correlaciona con la expresión del KCC. Así cuando existen mutaciones inactivantes en KCC3 se produce una enfermedad hereditaria del sistema nervioso que cursa con neuropatía periférica asociada a la poca o nula formación del cuerpo caloso. Aunque se conoce que el ratón con deficiencia de KCC3 presenta hipertensión y que el ratón deficiente de KCC4 presenta acidosis tubular renal, pocos estudios se han enfocado en conocer aspectos moleculares de estos cotransportadores en el riñón. Estas funciones son altamente moduladas por procesos mediados por cinasas y fosfatasas, es así como la defosforilación de sitios específicos promovida por hipotonicidad e hinchamiento celular, inhibición de cinasas o activación de fosfatasas activa a estos cotransportadores lo que resulta en disminución del  $\text{Cl}^-$  intracelular, el volumen celular y un transporte transepitelial efectivo de iones.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, esta tesis está dirigida a mostrar un aspecto molecular de la regulación de los KCCs, que resulta crucial para entender el proceso de activación/inactivación, el hallazgo de la defosforilación de un nuevo sitio antes no descrito que es importante para la completa activación de KCC3, durante procesos como el hinchamiento celular y por otra parte la explicación del papel fisiológico de los KCCs en el riñón (KCC3 y

KCC4). Empleando modelos experimentales in vivo logramos obtener datos acerca de su participación en procesos como la salida de hidrogeniones hacia la orina y el control del volumen celular en células que transportan cargas grandes de glucosa y necesariamente sufren cambios importantes en el volumen.

Estudios previos demostraron la existencia en riñón de KCC3 únicamente en membranas basolaterales del TCP sin que ninguna otra región de la nefrona muestre expresión de esta proteína. Por su parte KCC4 se encuentra expresado en células del TCP, membrana basolateral de las células de asa de Henle y células alfa-intercaladas de conducto colector. Hace poco más de dos décadas, Avison y colaboradores usaron túbulos proximales de riñón de conejo incubados en una solución amortiguadora a los que se le agregaba una concentración final de glucosa de 7 mM y encontraron que se activaba la entrada de  $\text{Na}^+$  que a su vez estimula el flujo de  $\text{K}^+$  hacia el exterior de la célula (6). Los flujos de  $\text{K}^+$  fueron caracterizados por ellos en ese momento analizando el efecto de diversos inhibidores conocidos del transporte de  $\text{K}^+$ . Se usó furosemida y bumetanida a diferentes concentraciones (10  $\mu\text{M}$  -10 mM), digitonina y bario. También se encontró que este transporte no era sensible a  $\text{Ba}^+$ . Se probó el efecto del diurético furosemida y su análogo la bumetanida a concentración de 10  $\mu\text{M}$  y tampoco encontraron consecuencia sobre la pérdida basolateral de  $\text{K}^+$ , sólo la presencia de concentraciones más altas (1mM) de estos diuréticos logró inhibir significativamente este transporte.

Por otro lado el estudio de Sasaki y cols. en 1988 mostró un mecanismo de cotransporte basolateral de  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$  en túbulos proximales que se da de manera electroneutra proponiendo en ese momento la existencia de un cotransportador que ejerciera esta función (110). En relación a estos estudios, la caracterización hecha por Mercado y cols. presenta a KCC3 expresado en túbulo proximal y como un cotransportador capaz de operar incluso en presencia de  $\text{Ba}^+$  y que su inhibición por diuréticos de asa como furosemida es dada sólo en concentraciones milimolares (8). Estos hallazgos concuerdan con los estudios hechos décadas atrás y nos han permitido relacionar a los KCCs (KCC3 o KCC4) con la función de

reducir en las células la concentración de  $K^+$  y  $Cl^-$  a fin de regular su volumen cuando se da la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal lo que se acompaña con la entrada de agua (111) y como resultado aumente el volumen celular de manera similar a lo que sucede en condiciones de hipotonicidad, donde los KCCs están plenamente activados ayudando a la salida efectiva de  $K^+$ . Esta salida se da a través de un KCC que podría ser KCC3 o KCC4 y a su vez mantiene activa la función de la  $Na^+ : K^+ - ATPasa$  proteína sensible a las concentración intracelular de  $K^+$  (112).

Nuestros resultados apuntan a que esta función de cotransporte está mediada en su mayoría por KCC3, que en riñón sólo se expresa en el túbulo proximal. Debido a que encontramos que KCC3 en condiciones de hiperglicemia inducida con estreptozotocina aumenta significativamente su expresión tanto a nivel de RNAm como en niveles de proteína en la corteza renal donde se encuentran ubicados los túbulos proximales. Esto no sucedió en el caso de KCC4 cuya expresión no mostró un cambio significativo; esto sugiere que KCC3 es el cotransportador directamente responsable de realizar esta función en esta porción de la nefrona. Nuestros hallazgos son sustentados por estudios previos de Boettger y cols. que usando células de túbulo proximal de ratón deficiente de KCC3 y KCC4 compararon la respuesta al hinchamiento cuando las expusieron a hipotonicidad aumentando el volumen celular alrededor de un 10%. El resultado fue contundente al ver que células de ratón silvestre retornaban al volumen inicial en menos de tres minutos después del estímulo. Las células de ratón deficiente de KCC3 sólo recuperaban cerca de la mitad del volumen que se necesitaba para el volumen inicial; sin embargo, las células deficientes de KCC4 no tenían el defecto tan marcado en la regulación del RVD (66). Con respecto a la isoforma de KCC3 implicada en el desarrollo de estas funciones en túbulos proximales, en nuestro estudio no podríamos definir una diferencia porque tanto el anticuerpo usado para los estudios a nivel de proteína como la sonda usada para PCR en tiempo real reconocen tanto a KCC3a como a KCC3b, sin embargo estudios previos de Mercado y colaboradores en nuestro laboratorio demuestran que KCC3b es la

isoforma predominante en riñón y además que sus características funcionales son básicamente las mismas (8).

En 1983, Greger y Schlatter en su publicación de un modelo que describe las propiedades de la membrana basolateral de la porción ascendente gruesa cortical del asa de Henle (TALH), proponen la existencia de un mecanismo de cotransporte de  $K^+$  y  $Cl^-$  que apoya la reabsorción de sal en esa porción de la nefrona (113). Algunos estudios muestran localización por inmunofluorescencias de una proteína que efectúa el transporte basolateral en este sitio y podemos suponer que es KCC4 (7). En TALH se reabsorbe alrededor del 30% de la sal filtrada a través del cotransportador NKCC2 (114), que principalmente se expresa en la membrana apical de estas células y también transporta casi en su totalidad el potasio que pasa por esta región. El  $K^+$  es reciclado hacia la luz tubular por el canal apical ROMK (por sus siglas en inglés renal outer medullary  $K^+$  channel).

