

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 26

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ANALISIS DE LA RELACION ESTRUCTURA FUNCION DE UNA ISOFORMA DEL COTRANSPORTADOR DE NA:K:2CL

La Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional
AUTOR: Patricia Meade Huerta
FECHA: 23 de junio de 2003
LUGAR: La Paz, Baja California Sur

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PATRICIA MEADE HUERTA

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO GAMBA AYALA

MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

dcb/grad/072Jur/2003.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
Director General de la
Administración Escolar
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 19 de febrero del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la LIBB. PATRICIA MEADE HUERTA con no. de cuenta 95503822 y no. de expediente 78992002 con la tesis titulada: "Análisis de la relación estructura función de una isoforma del cotransportador de Na:K:2Cl", dirigida por el Dr. Gerardo Gamba Ayala

Presidente:	Dra. Herminia Pasantes Ordóñez
Secretario:	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Vocal:	Dr. José Luis Reyes Sánchez
Vocal:	Dr. Manuel Soriano García
Vocal:	Dr. Luis A. Vaca Domínguez
Suplente:	Dr. Armando Tovar Palacio
Suplente:	Dr. Alfonso León del Río

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"Por mi raza hablara el espiritu"

Cd. Universitaria, D.F., 24 de febrero de 2003

Dr. Javier Espinosa Aguirre
Responsable en la Entidad
Académica

Dr. Abel Moreno Cárcamo
Coordinador del Doctorado en
Ciencias Biomédicas

c.c.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

Teléfonos: 622-38-92 y 622-38-37 Fax: 622-38-92 e-mail: pdcb@servidor.unam.mx Internet: www.pdcb.unam.mx

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ESQUEMA GENERAL DE LA REABSORCIÓN RENAL DE SODIO	2
Túbulo Proximal	4
Asa de Henle	4
Túbulo Distal	5
Túbulo Colector	5
MECANISMOS DE CONCENTRACIÓN URINARIA	6
Dilución de la Orina	6
Concentración de la Orina	8
La Hormona Antidiurética Vasopresina	11
Fisiología del Asa Ascendente Gruesa de Henle	14
COTRANSPORTADOR DE Na⁺:K⁺:2Cl⁻ SENSIBLE A BUMETANIDA (CSB)	16
Síndrome de Bartter	17
La Familia de Cotransportadores Electroneutros de Sodio, Potasio Y Cloro	19
Biología Molecular del Cotransportador de Na ⁺ :K ⁺ :2Cl ⁻	22
Regulación del Cotransportador de Na ⁺ :K ⁺ :2Cl ⁻	26
<i>Regulación del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ por vasopresina</i>	29
<i>Regulación del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ por una isoforma truncada</i>	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
METODOLOGÍA	36
<i>La proteína verde fluorescente</i>	36
<i>Generación de la clona CSB1-L-EGFP</i>	37
<i>Determinación de la expresión en membrana plasmática</i>	39
<i>Determinación de la expresión funcional</i>	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Interacción de CSB1-L y CSB1-S	43
<i>Expresión en membrana plasmática de CSB1-L-EGFP</i>	44
<i>Efecto del AMPc sobre la expresión en membrana plasmática y función de CSB1-L</i>	48
<i>Coexpresión de las isoformas larga y corta de CSB1 y la regulación por AMPc</i>	49
CSB1-S Codifica para el Cotransportador de Na ⁺ :K ⁺ :2Cl ⁻	60
Sensible a Bumetanida	60
Propiedades Funcionales de las Isoformas A, B y F de CSB1-L	61
CONCLUSIONES	63
APÉNDICES	64
REFERENCIAS	78

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Ignacio
mi amada competenCia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

0

Gracias

A mis papás

A mis hermanos Carlos, Maluz y Bernardo

A mis compañeros y amigos de laboratorio,
en especial a Adriana Mercado y Paola

A la Química Norma Vázquez

A la Dra. Norma Bobadilla

Al Dr. Steven C. Herbert

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gracias al
Dr. Gerardo Gamba
por su enseñanza y apoyo invaluable

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

F

INTRODUCCIÓN

El riñón tiene como función principal mantener constante el volumen y la composición de los líquidos corporales, a pesar de la variación en la ingesta de agua y solutos. Básicamente el riñón trabaja mediante tres procesos. La filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular. El riñón filtra al día 170-180 litros de agua y 1.5 kg de sal. Alrededor de 1% de agua y sal y concentraciones variables de los demás solutos son excretados en la orina. La filtración glomerular consiste en ultrafiltrar el plasma a través del glomérulo, a una tasa de 120 ml/minuto, es un proceso pasivo que depende de la presión de perfusión renal y de la integridad anatómica del glomérulo. El ultrafiltrado tiene las mismas concentraciones de sales y moléculas orgánicas que el plasma y baja concentración de proteínas, pero carece de elementos celulares. Las proteínas neutras con un radio molecular menor a 20 Å se filtran libremente, las proteínas entre 20 y 42 Å se filtran en función de su tamaño y carga, y las proteínas mayores a 42 Å no se filtran por el glomérulo.

Con los procesos de reabsorción y secreción, los túbulos renales regulan el volumen y la concentración de la orina. Consecuentemente, los túbulos controlan con precisión el volumen, la osmolaridad, la composición y el pH de los compartimentos intra y extracelulares. La reabsorción tubular consiste en la reabsorción de solutos y agua del ultrafiltrado glomerular al intersticio renal, es un proceso activo con gran consumo de energía que depende de los procesos de transporte epitelial a lo largo de la nefrona. Este proceso permite que el riñón retenga sustancias esenciales y así regula sus niveles en plasma. La secreción tubular es la ruta principal de excreción en la orina, consiste en la secreción de sustancias del intersticio renal hacia el líquido tubular. Así, el riñón excreta productos de desecho del metabolismo y elimina aniones y cationes orgánicos exógenos y endógenos. Muchos de estos compuestos orgánicos se encuentran unidos a proteínas y por esta razón no pueden ser filtrados por el glomérulo.

La nefrona es la unidad funcional del riñón (Figura 1). Cada riñón humano tiene 1.2 millones de nefronas, formadas por el glomérulo, que consiste en los capilares glomerulares y la cápsula de Bowman; el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo

distal y el túbulo colector. Los túbulos están compuestos por una sola capa de células epiteliales que tienen diferentes funciones de transporte a lo largo de la nefrona.

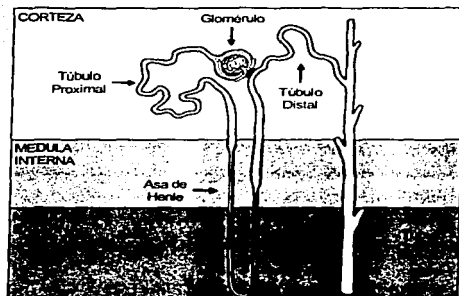


Figura 1. Nefrona

ESQUEMA GENERAL DE LA REABSORCIÓN RENAL DE SODIO

A lo largo de la nefrona diversas sustancias pueden ser reabsorbidas o secretadas en el epitelio tubular, por vías transcelulares (a través de las células) o por vías paracelulares (entre las células). La reabsorción de Na^+ depende de la operación simultánea de la bomba de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral, y de diversas proteínas acarreadoras de sodio en la membrana apical. En el túbulo proximal y en el asa de Henle la reabsorción depende de la carga de Na^+ , mientras que en el túbulo distal y en el túbulo colector depende de la necesidad de mantener el balance de Na^+ , así, el ajuste fino de la natriuresis se lleva a cabo en los segmentos distales de la nefrona (32; 33).

La $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa se localiza exclusivamente en la membrana basolateral, lo cual polariza a las células del epitelio renal en dos caras: apical y basolateral (48; 105; 106). Su función es sacar Na^+ de la célula, en contra de su gradiente de concentración,

mediante un mecanismo de transporte activo dependiente del trifosfato de adenosina (ATP), en el que salen de la célula tres iones de Na^+ y entran dos de K^+ , lo que tiene como consecuencia la reducción de la concentración intracelular de Na^+ y el incremento de la concentración intracelular de K^+ (Figura 2). Debido a que la concentración de Na^+ dentro de la célula es baja (12 mEq/L) y en el fluido tubular es alta (140 mEq/L), el Na^+ se mueve a través de la membrana apical a favor de su gradiente eléctrico de concentración, de la luz tubular al interior de la célula. Dentro de la célula, la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa sensa el incremento en la concentración intracelular de Na^+ y estimula su salida hacia el intersticio renal, regresando el nivel de Na^+ intracelular a su nivel normal. Por lo tanto, la consecuencia de esta polarización es que el transporte de Na^+ es vectorial, desde la luz tubular hacia el intersticio renal, con lo que la carga eléctrica negativa en el interior de la célula permanece constante, se mantiene la osmolaridad intracelular y además aumenta la concentración de Na^+ en el espacio intersticial, lo que a su vez crea un gradiente osmótico que promueve la difusión de agua por vía paracelular, desde la luz tubular hacia el espacio intersticial (105; 106). El Na^+ entra a las células epiteliales por la membrana apical, al seguir su gradiente de

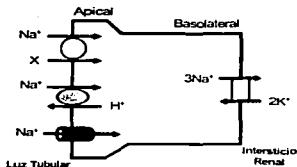


Figura 2. Esquema general de la reabsorción renal de sodio. El Na^+ ingresa a la célula por la membrana basolateral a través de cotransportadores, contratransportadores y canales, y sale al intersticio renal por la bomba de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa

concentración, a través de procesos de transporte pasivo vía canales o de transporte activo secundario en el que otros iones o moléculas son acoplados al Na^+ para transportarse en contra de su gradiente (Figura 2). Las proteínas de membrana que llevan a cabo este tipo de transporte se conocen como transportadores secundarios porque la energía requerida para el transporte no se obtiene por hidrólisis de ATP, sino a partir de la energía generada por el gradiente electroquímico del Na^+ (59).

La presencia de diversos tipos de cotransportadores, contratransportadores y canales es en parte responsable de la heterogeneidad de la nefrona, por lo que se ha dividido

en varias regiones, en las que la reabsorción de Na^+ y otros solutos difiere de una región a otra.

Túbulo Proximal

En el túbulo proximal se reabsorbe alrededor del 67% del ultrafiltrado glomerular y el 100% de la glucosa y aminoácidos. La intensa reabsorción se debe a la gran concentración de la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral. El transporte de Na^+ en el túbulo proximal se lleva a cabo en dos fases (13; 155; 170), esto se debe a la presencia de diferentes sistemas de transporte y a la diferencia en la composición del fluido tubular. En la primera mitad del túbulo proximal el Na^+ es reabsorbido junto con moléculas orgánicas como glucosa, aminoácidos, fosfato y lactato, por medio de cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{glucosa}$, $\text{Na}^+:\text{aminoácidos}$, $\text{Na}^+:\text{Pi}$ y $\text{Na}^+:\text{lactato}$ (14). El Na^+ sale de la célula por la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa y los solutos orgánicos son transportados hacia el intersticio renal por mecanismos de transporte pasivo en la membrana basolateral. El gradiente osmótico transtubular generado, tiene como consecuencia la reabsorción pasiva de agua por ósmosis. En la segunda mitad del túbulo proximal el Na^+ es reabsorbido junto con Cl^- , por un mecanismo en el que el Na^+ ingresa a la célula gracias a la operación paralela del contratransportador de $\text{Na}^+:\text{H}^+$ y de cotransportadores de $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ (10; 154), el Cl^- sale al intersticio renal por cotransportadores de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ presentes en la membrana basolateral. Además, cierta parte del NaCl es transportado por vía paracelular. En el túbulo proximal la reabsorción de sal y agua es constitutiva, ya que está bajo control del balance glomerulotubular (19; 93; 146).

Asa de Henle

El asa de Henle se localiza a continuación del túbulo proximal, en la zona marcada por la unión entre las regiones externa e interna de la médula externa. En esta parte de la nefrona se reabsorbe 20-40% del sodio filtrado. Se divide en dos partes: descendente y ascendente, esta última subdividida en porción gruesa y delgada. El agua se reabsorbe en el asa descendente, mientras que el NaCl lo hace en la porción ascendente. La porción descendente del asa de Henle tiene elevado índice de permeabilidad al agua debido a la presencia de canales de agua localizados en la membrana apical,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conocidos como acuaporina-1 (139) y la actividad de la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$ en la membrana basolateral es muy baja, por lo que no hay reabsorción activa de solutos. En contraste, en el asa ascendente de Henle se reabsorbe NaCl , sin reabsorción de agua. En este sitio, la actividad de la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$ es muy elevada y la membrana apical es impermeable al agua, de modo que se reabsorbe Na^+ , pero no agua. La membrana apical es impermeable al agua porque es una membrana simple, con poca superficie de reabsorción, sin acuaporinas y con uniones intercelulares muy estrechas. El Na^+ ingresa a la célula por el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (130). En este cotransporte, un Na^+ (a favor de su gradiente), un K^+ (en contra de su gradiente) y dos Cl^- (en contra de su gradiente) se transportan hacia el interior de la célula.

Túbulo Distal

En el túbulo distal se reabsorbe el 5% del filtrado glomerular. La parte inicial del túbulo distal es impermeable al agua y ahí se reabsorbe sodio, cloro y calcio. El transporte de Na^+ en la membrana apical es un cotransporte electroneutro de NaCl , donde el Cl^- es transportado hacia el interior de la célula en contra de su gradiente, acoplado al Na^+ , a través del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a los diuréticos tipo tiazida. En la porción final del túbulo distal el transporte de Na^+ es electrogénico (166) por medio de canales de sodio sensibles a amilorida (167; 197). El Na^+ que ingresa a la célula por ambos mecanismos, se intercambia en la cara basolateral por K^+ vía la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$, mientras que el K^+ que entra por la cara basolateral es secretado hacia la luz tubular por canales conductivos y el Cl^- que ingresa a la célula, acoplado al Na^+ , sale por canales de Cl^- , en la membrana basolateral hacia el intersticio renal.

Túbulo Colector

En el túbulo colector se reabsorbe alrededor del 3% del filtrado glomerular y es en donde se modula de manera fina la reabsorción de agua y NaCl y, por lo tanto, se determina el volumen final de la orina (32). Esta región de la nefrona está formada por células principales y células intercaladas. Las células principales son las encargadas de reabsorber Na^+ y agua, así como de excretar K^+ (181), el transporte de Na^+ se realiza a través de canales de sodio sensibles a amilorida mientras que el agua se reabsorbe por

medio de los canales de agua conocidos como acuaporina-2 (54). El Na^+ se intercambia en la cara basolateral por K^+ vía la $\text{Na}^+:\text{K}^+-\text{ATPasa}$.

MECANISMOS DE CONCENTRACIÓN URINARIA

Los riñones son los responsables de regular el balance de agua y son la principal vía de eliminación de agua del organismo. El mantenimiento del balance de agua requiere que la ingesta y la pérdida de agua sean igualadas con precisión. Si la ingesta excede la pérdida, el balance de agua es positivo, mientras que si la ingesta es menor a la pérdida, el balance de agua es negativo. Una característica importante del riñón es la habilidad para producir grandes volúmenes de orina diluida, con osmolaridad menor a la del plasma, cuando la ingesta de agua es alta, o bien, poco volumen de orina concentrada, con osmolaridad mayor a la del plasma, si la ingesta de agua es poca o la pérdida de agua aumenta.

En un individuo normal, la osmolaridad urinaria puede ser hipoosmótica o hiperosmótica en relación con el plasma. La variación va de 50 a 1200 mOsm, mientras que el correspondiente volumen urinario puede variar de 0.5 a 18 L/día. La conservación renal de agua es el resultado de la combinación de la función del asa de Henle y del túbulo colector (115; 120), ambos regulados por la hormona antidiurética vasopresina, así como del mantenimiento del gradiente hiperosmótico en la médula renal. Debido a que el riñón controla la excreción de agua independiente de la excreción de solutos importantes como sodio, potasio, hidrogeniones y urea, el balance de agua no afecta otras funciones homeostáticas del riñón, necesarias para la sobrevivencia.

Dilución de la Orina

Al ingresar a los túbulos renales el filtrado glomerular tiene una osmolaridad igual a la del plasma, es decir, 300 mOsm. Para excretar el exceso de agua es necesario diluir el filtrado mientras pasa por los túbulos, aumentando la reabsorción de solutos en relación con la reabsorción de agua.