Poco se sabe acerca de la relación entre la función de NKCC2 y KCC4 pero un modelo matemático realizado por Alan Weinstein en el 2010 que se basó en los datos cinéticos publicados acerca de la función de estos cotransportadores, sugiere fuertemente la participación de KCC4 a la modulación de la reabsorción de sal en TALH (115-117), constituyendo así otra vía para el paso transcelular de  $Cl^-$  lo que permite la correcta función de la  $Na^+ : K^+ - ATPasa$  al reciclar el  $K^+$  hacia el intersticio, disminuyendo la concentración intracelular de este ion. Nuestros resultados muestran que existe un aumento significativo en la expresión de KCC4 en ratones expuestos a dieta baja en sal, lo que nos permite sugerir que la función de este cotransportador es necesaria para la correcta reabsorción de sal en TALH. Estudios de nuestro grupo han mostrado que la activación del cotransportador sensible a tiazidas (NCC) en condiciones de dieta baja en sal o por la infusión de angiotensina II es mediada por la presencia de la cinasa WNK4 (118) (105). Además conocemos también que WNK4 inhibe la actividad de KCC4 a un 50% en condiciones de hipotonicidad, una inhibición que depende de la actividad catalítica de la cinasa (119), lo que coloca a WNK4 como un regulador negativo sobre la función de los KCCs renales. Conociendo esto, empleamos el modelo de ratón

deficiente de WNK4 disponible en nuestro laboratorio y estudiamos el efecto de la dieta baja en sal en la expresión de KCC4 en estos animales. El aumento resultante de la expresión de KCC4 en este ratón al igual que en el silvestre, demuestra que esta cinasa no es necesaria para que se de regulación de la expresión y actividad de KCC4.

La implicación de KCC4 en metabolismo ácido-base en el riñón podría ser una de sus funciones más importantes. Fue sugerida por el hecho de que el ratón  $KCC4^{-/-}$  desarrolla acidosis tubular renal. Nuestros resultados apoyan esta propuesta considerando que tanto en ratones como en ratas expuestas a cloruro de amonio en el agua de beber y en animales con hiperglicemia inducida donde se desarrolla acidosis metabólica, incrementa la expresión de KCC4 específicamente en membranas basolaterales de células alfa-intercaladas. Nuestros experimentos in vitro con ovocitos de *Xenopus laevis* muestran una correlación de la actividad de KCC4 con el pH extracelular. Es así como a menor pH es mayor la función de KCC4. Esta función optimizada en pH ácido en conjunto con un aumento en la expresión en estados de acidosis metabólica confirma el mecanismo propuesto anteriormente en el que se postula a KCC4 como proteína importante para mantener activa la excreción de protones producidos en células alfa-intercaladas mejorando así mismo la función del intercambiador  $Cl^{-}/HCO_3^{-}$  al disminuir la concentración de  $Cl^{-}$  intracelular.

Por otro lado esta tesis aborda el punto de vista molecular proponiendo que la activación completa de KCC3 mediada por hinchamiento celular consecuente de hipotonicidad sólo se alcanza una vez se dé la defosforilación de tres diferentes residuos. Dos han sido notificados previamente por Rinehart y cols. y están ubicados en el dominio carboxilo terminal de KCC3a y son las treoninas 991 y 1048 (91). El tercer residuo propuesto por primera vez en esta tesis está localizado en el dominio amino terminal y es la serina 96. En su trabajo Rinehart y cols. argumentaron que las dos treoninas antes comentadas eran suficientes para la completa activación de KCC3a. En el estudio usaron el modelo de células HEK-293 para expresar a KCC3a y las formas mutadas de las treoninas por alaninas a

fin de generar desfosforilación. Con la doble mutante KCC3a T991A/T1048 observaron que presentaba mayor función que la clona silvestre y su función en isotonicidad alcanzaba la misma que en hipotonicidad. Nuestros resultados usando el modelo de ovocitos de *Xenopus laevis* fueron diferentes. Aunque sí se nota un aumento significativo en la actividad de la doble mutante KCC3a T991A/T1048 en condiciones de isotonicidad, también pudimos ver que esta activación es superada en hipotonicidad. Este incremento además es sensible a la cinasa WNK3, lo que fue de especial interés porque las dos treoninas aparentemente únicas ya estaban mutadas y no podían ser fosforiladas por esta cinasa. Hallazgo que sugería la presencia de otro sitio de fosforilación. Uno de los datos más importantes que podían argumentar la razón de la diferencia en resultados de nuestro trabajo es el tiempo de exposición a hipotonicidad en el que se realizaron los experimentos. Rinehart y cols. usaron un total de ocho minutos mientras que nuestros experimentos son realizados con 30 minutos de pre-captación y una hora de captación, ya que el tiempo de exposición a hipotonicidad se asocia con la activación del cotransportador.

De igual manera estas diferencias en tiempos de activación se pueden explicar experimentalmente, es por eso que nuestros datos demuestran que a tiempos cortos de exposición a hipotonicidad no hay diferencias entre el KCC3a silvestre y el doble mutante KCC3a T991A/T1048; sin embargo, con tiempos suficientes de activación (30 minutos) se observa una activación total del cotransportador silvestre que no puede ser alcanzada por el doble mutante. Este resultado también apoya la sugerencia de un tercer sitio de fosforilación involucrado en la actividad de KCC3a. Únicamente cuando mutamos las dos treoninas junto con la serina 96 encontramos a un cotransportador totalmente activo en isotonicidad, igualando su función en hipotonicidad. La mutación sencilla de la Ser-96 no muestra cambios importantes en la función en comparación con KCC3a silvestre. La triple mutante de KCC3a es por tanto funcional en isotonicidad y ya no puede ser inhibida por la cinasa WNK3. Nuestro trabajo usando fosfo-anticuerpos contra la Ser-96, Thr-991 y Thr-1048, es el primero en demostrar la fosforilación directa de WNK3 sobre KCCs. De forma congruente con



la poca o nula función de KCC3a, encontramos que en condiciones de isotonicidad los tres sitios se encuentran fosforilados y que son estos mismos los que se desfosforilan bajo la exposición a hipotonicidad. Lo que confirma directamente que los cambios en estos tres sitios manejan la activación del cotransportador. En presencia de la cinasa WNK3, cinasa de cual conocemos que es un potente inhibidor de los KCCs (82) los tres sitios se muestran fosforilados, dato que es consistente con la inhibición en la actividad del cotransportador mediada por esta cinasa. Estos datos fueron reproducibles tanto en ovocitos de *Xenopus* como en células HEK-293.