El fluido tubular se mantiene isoosmótico en el túbulo proximal ya que la reabsorción de solutos y agua se da en igual proporción. En el asa de Henle la reabsorción de solutos

y agua ocurre de manera separada; la excreción tanto de orina concentrada, como diluida, depende de la adecuada función de este segmento tubular. En el asa descendente de Henle, el agua se reabsorbe a través del canal de agua, conocido como acuaporina-1 y el fluido tubular alcanza el equilibrio con el líquido intersticial de la médula renal, que en el riñón humano alcanza 1200 mOsm (119; 139) (Figura 3). El fluido tubular se concentra mientras pasa a la médula interna. Al llegar a la punta de la papila renal tiene la misma osmolaridad que el fluido intersticial que rodea este segmento del asa de Henle. El asa ascendente de Henle es impermeable al agua y es aquí donde se diluye el fluido tubular. El asa ascendente delgada es permeable a NaCl y a urea, esta última es transportada del fluido intersticial al líquido tubular en pequeñas cantidades (96; 140). En el asa ascendente gruesa se reabsorbe sodio, potasio y cloro, pero no agua (74). Por lo tanto, el fluido tubular se diluye en su paso a través del asa ascendente y llega al túbulo distal con osmolaridad de 150 mOsm (66). En el túbulo distal y en el túbulo colector continúa la reabsorción de NaCl. El túbulo colector influye de manera importante en los mecanismos de concentración urinaria (120) (115), ya que en ausencia de vasopresina, es impermeable al agua debido a la ausencia de canales

de agua en la membrana apical y la reabsorción de solutos diluye aún más el fluido tubular cuya osmolaridad puede ser tan baja como 50 mOsm (101). De esta manera el riñón excreta el exceso de agua en forma de orina diluida. Durante el balance de agua positivo los niveles de vasopresina son bajos y por lo tanto el agua es retenida en el túbulo colector, y junto con la reabsorción de algunos solutos, se forma un gran volumen de orina que tendrá osmolaridad menor a la plasmática.

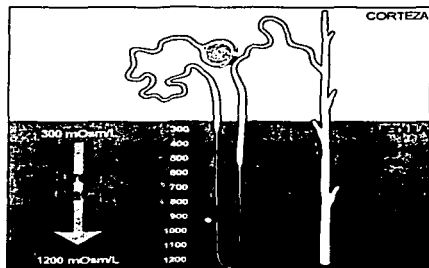


Figura 3. Gradiente hiperosmótico en la médula renal. La osmolaridad en la médula va de 300 a 1200 mOsm en la punta de la papila, y es generada por la concentración de NaCl, urea y osmolitos orgánicos

Concentración de la Orina

La habilidad del riñón para producir orina con concentración mayor a la del plasma es esencial para que los mamíferos puedan vivir fuera del agua. Para producir orina concentrada se requieren un nivel plasmático alto de vasopresina y una osmolaridad alta en el fluido intersticial de la médula renal. La vasopresina ejerce su acción sobre el transporte de solutos y agua, tanto en el asa de Henle como en el túbulo colector. El intersticio medular que rodea los túbulos colectores normalmente es hiperosmótico. En el riñón humano su osmolaridad puede llegar hasta 1200 mOsm en la punta de la papila renal (Figura 3). El gradiente hiperosmolar que existe de la médula externa a la médula interna, se genera por el mecanismo de contracorriente, el cual se basa en tres excepciones a la fisiología del movimiento transepitelial de agua y solutos.

La primera excepción consiste en que en el asa descendente de Henle no se reabsorbe Na^+ ni Cl^- , pero sí agua a través de los canales de agua, conocidos como acuaporina-1, gracias a la hiperosmolaridad del intersticio medular (119). La segunda excepción es que en el asa ascendente de Henle se reabsorbe NaCl , pero no agua, debido a la ausencia de canales de agua, a la impermeabilidad de las uniones estrechas intercelulares y a la inusual impermeabilidad de las membranas celulares (74). La tercera excepción es que el fluido que deja el asa ascendente gruesa de Henle es hiposmótico con relación al plasma, entre 100 y 150 mOsm, a pesar de lo cual en el túbulo distal continúa la reabsorción de solutos, hasta que se logra osmolaridad tan baja como 50 mOsm (66).

En ausencia de vasopresina el túbulo colector es impermeable al agua, y con la reabsorción de NaCl en este segmento, la osmolaridad del fluido luminal puede ser menor a 100 mOsm (101). En presencia de vasopresina, la permeabilidad al agua del túbulo colector aumenta, debido a la inserción a la membrana apical de la célula de canales de agua conocidos como acuaporina-2 (67; 138; 165). El agua sale del túbulo colector al intersticio medular hiperosmótico a favor de su gradiente de concentración, hasta que el lumen del túbulo colector y el correspondiente intersticio medular tengan la misma concentración de agua. Al absorberse mucha agua en el túbulo colector, el volumen urinario puede llegar a ser tan bajo como 500 ml al día y la osmolaridad urinaria tan alta como 1200 mOsm. Como muestra la figura 4, el gradiente medular

hiperosmótico es mantenido gracias a la intensa reabsorción de NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle y al reciclaje de urea entre el túbulo colector y el asa ascendente delgada de Henle. Estos dos procesos también son estimulados por vasopresina.

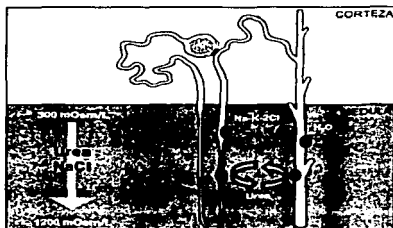


Figura 4. Acciones de la vasopresina en el riñón. La vasopresina estimula en el asa ascendente gruesa de Henle el transporte de NaCl y en el túbulo colector el transporte de agua y el reciclaje de urea

La presencia de urea es responsable del 40% de la actividad osmolar en la orina y en el fluido intersticial medular cuando la vasopresina está presente. La permeabilidad a urea en el túbulo colector medular es variable (165), en presencia de vasopresina hay reabsorción de urea al intersticio, a través del transportador de urea conocido como UT1 (116; 117; 140), la cual contribuye a la osmolaridad intersticial medular. La mayor parte de esta urea es secretada al asa descendente de Henle (Figura 4), logrando así el reciclaje de urea

(168). En presencia de vasopresina la permeabilidad a urea y al agua en el túbulo colector es alta, así como la permeabilidad a NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle.

Los vasos sanguíneos que rodean los túbulos renales, que van de la corteza a la papila y viceversa, son conocidos como vasa recta y como todos los vasos sanguíneos, son permeables a solutos pequeños y a agua. La sangre isosmótica entra al medio hiperosmótico de la médula a través de la vasa recta, el NaCl y la urea difunden del intersticio medular al lumen de la vasa recta descendente, mientras que el agua se mueve en dirección opuesta. Esta entrada de urea a la vasa recta descendente ocurre mediante el transportador de urea conocido como UT3 (194; 205). Como resultado, la osmolaridad de la sangre aumenta mientras la sangre se aproxima al final de la vasa recta descendente, y al llegar a la punta de la vasa recta descendente tiene una

cocentración de solutos mayor que la del intersticio. Para evitar que de esta manera se pierda el gradiente hiperosmótico en la médula, al pasar la sangre por la vasa recta ascendente el NaCl y la urea salen del lumen de la vasa recta ascendente al intersticio mientras que el agua se mueve en dirección opuesta (42).

Estos procesos de intercambio pasivo tienen como consecuencia que la vasa recta descendente gane solutos y pierda agua mientras que la vasa recta ascendente pierde solutos y gana agua. Entonces, a cualquier nivel, los vasos sanguíneos descendentes y ascendentes intercambian solutos y agua vía, así como a expensas, del intersticio medular. El hecho de que el flujo sanguíneo en la médula renal sea relativamente bajo, en comparación con el de la corteza, aproximadamente 5-10% del flujo sanguíneo renal, evita también que se pierda el gradiente hiperosmótico en la médula renal.

Así, el balance de agua es mantenido por la variación en la permeabilidad al agua en el túbulo colector y el gradiente hiperosmolar en el intersticio renal es mantenido por la intensa reabsorción de NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle y por el reciclaje de urea del túbulo colector al asa ascendente delgada de Henle. Todas estas son funciones de la secreción de vasopresina.

Las células renales mantienen su volumen en la médula interna hiperosmótica, porque sintetizan y acumulan solutos osmóticamente activos (58). Así se protegen de las altas concentraciones de NaCl y urea en la sangre y en el fluido intersticial de la médula renal, que son consecuencia del mecanismo de concentración urinaria. Los osmolitos orgánicos predominantes en las células de la médula renal son sorbitol, glicerofosforilcolina, myo-inositol, betaina y taurina. Los niveles intracelulares de estos osmolitos correlacionan con la concentración de NaCl y en el caso de glicerofosforilcolina también con la de urea. El sorbitol se sintetiza a partir de glucosa en una reacción catalizada por la aldosa reductasa, la hipertonidad aumenta la transcripción del gen que codifica para esta enzima, así como los niveles de RNAm y su traducción. La glicerofosforilcolina se sintetiza a partir de colina vía fosfatidilcolina, la alta concentración de NaCl y urea inhibe la actividad de la enzima glicerofosforilcolina:colina fosfodiesterasa, reduciendo así la degradación de glicerofosforilcolina. Inositol, betaina y taurina son transportados al interior de la célula a través de cotransportadores dependientes de sodio, y este transporte es estimulado por

hipertonidad a través del aumento en la síntesis de RNAm de estos transportadores. Esto permite el mantenimiento del volumen celular sin aumento de la concentración intracelular de iones inorgánicos (26; 58).

La Hormona Antidiuretica Vasopresina

La vasopresina actúa directamente en el riñón para regular el volumen y la osmolaridad de la orina, sin alterar la concentración de solutos excretada. Se trata de una hormona peptídica formada por nueve aminoácidos. Se sintetiza en células neuroendocrinas localizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, las cuales tienen extensiones axonales a la neurohipófisis (pituitaria posterior). La hormona sintetizada se acumula en gránulos que son transportados por el axón de la célula y almacenados en las terminales nerviosas localizadas en la neurohipófisis. La estimulación de los núcleos supraóptico y paraventricular, genera cambios en la permeabilidad de su membrana, incrementando la entrada de calcio a las células. La vasopresina almacenada en los gránulos secretores de las terminaciones nerviosas es entonces liberada al torrente sanguíneo.

La secreción de vasopresina por la neurohipofisis puede ser influenciada por varios factores. Los dos principales reguladores fisiológicos de la secreción de vasopresina son la osmolaridad de los fluidos corporales y el volumen y la presión del sistema vascular. Cambios en la osmolaridad del fluido extracelular, tan mínimos como 1%, son suficientes para alterar la secreción de vasopresina. Los osmorreceptores son células nerviosas localizadas en el núcleo supraóptico del hipotálamo cuya función es sensor los cambios en la osmolaridad del fluido extracelular, a través de su encogimiento o hinchamiento. Los osmorreceptores responden únicamente a los solutos del plasma que son osmolitos efectivos. Al aumentar la osmolaridad efectiva del plasma, los osmorreceptores mandan señales estimuladoras a las células encargadas de sintetizar y secretar vasopresina. De manera contraria, cuando disminuye la osmolaridad del plasma la secreción se inhibe. Una vez secretada, la vasopresina es rápidamente degradada por lo que los niveles circulantes pueden ser reducidos a cero en minutos. Como resultado el sistema de vasopresina puede responder rápidamente a las fluctuaciones de la osmolaridad de los fluidos corporales.

La disminución en el volumen sanguíneo y/o en la presión sanguínea también estimula la secreción de vasopresina. Los receptores responsables de sentir estos cambios son los barorreceptores que se localizan en el sistema circulatorio y responden al estiramiento. Las señales de los barorreceptores al tallo cerebral son transmitidas a través de fibras aferentes de los nervios vago y glossofaríngeo. El tallo cerebral es parte del centro que regula el ritmo cardíaco y la presión sanguínea, de ahí las señales son después redirigidas a las células encargadas de la síntesis y secreción de vasopresina en el hipotálamo. En condiciones normales, las señales de los barorreceptores inhiben tónicamente la secreción de vasopresina. Cuando disminuyen el volumen sanguíneo o la presión arterial, se elimina el impulso inhibitorio y se estimula la secreción de vasopresina. La sensibilidad del sistema de barorreceptores es menor a la del sistema de osmorreceptores y se requiere una disminución de 5%-10% en el volumen o la presión sanguínea para estimular la secreción de vasopresina.

Las acciones de la vasopresina en el riñón son incrementar la permeabilidad al agua y a la urea en el túbulo colector y estimular la reabsorción de sodio, potasio y cloro en el asa ascendente gruesa de Henle. El mecanismo de acción de la vasopresina se

muestra en la figura 5. La vasopresina actúa uniéndose a su receptor en la membrana basolateral de la célula. El receptor presente en los túbulos renales es el receptor tipo V2 (3; 50; 142; 145; 191). El receptor tipo V1 es el encargado de las respuestas vasoconstrictoras a vasopresina. El receptor tipo V2 es miembro de la familia de receptores con siete regiones transmembrana, acoplados a proteínas G heterotrimericas, cuya actividad está ligada a la adenilato ciclasa (193). La estimulación del receptor con vasopresina estimula la conversión de guanosin difosfato a guanosin trifosfato

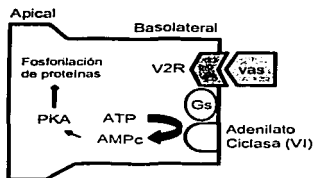


Figura 5. Mecanismo celular de acción de la vasopresina. La vasopresina se une al receptor V2 en la membrana basolateral de las células del asa ascendente gruesa de Henle, activando la proteína Gs, que a su vez estimula a la adenilato ciclasa para generar producción de AMPc, mismo que activa a la PKA, cuya función es la fosforilación de proteínas

(GDP-GTP) en la subunidad- α de la proteína heterotrimérica G unida a GTP, Gs. La $G_{\alpha s}$ activada, estimula a la adenilato ciclasa basolateral, resultando en un incremento en los niveles de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) en la célula. El aumento en los niveles intracelulares de AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA), la cual es responsable de fosforilar proteínas en la célula, incluyendo factores de transcripción. Esta cascada de señales resulta en la inserción, a la membrana apical de la célula, de vesículas con canales de agua (138) y en un aumento en la fosforilación de los transportadores de urea (208).

En el túbulo colector la vasopresina estimula la inserción de canales de agua conocidos como acuaporina-2 (114; 125; 138). Estos canales previamente sintetizados, se localizan en vesículas cerca de la membrana apical de la célula. En ausencia de vasopresina, las vesículas que contienen acuaporina-2 permanecen en el espacio submembranal, por lo que la permeabilidad de la membrana apical al agua se mantiene baja, mientras que en presencia de vasopresina las vesículas se fusionan con la membrana apical, con lo que aumenta la permeabilidad al agua. Este mecanismo de reciclaje de canales de agua permite el rápido control de la permeabilidad al agua de la membrana. El agua que ingresa a la célula por la membrana apical sale por la membrana basolateral a través de canales de agua.

De igual manera la vasopresina incrementa la permeabilidad del túbulo colector a urea, mediante el aumento en la fosforilación de transportadores de urea, conocidos como UT1 (173; 207; 208). El aumento en la osmolaridad del fluido intersticial también estimula los transportadores de urea, este efecto es independiente y aditivo al de vasopresina.

En el asa ascendente gruesa de Henle la vasopresina incrementa la reabsorción de sodio, potasio y cloro a través de la estimulación del cotransportador de $Na^+K^+:2Cl^-$ presente en la membrana apical de las células. Los mecanismos de regulación del cotransportador de $Na^+K^+:2Cl^-$ por vasopresina no han sido estudiados a nivel molecular. La presente tesis trata en parte este asunto.

El riñón minimiza la pérdida de líquido durante el déficit de agua, a través del sistema de osmorreceptores para vasopresina. Además de esto se requiere una adecuada ingesta de líquido, para contrarrestar la pérdida de agua por la respiración, el sudor y el

tracto gastrointestinal. La ingesta de líquido es regulada por el mecanismo de sed, que junto con el sistema de osmorreceptores para vasopresina, mantiene el control preciso de la osmolaridad del líquido extracelular y de la concentración de Na^+ . Muchos de los factores que estimulan la secreción de vasopresina también estimulan la sed, que es definida como el deseo conciente de ingerir agua.

Fisiología del Asa Ascendente Gruesa de Henle

En el asa ascendente gruesa de Henle la reabsorción de Na^+ en la membrana apical se lleva a cabo mediante un proceso de cotransporte activo secundario por el cotransportador electroneutro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (130), que funciona gracias al gradiente químico de concentración de Na^+ entre el fluido tubular y el citoplasma celular, generado por la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa presente en la membrana basolateral (Figura 6). El transporte al intersticio renal del Cl^- que ingresa a la célula a través del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en la membrana apical, se lleva a cabo por los canales de cloro denominados CLC-Kb (159) o por transporte activo secundario unido al potasio (Cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$) (136) (Figura 6). En la membrana apical el potasio es reciclado hacia la luz tubular a través de los canales de potasio conocidos como ROMK, que pertenecen a la súperfamilia de los canales rectificadores entrantes (61) (Figura 6). El reciclaje de potasio hacia la luz es un evento que fisiológicamente es necesario para mantener la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y para la reabsorción de cationes divalentes. Debido a la mayor concentración de Na^+ (145 mEq/L) y Cl^- (110 mEq/L) en el plasma, en comparación con la de K^+ (4 mEq/L), la cantidad