La importancia de la presencia de este sitio radica en que se puede evidenciar que KCC3 en algunas circunstancias va a ser regulado más detallada en función de su localización y la isoforma implicada. Como se revisó en la introducción de esta tesis, existen isoformas de KCC3 creadas por empalme alternativo, de especial interés en KCC3-x2M cuya principal característica es la ausencia del exón 2, aquí es donde se encuentra localizada la Ser-96 y se expresa en diversos tejidos. Dado que en el exón 2 se encuentra presente la Ser-96. Una característica de esta isoforma de KCC3 reportada por Mercado y cols. es que se activa más rápido que la isoforma que si contiene este exón (8), sumado a esto nuestros resultados sugieren que la presencia de la Ser-96 hace que el KCC3a necesite más tiempo de activación porque hay un tercer sitio que debe ser desfosforilado. Así entonces este sitio determina esas diferencias en regulación de la respuesta a cambios en el volumen celular dependiendo del tejido en el que se esté necesitando.

## **Conclusiones**

Con los datos presentados en esta tesis pudimos concluir que en la regulación de KCC3 el sitio S96 juega un papel importante para la total activación del cotransportador cuando la célula es sometida a hinchamiento por hipotonicidad. En la fosforilación de este sitio participa la cinasa WNK3, mediando inhibición de la actividad de KCC3.

En relación con la fisiología renal, el presente trabajo aportó datos que demuestran la participación de los KCCs en los siguientes procesos:

1. Como mecanismo de transporte de  $K^+$  y  $Cl^-$  en respuesta a aumentos de volumen celular por hiperglicemia.
2. En la reabsorción de sal a nivel de asa de Henle.
3. En la regulación del metabolismo ácido-base en células alfa-intercaladas.

## **Perspectivas**

Desde la clonación de los KCCs, han sido objeto de estudio con el fin de entender su actividad y regulación. Los resultados sumando los obtenidos en el desarrollo de esta tesis concluyen que es un proceso altamente regulado y uno de los principales factores estudiados es el estado de fosforilación de estas proteínas.

Previamente se ha documentado que la fosforilación de los KCCs es determinada por la presencia de las cinasas WNKs. WNK2, WNK3 y WNK4 inhiben directamente la actividad de los KCCs fosforilandolos sobre sitios específicos en su secuencia. Aunque ya se conocen los efectos de la mayoría de los miembros de esta familia de cinasas sobre los KCCs, aun no se conoce que sucede sobre la función de los KCCs en presencia de WNK1. Es por esta razón que un objetivo en el futuro es probar los efectos de WNK1 sobre la actividad de los KCCs en diferentes modelos celulares.

Los KCCs son proteínas distribuidas ampliamente en diferentes tejidos, por lo que es probable que la fosforilación no sea el único cambio postraducciona que puedan sufrir en su estructura, con el fin de regular su función. Resulta entonces de gran interés investigar si otras modificaciones están implicadas en la activación o en mejorar la función de estos cotransportadores.

## **Apéndices**

A continuación se presenta una lista del material publicado durante el transcurso del doctorado, incluyendo artículos tanto originales como de revisión y capítulos en libros, así como también trabajos presentados en congresos. Se incluye el artículo original publicado durante el primer periodo del doctorado.

## Artículos Publicados

**RIC** revista de investigación clínica. Autor correspondiente

- Pathophysiological aspects of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters.  
Mercado A y **Melo Z**. Artículo de revisión. Aceptado para publicación en enero de 2014.

**AJP Renal**. Primer autor

- Molecular evidence for a role for K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters in the kidney  
**Melo Z**, Cruz-Rangel S, Bautista R, Vázquez N, Castañeda-Bueno M, Mount DB, Pasantes-Morales H, Mercado A, Gamba G. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013, 305: F1402-F1411.

**JBC**. Primer autor

- N-terminal Serine Dephosphorylation Is Required for KCC3 Cotransporter Full Activation by Cell Swelling  
**Melo Z**, De los Heros P, Cruz-Rangel S, Vázquez N, Bobadilla NA, Pasantes-Morales H, Alessi DR, Mercado A, Gamba G.. *J Biol Chem*. 2013, 288:31468-31476.

**AJP Cell**. Primer autor en igual contribución.

- Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters.  
Cruz-Rangel S, **Melo Z**, Vázquez N, Meade P, Bobadilla NA, Pasantes-Morales H, Gamba G, Mercado A. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Sep;301(3):C601-8.

## Capítulos en libros

- Relevancia del laboratorio clínico y molecular en la salud del adulto mayor. Gerontología, primera edición. Universidad autónoma del estado de Hidalgo. Pachuca 2011.

## Trabajos presentados en congresos

### Presentaciones orales

- LX reunión anual del instituto mexicano de investigaciones nefrológicas-Acapulco, México (Noviembre de 2010).  
**Melo Z.** De los Heros P, Vazquez N. Gamba G. y Mercado A. La serina 96 es un sitio importante que regula la actividad de KCC3a.
- Reunión anual de la sociedad latinoamericana de nefrología e hipertensión (SLANH), Cartagena de Indias, Colombia (Abril de 2012).  
**Melo Z.** De los Heros P, Vazquez N. Alessi D. Gamba G. y Mercado A. La serina 96 es un sitio importante que regula la actividad de KCC3a.
- Reunión de las sociedades de biología experimental 2012, San Diego, California (Abril 2012).  
**Melo Z.** Vázquez, N. Gamba, G. y Mercado A. Physiological aspects of renal K Cl cotransporters regulation.
- Reunión nacional de investigadores de la Secretaría de Salud, Acapulco México (Diciembre 2012).  
**Melo Z.** Bautista R. Gamba, G. y Mercado A. Aspectos fisiológicos de la regulación de los cotransportadores renales de KCl
- Reunión nacional de investigadores de la Secretaría de Salud, Acapulco, México (Octubre 2013).  
**Melo Z.** De los Heros P. Gamba, G. y Mercado A. Defosforilación de una serina N-terminal es requerida para activación de KCC3 por hinchamiento celular.
- LXII reunión anual del instituto mexicano de investigaciones nefrológicas, Cancún, México (Noviembre 2013).  
**Melo Z.** De los Heros P, Vazquez N. Gamba G. y Mercado A. Hiperglicemia, dieta baja en sal y acidosis metabólica incrementan la expresión de los KCCs en el riñón.

### Presentaciones en cartel

- Semana renal de la sociedad Americana de nefrología 2010, Denver, Colorado (Noviembre 2010).  
**Melo Z.** Cruz-Rangel S. Pasantes H. Vazquez N. Ponce-Coria J. Mercado A y Gamba G. Efectos similares de las isoformas de WNK3 sobre los cotransportadores SLC12.
- LIX reunión anual del instituto mexicano de investigaciones nefrológicas, Acapulco, México (Noviembre 2010).  
**Melo Z.**, S. Cruz-Rangel, H. Pasante, N. Vazquez, J. Ponce-Coria, A. Mercado y G.Gamba. Efectos similares de las isoformas de WNK3 sobre los cotransportadores SLC12.
- Reunión de las sociedades de biología experimental 2012, San Diego, California (Abril 2012).