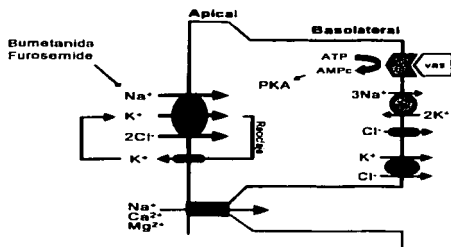


Figura 6. Célula del asa ascendente gruesa de Henle

filtrada de NaCl es mucho mayor que la de potasio y, por lo tanto, la cantidad de sodio y cloro disponible para transporte en la luz del asa ascendente de Henle es mucho mayor que la de potasio. Por este motivo, si el K^+ no reciclara hacia la luz del asa, llegaría un momento en que el transportador de $Na^+:K^+:2Cl^-$ no podría seguir funcionando por ausencia de K^+ en el medio. Con el reciclaje de potasio a través del canal ROMK se asegura que la concentración de K^+ en la luz se mantenga constante, a pesar de la gran actividad del cotransportador de $Na^+:K^+:2Cl^-$. Además, el reciclaje de K^+ hacia la luz tubular genera voltaje positivo dentro del túbulo, ya que el Na^+ que entra a la célula por la membrana apical es expulsado hacia el intersticio por la $Na^+:K^+-ATPasa$ y el Cl^- es expulsado por el canal de cloro CLC-Kb. En consecuencia, se concentran dos aniones y un catión en el intersticio, mientras que el otro catión, que es el K^+ , se queda en la luz del asa de Henle. El voltaje positivo que se genera es responsable del transporte de cationes por vía paracelular (88; 90). Dada la concentración de cationes en el líquido tubular, los que con mayor probabilidad pueden transportarse por este mecanismo son el sodio y los cationes divalentes como calcio y magnesio (75; 82) (Figura 6), los cuales lo hacen a través de la proteína paracelina-1 que pertenece a la familia de las claudinas y se expresa en las uniones estrechas en el asa ascendente gruesa de Henle (17; 179). Así, la activación molecular del cotransportador de $Na^+:K^+:2Cl^-$, de los canales de potasio apicales sensibles a ATP y de los canales de Cl^- en la membrana basolateral hace al epitelio termodinámicamente más eficiente porque permite aumentar la reabsorción de Na^+ sin que esto represente mayor gasto de energía, ya que la reabsorción del segundo catión se hace por vía paracelular.

La reabsorción de NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle es vital para el mecanismo de contracorriente en la médula renal y para la excreción de orina concentrada. En el asa ascendente gruesa de Henle, la vasopresina no sólo tiene efectos sobre el cotransportador de $Na^+:K^+:2Cl^-$ (83; 131; 183), también aumenta la expresión del canal de potasio ROMK (41; 156; 203) y del canal de cloro CLC-Kb (133; 160; 171). Lo cual apoya la importancia de cada una de estas proteínas para la adecuada función de este segmento de la nefrona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el asa ascendente gruesa de Henle medular se ha reportado una mayor capacidad de transporte de NaCl, mientras que en la parte cortical se ha observado una mayor capacidad de dilución de iones (24; 158).

COTRANSPORTADOR DE $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ SENSIBLE A BUMETANIDA (CSB)

El cotransportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, conocido como CSB1 o NKCC2, se localiza en la membrana apical del asa ascendente gruesa de Henle, transporta sodio, potasio y cloro al interior de la célula. En este cotransportador el amonio (NH_4^+) puede sustituir al K^+ , por lo que también juega un papel importante en el metabolismo ácido-base (65). Su función es inhibida por los diuréticos de asa, derivados del ácido sulfamoiolantranílico (furosemida, bumetanida, piretanida, ácido etacrínico, etc.) (157). De ahí que estos diuréticos sean agrupados bajo el nombre de diuréticos de asa, porque es en el asa de Henle en donde ejercen su acción diurética.

Con anticuerpos específicos y técnicas de Western blot e inmunomicroscopía se ha demostrado que el CSB1 se expresa exclusivamente en la membrana apical del asa ascendente de Henle (40; 109), además estudios de inmunomicroscopía electrónica han demostrado la presencia del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en vesículas intracelulares en células del asa ascendente gruesa de Henle (141).

El CSB1 juega un papel importante en el mecanismo de contracorriente, en el mantenimiento del volumen extracelular y en la reabsorción de calcio y magnesio y es regulado por factores físicos y hormonales (70; 77; 108; 200). En la década de los 70's y principios de los 80's, los estudios de micropérfusión *in vitro* en asa ascendente gruesa de Henle de mamíferos (24; 25; 85; 164) establecieron cuatro características principales de la absorción de NaCl en este segmento de la nefrona. Primero, la reabsorción de Cl^- ocurre en contra de su gradiente electroquímico. Segundo, la absorción neta de NaCl produce un voltaje positivo transepitelial que puede ser inhibido en presencia del diurético de asa furosemida. Tercero, tanto la diferencia de voltaje transepitelial como la absorción neta de Cl^- dependen de la actividad de la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral. Y cuarto, este segmento de la nefrona es eléctricamente permeable, por vía celular y paracelular, esta última siendo selectiva para cationes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con la evidencia de la existencia de un cotransporte electroneutro de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ en células Ehrlich (60), se logró concluir que en el asa ascendente gruesa de Henle (médula) la absorción de NaCl se lleva a cabo en la membrana apical de manera electroneutra, proceso estimulado por vasopresina que involucra la entrada de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, y que el K^+ proviene principalmente del reciclaje al líquido luminal a través de la membrana apical (88). La dependencia de cloro en el transporte de sodio y potasio, en este segmento de la nefrona, fue confirmada en estudios con vesículas de membranas apicales preparadas de asa ascendente gruesa de Henle (médula), donde evaluaron la captación de Cl^- y Na^+ marcados radioactivamente (47; 112) y la unión de [^3H]bumetanida (52). En experimentos con preparaciones de membrana (vesículas) de médula externa de conejo, se determinaron las constantes de afinidad aparente y los coeficientes de Hill para cada uno de los iones, y así se dedujo que la interacción de los tres iones en condiciones isotónicas es $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (118).

Los estudios de unión de [^3H]bumetanida por Forbush y colaboradores (52; 79) sugirieron la existencia de dos sitios de unión para el Cl^- . En preparaciones de membranas apicales de médula externa de perro, demostraron que la presencia de sodio, de potasio y de cloro es necesaria para la unión de bumetanida, misma que puede ser inhibida con concentraciones altas de Cl^- . Estos datos apoyan el modelo en el que la unión del primer Cl^- al sitio de alta afinidad, expone el segundo sitio de menor afinidad, el cual puede ser ocupado por bumetanida o por el segundo Cl^- (175; 177).

Síndrome de Bartter

El papel fundamental del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, del canal de potasio y del canal de cloro, en el transporte de NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle, ha quedado plenamente demostrado no sólo por estudios fisiológicos, sino también porque se ha identificado que mutaciones en cualesquiera de estos genes son responsables del síndrome de Bartter (127; 125). El síndrome de Bartter es un padecimiento hereditario, que se transmite en forma autosómica recesiva y se caracteriza por ser una nefropatía perdedora de sal, con trastornos en el metabolismo del potasio, del calcio y ácido base. El síndrome de Bartter fue descrito originalmente por Bartter y colaboradores en Maryland en 1962 (9), en un paciente con poliuria, alcalosis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

metabólica hipocalémica e hipertrofia del aparato yuxtaglomerular. En los últimos cinco años, el descubrimiento de varios genes involucrados en la producción de esta enfermedad nos ha mostrado que se trata de una enfermedad monogénica, pero con heterogeneidad genética y nos ha permitido entender más a fondo la fisiopatología de este síndrome, así como correlacionar las alteraciones genómicas con las características clínicas de pacientes con síndrome de Bartter. Aunado a esto y gracias al estudio de las bases moleculares del síndrome de Bartter se tiene una mejor comprensión de la fisiología del asa ascendente gruesa de Henle.

Esta enfermedad hereditaria se caracteriza por reducción de la función del asa ascendente gruesa de Henle que resulta en pérdida renal de sal con hipotensión arterial, alcalosis hipocalémica, inhabilidad para concentrar la orina y pérdida renal de calcio y magnesio. Por lo tanto, las características fisiológicas de los pacientes con síndrome de Bartter sugirieron que el defecto se localizaba en la porción gruesa del asa ascendente de Henle. Además, el hecho de que varias de sus manifestaciones clínicas fueran parecidas al efecto de la administración de diuréticos de asa y que algunos pacientes no presentaran respuesta al furosemida llevó a considerar al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ como el primer candidato para este trastorno. Con la explosiva identificación molecular al inicio de los 90's de los diversos genes que codifican para las proteínas de transporte en la nefrona, ha sido posible estudiar la relación de éstos con diversas enfermedades hereditarias y, hoy en día, la demostración de que cinco genes diferentes causan el síndrome de Bartter en humanos, resalta la importancia de la interrelación que existe entre estas proteínas y la función del asa ascendente gruesa de Henle, lo que ha servido para corroborar el esquema de reabsorción de sal mostrado en la figura 6. Los genes en los cuales se han detectado mutaciones como causa del síndrome de Bartter son el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ CSB1 (1; 15; 122; 176; 195); el canal de potasio ROMK (36; 49; 110; 172; 177; 180; 199); el canal de cloro CLC-Kb (121; 175); una proteína recientemente descrita, denominada barttina, que interviene en el transporte basolateral de Cl^- (16; 18; 198) y el sensor de calcio (196). La descripción detallada de la fisiopatología molecular del síndrome de Bartter se encuentra fuera de los objetivos de la presente tesis. Sin embargo, se puede encontrar

este detalle en el artículo incluido en el apéndice J (Meade P, et al. Rev Invest Clin 2003) (127).