- Melo Z.**, N. Vázquez, G. Gamba, y A. Mercado. Physiological aspects of renal K Cl cotransporters regulation.
- Reunión de las sociedades de biología experimental 2013, Boston, Massachusetts (Abril 2013).  
**Melo Z.**, R. Bautista, S. Cruz-Rangel, N. Bobadilla, G. Gamba y A. Mercado. Hyperglycemia, low salt diet, and metabolic acidosis increase the expression of K Cl cotransporters in the kidney.
  - 2da Jornada de investigación Instituto Nacional de Cardiología, México DF (Junio 2013)  
**Melo Z.**, R. Bautista, S. Cruz-Rangel, N. Bobadilla, G. Gamba y A. Mercado. Hiperglicemia, diet baja en sal y acidosis metabólica incrementan la expresión de los cotransportadores de KCl en el riñon
  - 2da Jornada de investigación Instituto Nacional de Cardiología, México DF (Junio 2013)  
**Melo Z.**, S. Cruz-Rangel, N. Bobadilla, G. Gamba y A. Mercado. Defosforilación de una serina N-terminal es requerida para activación de KCC3 por hinchamiento celular.
  - Reunión de las sociedades de biología experimental 2014, San Diego, California (Abril 2014).  
**Melo Z.**, A Murillo, M. Chavez-Canales, J. Jadchouel, G. Gamba y A. Mercado. The kinase WNK1 is a powerfull inhibitor of K<sup>+</sup>: Cl<sup>-</sup> cotransporters.

## Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters

Silvia Cruz-Rangel,<sup>1\*</sup> Zesergio Melo,<sup>2\*</sup> Norma Vázquez,<sup>2</sup> Patricia Meade,<sup>2</sup> Norma A. Bobadilla,<sup>2</sup> Herminia Pasantes-Morales,<sup>1</sup> Gerardo Gamba,<sup>2,3</sup> and Adriana Mercado<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología y Desarrollo Neural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Molecular 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 <sup>3</sup>Departamento 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<sup>+</sup>-coupled chloride (NKCC1/2 and NCC) and K<sup>+</sup>-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<sup>−</sup> 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<sup>−</sup>]<sub>i</sub>, 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  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), is defined by [Cl<sup>−</sup>]<sub>i</sub> (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<sup>+</sup>-Cl<sup>−</sup> cotransporters move chloride outside the cell, are inhibited by phosphorylation, and are activated by dephosphorylation. In contrast, the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>−</sup> 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<sup>−</sup>]<sub>i</sub> 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<sup>−</sup>/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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-Cl<sup>−</sup> 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).



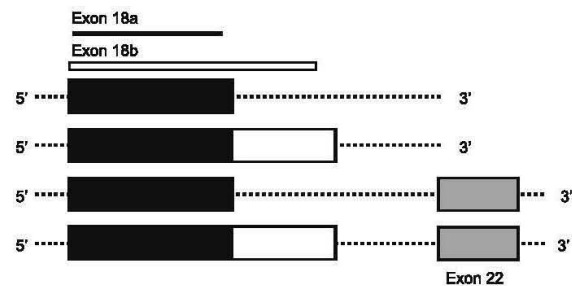


Fig. 1. Four potential variants of with-no-lysine kinase 3 (WNK3) are produced by alternative splicing. Exons 18b and 22 are exclusively present in central nervous system.

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 WNK3–18b 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 *Stu* I and *Dra* III flanking exon 18 of *WNK3* cDNA. The amplified fragment was digested with *Stu* 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'-ATTTTCCAACCTCATTTATAA-GGCAGCTTTTCCCTGTAGCAACTATGCCATTGTCCACATGT-GTC-3' to amplify fragment A-B (1,188 and 1,325 bp) and the primers forward 5'-GGGAAAAGCTGCCTTATAAATGAGTTGGAAAA-TCCACTGTGTGGAGAGTAAATGCAGCATCATGC-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'-TCCTCAGATGCTTCACITCCA-3' and reverse 5'-GTGTAAGTTG-GTATTATG-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 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $18^{\circ}\text{C}$ . 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,  $\text{Na}^+$ -coupled chloride cotransporter; KCC,  $\text{K}^+$ -coupled chloride cotransporter; NA, not assessed.

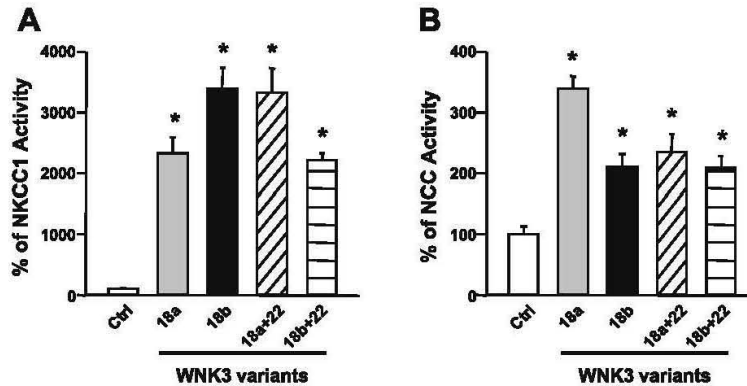


Fig. 2. Effects of wild-type WNK3 variants on the activities of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -coupled chloride cotransporter (NKCC1; *A*) and  $\text{Na}^+$ -coupled chloride cotransporter (NCC; *B*). For this and the rest of the figures, basal activity in the absence of WNK3 was taken as 100%, and 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  $\text{Ca}^{2+}$ -free ND96 medium (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 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  $16^\circ\text{C}$ . 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  $16^\circ\text{C}$  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  $\text{Cl}^-$ -free ND96 (in mM: 96  $\text{Na}^+$  isethionate, 2  $\text{K}^+$  gluconate, 6  $\text{Ca}^{2+}$  gluconate, 1  $\text{Mg}^{2+}$  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/ $\text{Cl}^-$ 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  $\text{Cl}^-$ -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 $\text{H}_2\text{O}$ ) and hypertonicity (260 mosM/kg $\text{H}_2\text{O}$ ) for inhibition and activation of the cotransporters, respectively. KCC activity was also performed in two different conditions: hypotonicity (110 mosM/kg $\text{H}_2\text{O}$ ) and isotonicity (200 mosM/kg $\text{H}_2\text{O}$ ) 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  $\text{Na}^+$  channels, bumetanide to prevent activity of the  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -2 $\text{Cl}^-$  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  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -

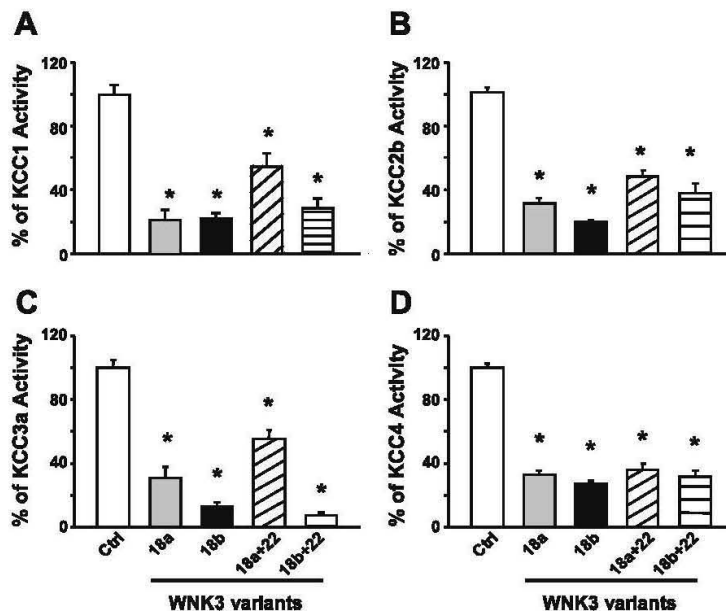


Fig. 3. Effects of wild-type WNK3 variants on the activities of  $\text{K}^+$ -coupled chloride cotransporter KCC1 (*A*) KCC2b (*B*), KCC3a (*C*), and KCC4 (*D*). Experiments were performed in hypotonic conditions. KCC cRNAs were injected alone or together with each of the WNK3 variant cRNAs, as indicated.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

$2\text{Cl}^-$  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  $\text{Cl}^-$ -free medium (in mM: 62  $\text{Na}^+$  gluconate, 10  $\text{K}^+$  gluconate, 4.6  $\text{Ca}^{2+}$  gluconate, 1  $\text{Mg}^{2+}$  gluconate, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and either 160 or 260 mosM/kgH<sub>2</sub>O) containing 1 mM ouabain and then transferred to the uptake medium (in mM: 63 NaCl, 10 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and either 160 or 260 mosM/kgH<sub>2</sub>O) containing 1 mM ouabain plus 1  $\mu\text{Ci}$   $^{86}\text{Rb}^+$ /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  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporter (NCC) activity in isotonic conditions. A 30-min preincubation period in a  $\text{Cl}^-$ -free medium (in mM: 96  $\text{Na}^+$  isethionate, 2  $\text{K}^+$  gluconate, 1.8  $\text{Ca}^{2+}$  gluconate, 1  $\text{Mg}^{2+}$  gluconate, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and 210 mosM/kgH<sub>2</sub>O) supplemented with 1 mM ouabain, 0.1 mM amiloride, and 0.1 mM bumetanide was followed by a 60-min uptake period in a  $\text{K}^+$ -free medium (in mM: 40 NaCl, 56 *N*-methyl-D-glucamine-chloride, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and 210 mosM/kgH<sub>2</sub>O) containing 1 mM ouabain, 0.1 mM amiloride, and 0.1 mM bumetanide plus 2  $\mu\text{Ci}$  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.

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

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

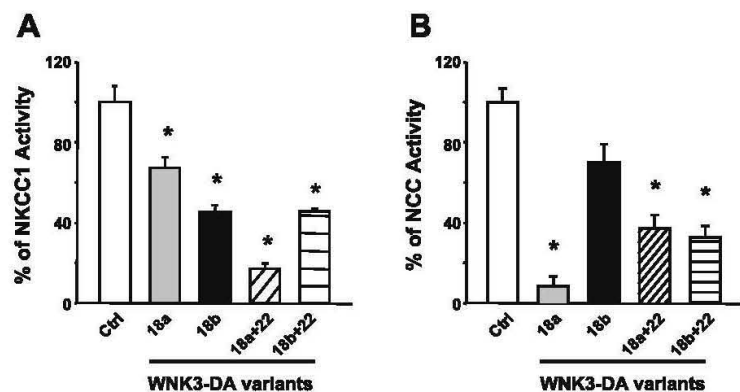
All uptake measurements were performed at 32°C. At the end of the uptake period, oocytes were washed three times in ice-cold uptake solution without isotope to remove extracellular fluid tracer. Oocytes were dissolved in 10% SDS, and tracer activity was determined for each oocyte by  $\beta$ -scintillation 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.



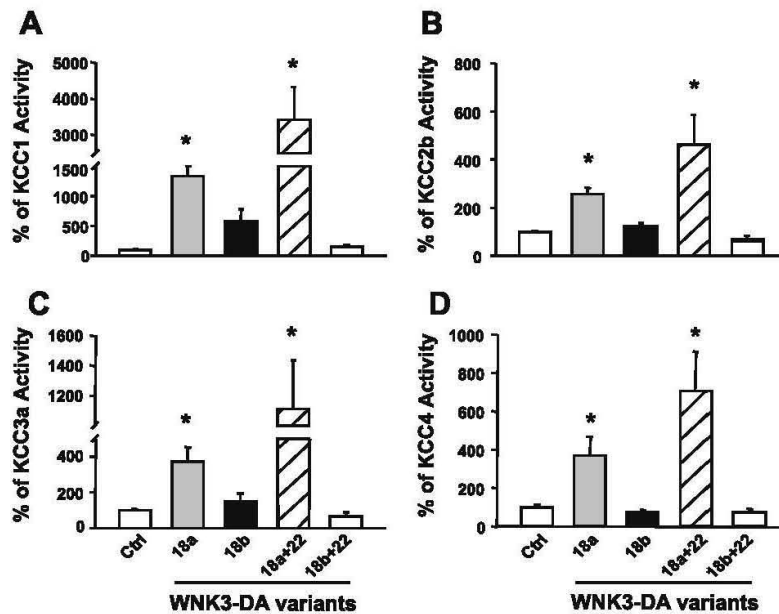


Fig. 5. Effects of catalytically inactive WNK3-D294A variants on the activities of KCC1 (A), KCC2b (B), KCC3a (C), and KCC4 (D). Experiments were performed in isotonic conditions. KCC cRNAs were injected alone or together with each of the WNK3 variant cRNAs, as indicated. \* $P < 0.001$  vs. control.

uptake through NKCC1 in control conditions varied from 139 to 275 pmol-oocyte<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, in the presence of any of the WNK3 variants, the uptake increased above 1,500 pmol-oocyte<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. 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 <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> 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 <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 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 <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 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