La reducción en la reabsorción de NaCl en el asa ascendente de Henle origina pérdida de sal y de agua, lo que explica el desarrollo de hipotensión arterial. La hipovolemia consecuente activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona y de ahí la hipertrofia del aparato yuxtamedular. El aumento en la carga de Na⁺ que llega al túbulo colector, como consecuencia de la reducción en la reabsorción de iones en el asa de Henle, aumenta la reabsorción de Na⁺ por el canal de sodio sensible a amilorida. En esta región de la nefrona la secreción de K⁺ depende de la reabsorción de Na⁺, ya que el Na⁺ que ingresa a la célula en la membrana apical es expulsado en la membrana basolateral por la Na⁺:K⁺:ATPasa en intercambio por K⁺, el cual después de ingresar a la célula es secretado hacia la luz tubular por canales conductivos. Por lo tanto, el incremento en la reabsorción de Na⁺ tiene como consecuencia el aumento en la secreción de K⁺ y de ahí la hipocalcemia. Al haber más K⁺ en la luz del túbulo se estimula también el intercambio de K⁺ con H⁺ por la K⁺:H⁺:ATPasa en la membrana apical de las células intercaladas y de ahí la alcalosis metabólica. La exagerada secreción de aldosterona estimula aún más la secreción de potasio y de hidrogeniones, lo que contribuye al desarrollo de hipocalcemia y alcalosis metabólica. Finalmente, los mecanismos por los cuales se produce hipercalcemia son la falta del potencial positivo en el lumen por la pérdida de la función del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ que disminuye la reabsorción neta de calcio aumentando su concentración en orina y el incremento compensatorio en la reabsorción de NaCl en túbulo distal, inhibe la reabsorción de calcio en este segmento.

La Familia de Cotransportadores Electroneutros de Sodio, Potasio y Cloro

El cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ pertenece a la familia de cotransportadores electroneutros acoplados a cloro (CCC), que dentro de la base de datos del genoma humano recibe el nombre de SLC12. Esta familia está formada por proteínas membranales con homología estructural, cuya función es el transporte de cloro acoplado a cationes que pueden ser sodio, potasio o ambos (135).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A la fecha, se conocen ocho genes que codifican para miembros de esta familia (Figura 7). Se han identificado dos genes para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSB): SLC12A1 que codifica para la isoforma apical especifica del asa ascendente de Henle denominada CSB1 (o NKCC2) (55; 94; 147; 176) y SLC12A2 para la isoforma basolateral, ubicua, denominada CSB2 (o NKCC1), que también puede expresarse en células no epiteliales (34; 81; 149; 202; 206). Del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST) se conoce un solo gen (SLC12A3) (55; 56; 126; 178), presente exclusivamente en el túbulo distal y del cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ se han identificado cuatro genes (SLC12A4-7), tres para isoformas ubicuas (KCC1, KCC3 y KCC4) (148; 136) y uno para una isoforma neuronal (KCC2) (64). Recientemente se ha identificado el octavo gen perteneciente a la familia, que ha sido denominado CCC8 o CIP1 (proteína de interacción con CCC), del cual se desconoce su función, pero al parecer tiene un efecto negativo sobre la actividad de CSB2 (27).

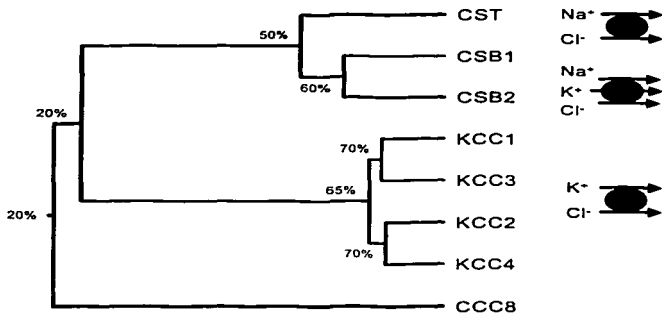


Figura 7. Árbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros acoplados a cloro. Formada por tres ramas: una de la subfamilia de los transportadores que transportan cloro acoplado a sodio (CSB1, CSB2 y CST), otra de la subfamilia de los que transportan cloro acoplado únicamente a potasio (KCC) y finalmente el gen CCC8. La identidad que existe entre las subfamilias, así como las diferentes identidades entre las secuencias de los miembros se indican en porcentajes.

La figura 7 muestra el árbol filogenético de la familia de proteínas, en la que claramente se observan tres ramas: una de la subfamilia de los transportadores que transportan cloro acoplado a sodio (CSB1, CSB2 y CST), otra de la subfamilia de los que transportan cloro acoplado únicamente a potasio (KCC) y finalmente el gen CCC8. La identidad que existe entre el gen CCC8 y las otras dos subfamilias es del 20% y la identidad entre la subfamilia de $\text{Na}^+:(\text{K}^+):\text{Cl}^-$ y la subfamilia de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ es del 20%. Las diferentes identidades entre las secuencias de los miembros de la familia se indican en la figura 7.

A pesar de las diferencias en la sensibilidad a diuréticos, así como en el tipo de iones y estequiometría del transporte, los cotransportadores electroneutros tienen alto grado de igualdad en la secuencia de aminoácidos y conservan la misma topología propuesta a través del análisis de hidrofobicidad (135). La figura 8 muestra la topología básica que consiste en una región hidrofóbica central de ~250 residuos de aminoácidos con 12 α -hélices, que se cree corresponden a regiones transmembrana, con un asa hidrofílica extracelular (glucosilada), entre los segmentos transmembrana TM7 y TM8. El dominio hidrofóbico central está flanqueado por dos asas predominantemente hidrofílicas: una amino terminal corta de 130 a 270 residuos de aminoácidos, con la mayor diversidad y

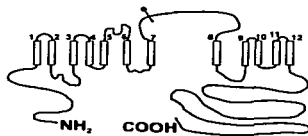


Figura 8. Estructura de los cotransportadores electroneutros. Doce regiones transmembrana, extremos amino y carboxilo terminales intracelulares, asa extracelular glucosilada entre TM7 y TM8

otra carboxilo terminal más larga, que varía de 127 a 450 residuos de aminoácidos con múltiples sitios potenciales para fosforilación vía proteína cinasa A (PKA) o proteína cinasa C (PKC) (135). La diversidad molecular de la familia de cotransportadores electroneutros es aún mayor dada la existencia de isoformas por empalme alternativo de algunos genes como CSB1, CSB2 y KCC3.

Biología Molecular del Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$

El cotransportador basolateral de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (CSB2) y el de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (CST), fueron los primeros en ser caracterizados molecularmente. El CST fue clonado, inicialmente a partir de la vejiga urinaria del pez conocido como lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*) (56), en el que Renfro y colaboradores (162; 161) y Stokes y colaboradores (182) habían previamente demostrado la existencia de este cotransportador. Mediante la estrategia de expresión funcional en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, Gamba y colaboradores aislaron el DNAC que codifica para el CST del lenguado de invierno (56). A partir de este punto fue posible identificar y clonar los genes homólogos de los demás miembros de la familia en mamíferos. El CSB2 fue clonado a partir de una librería de DNAC de la glándula rectal del tiburón *Squalus acanthias*, con la ayuda de anticuerpos monoclonales específicos para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (202).

Gamba y colaboradores (55) identificaron en una genoteca de riñón de ratón, mediante el análisis de Northern blot (Figura 9) con una sonda generada a partir del CST del lenguado de invierno, una banda que correspondía al CST en la corteza y dos bandas en la parte interna de la médula externa, una de 4.6 Kb y otra de 3.0 Kb. La banda de 4.6 Kb correspondía al CSB1.