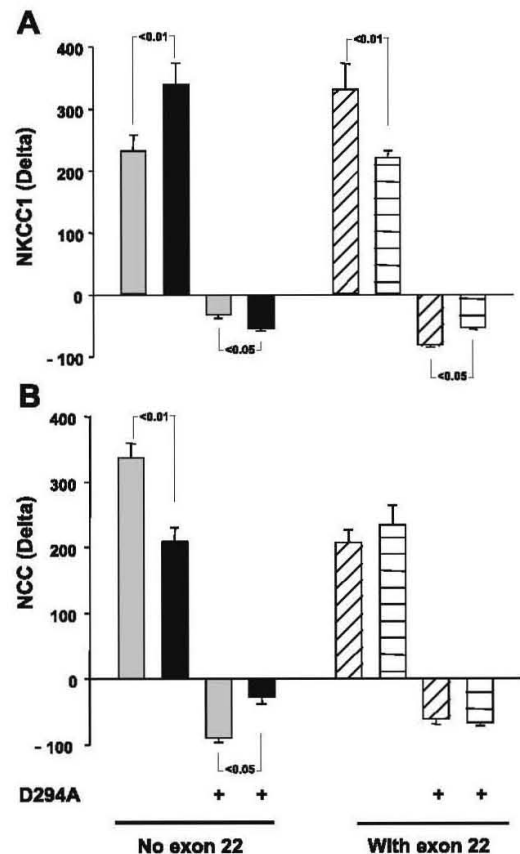


Fig. 6. Difference in the pattern of effect of WNK3 variants between NKCC1 and NCC. Shown is delta of effect on NKCC1 (A) or NCC (B) by WNK3-18a (gray bars) or WNK3-18b (black bars) with or without catalytic activity, as stated, and by WNK3-18a+22 (diagonal dashed bars) or WNK3-18b+22 (horizontal dashed 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- $\beta$  (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-Jaimes I, Hernandez D, Rodriguez-Lobato E, Pacheco-Alvarez D, Carino-Cortes 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, Miyashita 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<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> 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, Stippec 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<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 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,

## Referencias

1. Rust MB, Faulhaber J, Budack MK, Pfeffer C, Maritzen T, Didie M, et al. Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res*. 2006 Mar 3;98(4):549-56.
2. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009.
3. Dunham PB, Ellory JC. Passive potassium transport in low potassium sheep red cells: dependence upon cell volume and chloride. *J Physiol*. 1981 Sep;318:511-30.
4. Mather A, Pollock C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl*. 2011 Mar(120):S1-6.
5. San-Cristobal P, de los Heros P, Ponce-Coria J, Moreno E, Gamba G. WNK kinases, renal ion transport and hypertension. *Am J Nephrol*. 2008;28(5):860-70.
6. Avison MJ, Gullans SR, Ogino T, Giebisch G. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes stimulated by Na<sup>+</sup>-coupled glucose transport: evidence for a Ba<sup>2+</sup>-insensitive K<sup>+</sup> efflux pathway in rabbit proximal tubules. *J Membr Biol*. 1988 Nov;105(3):197-205.
7. Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ. Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature*. 2002 Apr 25;416(6883):874-8.
8. Mercado A, Vazquez N, Song L, Cortes R, Enck AH, Welch R, et al. NH<sub>2</sub>-terminal heterogeneity in the KCC3 K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Dec;289(6):F1246-61.
9. Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):423-93.
10. Arroyo JP, Kahle KT, Gamba G. The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):288-98.
11. Galanopoulou AS. GABA(A) receptors in normal development and seizures: friends or foes? *Curr Neuropharmacol*. 2008 Mar;6(1):1-20.
12. Lauf PK, Adragna NC. K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem*. 2000;10(5-6):341-54.
13. Bize I, Guvenc B, Robb A, Buchbinder G, Brugnara C. Serine/threonine protein phosphatases and regulation of K-Cl cotransport in human erythrocytes. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5 Pt 1):C926-36.
14. Bize I, Guvenc B, Buchbinder G, Brugnara C. Stimulation of human erythrocyte K-Cl cotransport and protein phosphatase type 2A by n-ethylmaleimide: role of intracellular Mg<sup>++</sup>. *J Membr Biol*. 2000 Sep 15;177(2):159-68.
15. Adragna NC, Lauf PK. Quinine and quinidine inhibit and reveal heterogeneity of K-Cl cotransport in low K sheep erythrocytes. *J Membr Biol*. 1994 Nov;142(2):195-207.
16. Adragna NC, Lauf PK. Oxidative activation of K-Cl cotransport by diamide in erythrocytes from humans with red cell disorders, and from several other mammalian species. *J Membr Biol*. 1997 Feb 1;155(3):207-17.
17. Adragna NC, Lauf PK. Role of nitrite, a nitric oxide derivative, in K-Cl cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells. *J Membr Biol*. 1998 Dec 1;166(3):157-67.
18. Brugnara C, de Franceschi L. Effect of cell age and phenylhydrazine on the cation transport properties of rabbit erythrocytes. *J Cell Physiol*. 1993 Feb;154(2):271-80.
19. Jennings ML. Volume-sensitive K(+)/Cl(-) cotransport in rabbit erythrocytes. Analysis of the rate-limiting activation and inactivation events. *J Gen Physiol*. 1999 Dec;114(6):743-58.