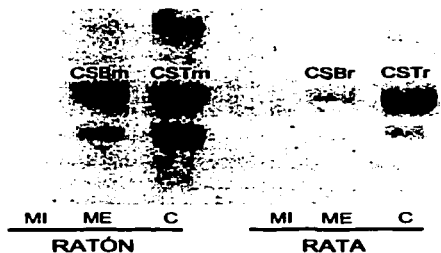


Figura 9. Northern blot de RNAm de riñón de rata y ratón. MI médula interna, ME médula externa, C corteza

En el caso del CSB1 hasta el momento se cuenta con el gen homólogo en rata (55), ratón (94), conejo (147) y humano (176). En el proceso de clonación del CSB1 de riñón de conejo, a partir de una librería de DNAC con una sonda generada a partir de la secuencia de CSB2 obtenida del tiburón, Payne y Forbush (147) identificaron en el gen de CSB1 la existencia de tres exones mutuamente exclu-

yentes. La región de 96 pb se localiza en el exón 4 y codifica para 32 aminoácidos que forman parte de la región transmembrana TM2 y la unión entre las regiones TM2 y TM3 de CSB1 (Figura 10). A las tres isoformas generadas por este mecanismo de empalme alternativo de exones, se les denominó A, B y F. Los análisis de Northern blot, realizados con alta estrictencia con oligonucleótidos antisentido específicos para cada isoforma, demostraron que las tres isoformas presentan un patrón de distribución específico. La isoforma B se localiza en la corteza, la isoforma F en la médula, mientras que la isoforma A se encontró tanto en corteza como en médula renal (Figura 12).

Con la evidencia de la existencia de otro transcrito en la médula externa de riñón de ratón (55) (Figura 9), Mount y colaboradores (134) y Plata y colaboradores (152) identificaron un segundo mecanismo de empalme alternativo de exones, generado por la presencia de un sitio donador interno en el exón 17 del gen de CSB1, aunado a un sitio de poliadenilación alterno, que consiste en la existencia de una isoforma que está truncada en el extremo carboxilo terminal. Esta isoforma tiene en total 770 aminoácidos. En comparación con el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ codificado por CSB1 que tiene 1095 aminoácidos, esta isoforma pierde 383 aminoácidos de los 457 que componen al extremo carboxilo terminal, pero tiene un dominio único de 55 aminoácidos al final del extremo carboxilo terminal (Figuras 10 y 11).

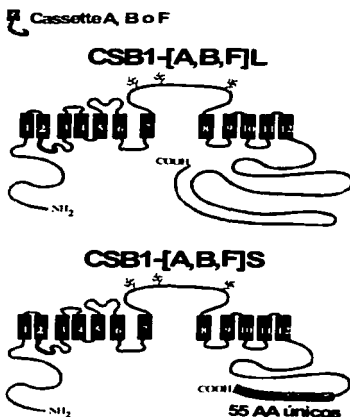


Figura 10. Isoformas del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en riñón de ratón

A

1 MSVSIPNSV PSSASRFQVH VINEHGSAA AVGDSADPPH YEETSFGDEA QNRLRISFRP

61 GNOECYDNFL QTGETAKTDT TFHAYDSHTN TYYLQTFGHN TMDAVPKIEY YRNTGSVSGP
TM1

121 KVNRPSELEI HEOLAKNVTV AFGSADRVAN GDGMPGDEQA ENKKEEDMTGV VKEGNVVGVV
TM2

181 VRCHLNINQV MLFIRLVTV GEAGIGLVL IILLSTMVTS ITGLSTSAIA TNGFVRGCGA
TM3 TM4

241 YYLERSLGP EFGSGIGLIE AFANAVAVANLVVGFPAETVV DLLKESDSMM VCEINDIRIK
TM5

301 GSITVVILG LYSVAGMEWA KAVVILVILVLTATANFFIGLVTVIPSNNEKK SRGFNYQOAS
TM6 TM7

361 IFAENFGPSF TKGEFFSVF ALFFPDTGVLGAWI SGDL EDPQDAIPRG TKCYVPTK

421 AVKQAVCVATCV RDTATGS MNOTIVSGMN CNGSAACGLG YDFSRQOHEP COYGLMNNFO
TM8

481 VMSMVGFGP GLTGGIISAT LSSRLVIVS PKVFQALCK DNIFKGLOFF AKGYGNNEP
TM9 TM10

541 LRGSLTFV SANARELLAEL NLIAPLISN DLNLYALINFS SYAKS PGWRPFAV
TM11

601 MMVSLRGAL LCCAVMEVIN NNAVITV CEGLVIVTV KKFEDVNWSS TQALSIVSAL
TM12

661 DNALELTVE DHVKNFRPOC IVLTGGPMTR PALLDITHAF TKNSGLCICC EVFVGRPKLC

721 VKEMNSGMAK KQAWLIKNI KAFYAAVAAD CFRDGVRSLL QASGLGRMKP NTLVIGYKKN

781 WRKAPLSELE NYVGIHDAF DFEIGVVIVR ISQGFDISPV LQVQDELEKL EQERLALAEA

841 IKDNECEEGK GGIRGLEFKA GKNITKPPAP KKGGNISSIQ SMHVGEFNQ LVEASAQFKK

901 KQSKGTIDVW WLFDDGGTLI LIPYILTRK KWKDCKLRIY VGGKINRIEE EKISNASLLS

961 KFRIFADIH IIGDINIKPN KESWVFEEM IEPYRLHESH KDLTAEKLLK RESPWKITDA

1021 ELEAVKEKSY QOVRLNELLO EHSRAANLIV LSLPVARCKG ISDLLYMAWL EILTKNLPV

1081 LLVRGNHKNV LTFYS

B

661 DNALELTVE DHVKNFRPOC IVLTGGPMTR PALLDITHAF TKNSGLCICC EVFVVRATSS

721 SSAFSLCSQ WVMLGGTETD HGNRKEKKRL GQEFSLKKG ENKQCNRGCK

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de CSB1-L (A) y del extremo carboxilo terminal de CSB1-S (B). En A los aminoácidos presentes únicamente en la región carboxilo terminal de CSB1-L están subrayados, los segmentos transmembrana están marcados como TM y sombreados en gris, los aminoácidos correspondientes al exón 4 (isoformas A, B y F) están encerrados en un rectángulo. En B los aminoácidos exclusivos de la región carboxilo terminal de CSB1-S se encuentran subrayados.

◆ Sitios potenciales de glucosilación. ○ Sitios potenciales de fosforilación para proteína cinasa C (PKC).

● Sitios potenciales de fosforilación para proteína cinasa A (PKA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha demostrado, mediante PCR, que este segundo mecanismo de empalme se combina con el descrito por Payne y Forbush (147), por lo que existen tres isoformas largas, a las que se les denominó inicialmente con el número 9 y ahora con la letra L (de long), CSB1-A.L, CSB1-B.L y CSB1-F.L que codifican para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, y tres isoformas cortas o truncadas, a las que se les denominó con el número 4 y ahora se les conoce como S (short), CSB1-A.S, CSB1-B.S y CSB1-F.S, que junto con las tres isoformas tipo L hacen seis isoformas (134). La secuencia de aminoácidos de la isoforma larga y del extremo carboxilo terminal de la isoforma corta de CSB1 se muestra en la figura 11.

La isoforma corta y la larga presentan diferentes sitios potenciales para fosforilación por proteína cinasa A (PKA) y por proteína cinasa C (PKC) en el extremo carboxilo terminal (Figura 11). CSB1-L tiene siete sitios potenciales para fosforilación vía PKC, dos en el extremo amino terminal (Ser57 y Thr75) y cinco en el extremo carboxilo terminal (Thr629, Thr927, Ser983, Ser999 y Ser1029); y dos sitios potenciales para PKA en el extremo carboxilo terminal (Ser1013 y Ser 1062). CSB1-S no tiene los dos sitios para PKA y cuatro de los cinco sitios para PKC presentes en el extremo carboxilo terminal

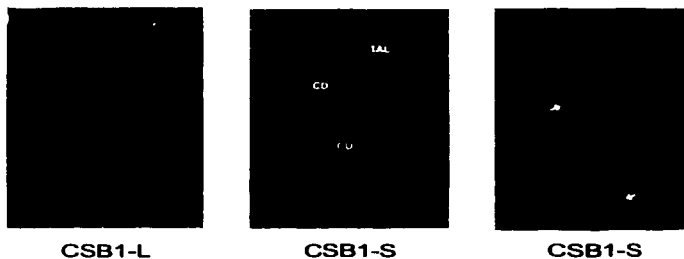


Figura 12. Inmunolocalización de CSB1-L y CSB1-S en el asa ascendente gruesa de Henle. Con anticuerpos dirigidos contra el extremo carboxilo-terminal de cada una de las isoformas se identificó la presencia de CSB1-L predominantemente en la membrana apical, mientras que CSB1-S se localizó en la región subapical

de CSB1-L. En el extremo único de 55 aminoácidos de CSB1-S hay dos sitios para PKC (Ser756 y Thr761) y uno para PKA (Thr761). La treonina 761 es un sitio potencial para fosforilación para PKA y también para PKC (134).

Con estudios de inmunohistoquímica (Figura 12) y análisis de Western blot con anticuerpos generados contra el

extremo carboxilo terminal específico de CSB1-L y CSB1-S, se encontró que ambas proteínas existen en la médula renal con el peso molecular esperado y que coexpresan en la membrana apical de las células del asa ascendente gruesa de Henle. La isoforma CSB1-L de localización apical y la isoforma CSB1-S subapical (134), como se observa en la figura 12.