20. Jennings ML, Adame MF. Direct estimate of 1:1 stoichiometry of K(+)-Cl(-) cotransport in rabbit erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Sep;281(3):C825-32.
21. Colclasure GC, Parker JC. Cytosolic protein concentration is the primary volume signal for swelling-induced [K-Cl] cotransport in dog red cells. *J Gen Physiol.* 1992 Jul;100(1):1-10.
22. Colclasure GC, Parker JC. ATP dependence of K-Cl cotransport in dog red blood cells. *Am J Physiol.* 1993 Dec;265(6 Pt 1):C1648-52.
23. Colclasure GC, Parker JC, Dunham PB. Creatine kinase is required for swelling-activated K-Cl cotransport in dog red blood cells. *Am J Physiol.* 1995 Mar;268(3 Pt 1):C660-8.
24. Duhm J, Heller J, Zicha J. Kinetics of red cell Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in Prague hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A.* 1990;12(7):1203-22.
25. Haas M, Harrison JH, Jr. Stimulation of K-Cl cotransport in rat red cells by a hemolytic anemia-producing metabolite of dapsone. *Am J Physiol.* 1989 Feb;256(2 Pt 1):C265-72.
26. Ihrig I, Schonheit C, Haussner W, Bernhardt I. Characterisation of the potassium influx in rat erythrocytes. *Gen Physiol Biophys.* 1992 Aug;11(4):377-88.
27. Armsby CC, Brugnara C, Alper SL. Cation transport in mouse erythrocytes: role of K(+)-Cl- cotransport in regulatory volume decrease. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 1):C894-902.
28. Armsby CC, Stuart-Tilley AK, Alper SL, Brugnara C. Resistance to osmotic lysis in BXD-31 mouse erythrocytes: association with upregulated K-Cl cotransport. *Am J Physiol.* 1996 Mar;270(3 Pt 1):C866-77.
29. Lytle C, McManus T. Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Nov;283(5):C1422-31.
30. Mercado A, Mount DB, Gamba G. Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res.* 2004 Jan;29(1):17-25.
31. Weng TY, Chiu WT, Liu HS, Cheng HC, Shen MR, Mount DB, et al. Glycosylation regulates the function and membrane localization of KCC4. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1833(5):1133-46.
32. Su W, Shmukler BE, Chernova MN, Stuart-Tilley AK, de Franceschi L, Brugnara C, et al. Mouse K-Cl cotransporter KCC1: cloning, mapping, pathological expression, and functional regulation. *Am J Physiol.* 1999 Nov;277(5 Pt 1):C899-912.
33. Ballanyi K, Grafe P, Reddy MM, ten Bruggencate G. Different types of potassium transport linked to carbachol and gamma-aminobutyric acid actions in rat sympathetic neurons. *Neuroscience.* 1984 Jul;12(3):917-27.
34. DeFazio RA, Keros S, Quick MW, Hablitz JJ. Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2000 Nov 1;20(21):8069-76.
35. Delpire E. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci.* 2000 Dec;15:309-12.
36. Adragna NC, White RE, Orlov SN, Lauf PK. K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Feb;278(2):C381-90.
37. Adragna NC, Zhang J, Di Fulvio M, Lincoln TM, Lauf PK. KCl cotransport regulation and protein kinase G in cultured vascular smooth muscle cells. *J Membr Biol.* 2002 May 15;187(2):157-65.
38. Perry PB, O'Neill WC. Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am J Physiol.* 1993 Sep;265(3 Pt 1):C763-9.
39. Hume JR, Harvey RD. Chloride conductance pathways in heart. *Am J Physiol.* 1991 Sep;261(3 Pt 1):C399-412.



40. Kohmoto O, Krueger JA, Barry WH. Activation of furosemide-sensitive K<sup>+</sup> fluxes in myocytes by ouabain and recovery from metabolic inhibition. *Am J Physiol*. 1990 Sep;259(3 Pt 2):H962-72.
41. Amorim JB, Bailey MA, Musa-Aziz R, Giebisch G, Malnic G. Role of luminal anion and pH in distal tubule potassium secretion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Feb;284(2):F381-8.
42. Anagnostopoulos T, Edelman A, Planelles G, Teulon J, Thomas SR. [Transport of chlorine in the proximal tubule. Its effects on water-electrolyte absorption]. *J Physiol (Paris)*. 1984;79(3):132-8.
43. Bourgeois S, Masse S, Paillard M, Houillier P. Basolateral membrane Cl<sup>-</sup>-, Na<sup>+</sup>-, and K<sup>+</sup>-coupled base transport mechanisms in rat MTALH. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Apr;282(4):F655-68.
44. Eveloff JL, Warnock DG. Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am J Physiol*. 1987 Jan;252(1 Pt 2):F1-10.
45. Gillen CM, Brill S, Payne JA, Forbush B, 3rd. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem*. 1996 Jul 5;271(27):16237-44.
46. Larsen F, Solheim J, Kristensen T, Kolsto AB, Prydz H. A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. *Hum Mol Genet*. 1993 Oct;2(10):1589-95.
47. Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB, Gamba G. Functional comparison of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem*. 2000 Sep 29;275(39):30326-34.
48. Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem*. 1996 Jul 5;271(27):16245-52.
49. Payne JA. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> regulation. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):C1516-25.
50. Strange K, Singer TD, Morrison R, Delpire E. Dependence of KCC2 K-Cl cotransporter activity on a conserved carboxy terminus tyrosine residue. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Sep;279(3):C860-7.
51. Mercado A, Broumand V, Zandi-Nejad K, Enck AH, Mount DB. A C-terminal domain in KCC2 confers constitutive K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1016-26.
52. Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Pruunsild P, Kaila K, Delpire E, et al. A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Biol Chem*. 2007 Oct 19;282(42):30570-6.
53. Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, et al. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience*. 2001;104(4):933-46.
54. Karadsheh MF, Delpire E. Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons. *J Neurophysiol*. 2001 Feb;85(2):995-7.
55. Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, et al. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):251-5.
56. de Jong JC, Willems PH, Mooren FJ, van den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ. The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *J Biol Chem*. 2003 Jul 4;278(27):24302-7.
57. Starremans PG, Kersten FF, Van Den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ. Dimeric architecture of the human bumetanide-sensitive Na-K-Cl Co-transporter. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3039-46.

58. Blaesse P, Guillemin I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, et al. Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci*. 2006 Oct 11;26(41):10407-19.
59. Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, et al. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus*. 2002;12(2):258-68.
60. Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland GR, et al. Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):10661-7.
61. Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL, Jr., Delpire E, et al. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem*. 1999 Jun 4;274(23):16355-62.
62. Race JE, Makhlof FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB, Holtzman EJ. Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):C1210-9.
63. Dupre N, Howard HC, Mathieu J, Karpati G, Vanasse M, Bouchard JP, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol*. 2003 Jul;54(1):9-18.
64. Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupre N, Lu J, et al. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet*. 2002 Nov;32(3):384-92.
65. Salin-Cantegrel A, Shekarabi M, Holbert S, Dion P, Rochefort D, Laganier J, et al. HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter 3. *Hum Mol Genet*. 2008 Sep 1;17(17):2703-11.
66. Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, et al. Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J*. 2003 Oct 15;22(20):5422-34.
67. Byun N, Delpire E. Axonal and periaxonal swelling precede peripheral neurodegeneration in KCC3 knockout mice. *Neurobiol Dis*. 2007 Oct;28(1):39-51.
68. Velazquez H, Silva T. Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: expression in distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Jul;285(1):F49-58.
69. Lauf PK. Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: I. Dependence on chloride and external ions. *J Membr Biol*. 1983;73(3):237-46.
70. Jennings ML, al-Rohil N. Kinetics of activation and inactivation of swelling-stimulated K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> transport. The volume-sensitive parameter is the rate constant for inactivation. *J Gen Physiol*. 1990 Jun;95(6):1021-40.
71. Starke LC, Jennings ML. K-Cl cotransport in rabbit red cells: further evidence for regulation by protein phosphatase type 1. *Am J Physiol*. 1993 Jan;264(1 Pt 1):C118-24.
72. Kaji DM, Tsukitani Y. Role of protein phosphatase in activation of KCl cotransport in human erythrocytes. *Am J Physiol*. 1991 Jan;260(1 Pt 1):C176-80.
73. Holtzman EJ, Kumar S, Faaland CA, Warner F, Logue PJ, Erickson SJ, et al. Cloning, characterization, and gene organization of K-Cl cotransporter from pig and human kidney and *C. elegans*. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 2):F550-64.
74. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH. WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem*. 2000 Jun 2;275(22):16795-801.
75. Verissimo F, Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene*. 2001 Sep 6;20(39):5562-9.

76. Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, et al. Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem*. 2005 Jul 22;280(29):26653-8.
77. Subramanya AR, Yang CL, Zhu X, Ellison DH. Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Mar;290(3):F619-24.
78. Holden S, Cox J, Raymond FL. Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWKN3). *Gene*. 2004 Jun 23;335:109-19.
79. Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, et al. WNK3 modulates transport of Cl<sup>-</sup> in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 15;102(46):16783-8.
80. Rinehart J, Kahle KT, de Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, et al. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 15;102(46):16777-82.
81. Cruz-Rangel S, Melo Z, Vazquez N, Meade P, Bobadilla NA, Pasantes-Morales H, et al. Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Sep;301(3):C601-8.
82. de Los Heros P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, et al. WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 7;103(6):1976-81.
83. Piechotta K, Garbarini N, England R, Delpire E. Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26;278(52):52848-56.
84. Strange K, Denton J, Nehrke K. Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology (Bethesda)*. 2006 Feb;21:61-8.
85. DeAizpurua HJ, Cram DS, Naselli G, Devereux L, Dorow DS. Expression of mixed lineage kinase-1 in pancreatic beta-cell lines at different stages of maturation and during embryonic pancreas development. *J Biol Chem*. 1997 Jun 27;272(26):16364-73.
86. Dan I, Watanabe NM, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol*. 2001 May;11(5):220-30.
87. Delpire E, Gagnon KB. Genome-wide analysis of SPAK/OSR1 binding motifs. *Physiol Genomics*. 2007 Jan 17;28(2):223-31.
88. Dowd BF, Forbush B. PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):27347-53.
89. Gagnon KB, England R, Diehl L, Delpire E. Apoptosis-associated tyrosine kinase scaffolding of protein phosphatase 1 and SPAK reveals a novel pathway for Na-K-2Cl cotransporter regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 May;292(5):C1809-15.
90. Ponce-Coria J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de Los Heros P, et al. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8458-63.
91. Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, et al. Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell*. 2009 Aug 7;138(3):525-36.
92. Guggino WB. Functional heterogeneity in the early distal tubule of the *Amphiuma* kidney: evidence for two modes of Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> transport across the basolateral cell membrane. *Am J Physiol*. 1986 Mar;250(3 Pt 2):F430-40.
93. Shiuan D, Weinstein SW. Evidence for electroneutral chloride transport in rabbit renal cortical brush border membrane vesicles. *Am J Physiol*. 1984 Nov;247(5 Pt 2):F837-47.
94. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med*. 2007 Jan;261(1):32-43.

95. Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):510-8.
96. Wright EM, Loo DD, Hirayama BA, Turk E. Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda).* 2004 Dec;19:370-6.
97. Lee YJ, Han HJ. Regulatory mechanisms of Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int Suppl.* 2007 Aug(106):S27-35.
98. Greger R. Chloride reabsorption in the rabbit cortical thick ascending limb of the loop of Henle. A sodium dependent process. *Pflugers Arch.* 1981 Apr;390(1):38-43.
99. Gamba G, Friedman PA. Thick ascending limb: the Na<sup>(+)</sup>:K<sup>(+)</sup>:2Cl<sup>(-)</sup> co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflugers Arch.* 2009 May;458(1):61-76.
100. Wagner CA, Finberg KE, Stehberger PA, Lifton RP, Giebisch GH, Aronson PS, et al. Regulation of the expression of the Cl<sup>-</sup>/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status. *Kidney Int.* 2002 Dec;62(6):2109-17.
101. Wagner CA, Devuyst O, Bourgeois S, Mohebbi N. Regulated acid-base transport in the collecting duct. *Pflugers Arch.* 2009 May;458(1):137-56.
102. Bergeron MJ, Gagnon E, Wallendorff B, Lapointe JY, Isenring P. Ammonium transport and pH regulation by K<sup>(+)</sup>-Cl<sup>(-)</sup> cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jul;285(1):F68-78.
103. Osorio H, Coronel I, Arellano A, Franco M, Escalante B, Bautista R. Ursodeoxycholic acid decreases sodium-glucose cotransporter (SGLT2) expression and oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Aug;97(2):276-82.
104. Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. The synthesis of [14C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J.* 1974 Sep;142(3):673-83.
105. Castaneda-Bueno M, Cervantes-Perez LG, Vazquez N, Uribe N, Kantesaria S, Morla L, et al. Activation of the renal Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 15;109(20):7929-34.
106. Moreno G, Merino A, Mercado A, Herrera JP, Gonzalez-Salazar J, Correa-Rotter R, et al. Electroneutral Na-coupled cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism. *Hypertension.* 1998 Apr;31(4):1002-6.
107. Ambuhl PM, Amemiya M, Danczkay M, Lotscher M, Kaissling B, Moe OW, et al. Chronic metabolic acidosis increases NHE3 protein abundance in rat kidney. *Am J Physiol.* 1996 Oct;271(4 Pt 2):F917-25.
108. Nowik M, Kampik NB, Mihailova M, Eladari D, Wagner CA. Induction of metabolic acidosis with ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) in mice and rats--species differences and technical considerations. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(6):1059-72.
109. Karadsheh MF, Byun N, Mount DB, Delpire E. Localization of the KCC4 potassium-chloride cotransporter in the nervous system. *Neuroscience.* 2004;123(2):381-91.
110. Sasaki S, Ishibashi K, Yoshiyama N, Shiigai T. KCl co-transport across the basolateral membrane of rabbit renal proximal straight tubules. *J Clin Invest.* 1988 Jan;81(1):194-9.
111. Loike JD, Hickman S, Kuang K, Xu M, Cao L, Vera JC, et al. Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1774-9.
112. Aperia A. 2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -adenosine triphosphatase. *J Am Soc Nephrol.* 2012 Aug;23(8):1283-90.
113. Greger R, Schlatter E. Properties of the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflugers Arch.* 1983 Mar;396(4):325-34.

114. Haque MZ, Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. High salt differentially regulates surface NKCC2 expression in thick ascending limbs of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 May;300(5):F1096-104.
115. Weinstein AM. A mathematical model of rat ascending Henle limb. I. Cotransporter function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F512-24.
116. Weinstein AM, Krahn TA. A mathematical model of rat ascending Henle limb. II. Epithelial function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F525-42.
117. Weinstein AM. A mathematical model of rat ascending Henle limb. III. Tubular function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F543-56.
118. San-Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi FH, et al. Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 17;106(11):4384-9.
119. Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, et al. WNK4 kinase is a negative regulator of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Apr;292(4):F1197-207.