La presencia de CSB1-S en el asa ascendente gruesa de Henle, fue menor en corteza en relación con la médula externa (134) (Figura 13).



Figura 13. Distribución de CSB1-L y CSB1-S en el asa ascendente gruesa de Henle. CSB1-A-L se expresa en corteza y médula, CSB1-B-L se expresa en corteza y CSB1-F-L se expresa en médula. CSB1-S se expresa menos en la corteza que en la médula

Regulación del Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$

Tanto factores físicos como hormonales (70; 77) modulan la reabsorción de NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle (108; 200). Como se muestra en la tabla 1, la vasopresina, el glucagón (37), la hormona paratiroidea (38), la calcitonina (38), la insulina (113; 124), los agentes β -adrenérgicos (39), los mineralocorticoides (76), los glucocorticoides (6) y una dieta alta en proteínas estimulan la reabsorción de NaCl. Mientras que la hipertonicidad peritubular, la prostaglandina E_2 (PGE_2), el calcio (84; 100), la adenosina (11), el factor de necrosis tumoral (45), los metabolitos del ácido araquidónico (43; 44), la acidosis (4; 5) y el factor natriurético auricular (143) la inhibien.

De estas hormonas, la vasopresina, el glucagón, la calcitonina y la hormona paratiroidea se unen a receptores acoplados a proteínas Gs (8). Estas hormonas promueven efectos similares, actuando a través de vías dependientes de AMPc, su función es estimuladora (185). Otros factores como el calcio extracelular y la PGE₂ inhiben esta estimulación por medio de la activación de proteínas Gi (185). El glucagón, la calcitonina y la hormona paratiroidea estimulan además del transporte de NaCl, el de potasio, magnesio y calcio en el asa ascendente gruesa de Henle (37; 38).

La insulina disminuye la excreción de NaCl en orina, este efecto es el resultado de un incremento en la reabsorción de sodio, cloro, calcio y magnesio en el asa ascendente gruesa de Henle, mecanismo que parece ser dependiente de AMPc (99). Apoyando estos resultados se ha demostrado la existencia de receptores de insulina en este segmento de la nefrona (113; 124; 137).

Estimulación	Inhibición
Vasopresina	Hipertonidad peritubular
Glucagón	Prostaglandina E ₂
Hormona paratiroidea	Calcio
Calcitonina	Adenosina
Insulina	Factor de necrosis tumoral
Agentes β-adrenérgicos	Acidosis
Mineralocorticoides	Factor natriurético auricular
Glucocorticoides	
Dieta alta en proteínas	

Tabla 1. Factores que regulan el transporte de NaCl en el asa ascendente de Henle

Dosis farmacológicas de mineralocorticoides (acetato de deoxicorticosterona) estimulan el transporte de sodio por medio de la activación de la Na⁺:K⁺-ATPasa (76). En el caso de los glucocorticoides, la administración de dexametasona a animales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

adrenalectomizados estimula actividad de CSB1, así como la expresión del RNAm y los niveles de proteína, por medio de la interacción con factores dependientes de AMPc (6).

Estudios de inmunoblot y RT-PCR han demostrado que la acidosis metabólica crónica incrementa la reabsorción de NaCl a través del aumento en la expresión del RNAm y de la proteína del CSB1, así como de su actividad como cotransportador (4; 5).

Por su parte, la PGE₂ es uno de los productos principales de la vía de la ciclooxigenasa en el riñón, y disminuye el aumento en los niveles de AMPc inducidos por vasopresina en el asa ascendente gruesa de Henle (192). El receptor presente en esta parte de la nefrona es el EP3 (20; 21; 186; 188), el cual está acoplado a proteínas Gi (inhibidoras) ligadas a adenilato ciclasa, cuya acción inhibe la producción de AMPc (22; 31). Al parecer el efecto de PGE₂ sobre CSB1 puede ser a través de la regulación del tráfico de vesículas o directamente sobre la actividad del cotransportador (107).

El calcio extracelular en el intersticio renal interactúa con una proteína de membrana conocida como sensor de calcio (23). Se trata de una proteína de membrana que funciona como receptor de calcio. A mayor calcio en el intersticio mayor será la producción de fosfolipasa A por parte del receptor y esto trae como consecuencia la producción de compuestos derivados del ácido araquidónico como el 20-HETE, que a su vez inhibe la función de CSB1 y del canal de potasio ROMK. De esta forma, si aumenta el calcio en el intersticio, se reduce la reabsorción de NaCl en el asa de Henle, se bloquea el reciclaje de K⁺ hacia la luz y por lo tanto, disminuye la reabsorción de calcio (163).

La adenosina es un modulador del flujo sanguíneo local y se ha propuesto como factor regulador de la demanda y el reparto de oxígeno. La adenosina es liberada en la médula renal durante estados de hipoxia, posiblemente para proteger a este segmento de la nefrona de daños isquémicos, inhibiendo directamente la absorción de NaCl y reduciendo el consumo de oxígeno relacionado con el transporte (11).

Las reacciones inflamatorias son generadas en gran parte por citocinas, de las cuales la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral son capaces de afectar el transporte de iones. En cultivos celulares primarios de asa ascendente gruesa de

Henle, ambas inhiben el transporte de $^{86}\text{Rb}^+$, probablemente como efecto de la estimulación de la síntesis de PGE_2 .

Los metabolitos del ácido araquidónico, dependientes del citocromo P450 inhiben el cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (43; 44). Compuestos como el 20-HETE y el 20-COOH-AA tienen efectos similares a los de la furosemida en el transporte de sodio y potasio en células del asa ascendente gruesa de Henle.

Regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ por vasopresina

En 1953, Wirz (201) sugirió que la vasopresina regula el mecanismo de contracorriente a través del aumento de la absorción de NaCl en el asa ascendente de Henle. Varias décadas después, con estudios de microdissección, se demostró la presencia de adenilato ciclasa sensible a vasopresina en el asa ascendente gruesa de Henle (médula y corteza) de roedores y de conejo (97; 98), así como la estimulación de los niveles intracelulares de AMPc por vasopresina (193). Pero fue hasta la década de los 80's cuando se comenzó el estudio del efecto de vasopresina sobre el transporte de iones en el asa ascendente gruesa de Henle (21; 53; 68; 80; 91; 169; 186). Varios grupos demostraron con estudios de microperfusión *in vitro*, que la vasopresina estimula simultáneamente el voltaje transepitelial y la absorción neta de Cl^- en el asa ascendente gruesa de Henle en médula (80; 85-87; 169), efecto que podía ser inhibido con varias condiciones, como presencia luminal de furosemida, ausencia luminal de sodio o cloro, ausencia peritubular de potasio y presencia de ouabaina peritubular. Además, los análogos de AMPc aumentaban el voltaje transepitelial y aceleraban la absorción neta de Cl^- de manera comparable a lo observado con vasopresina (85). Así, con estos trabajos fue posible concluir que el transporte de Cl^- en el asa ascendente gruesa de Henle en médula de ratón consiste en un proceso de cotransporte de Na^+/Cl^- apical y sensible a furosemida, y que la vasopresina a través de AMPc incrementa la absorción neta de NaCl , así como la salida conductiva de Cl^- a través de la membrana basolateral y el reciclaje conductivo de K^+ en la membrana apical (68-73; 83; 88; 171). Existe evidencia de que la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida en el asa ascendente gruesa de Henle es estimulada directa y rápidamente por vasopresina (83; 89; 131; 183), pero los mecanismos de esta acción no se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conocen. En estudios con anticuerpos específicos se ha demostrado que la administración de vasopresina aumenta la expresión de CSB1 en médula externa (111). En el caso de la isoforma basolateral del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ que es responsable de la secreción de fluidos en varios tejidos, se ha demostrado su regulación por fosforilación (123; 189), por lo que es posible que la vasopresina actúe sobre el CSB1 de la misma manera que lo hace con el cotransportador de urea UT1, es decir, estimulando su fosforilación (208). Estudios de inmunomicroscopia electrónica han demostrado la presencia del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en la membrana apical y en vesículas intracelulares, en células del asa ascendente gruesa de Henle (141), por lo que es posible que la vasopresina incremente la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en la membrana plasmática a través de la regulación del tráfico como se ha descrito para acuaporina-2 (114; 125). El análisis de la secuencia del promotor del gen del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ reveló la presencia de un elemento regulador de AMPc, que podría ser un potencial mediador de regulación transcripcional mediada por AMPc (95).

Regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ por una isoforma truncada

En el asa ascendente gruesa de Henle, bajo ciertas circunstancias, se ha observado la existencia de un cotransporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, independiente de K^+ , pero sensible a diuréticos de asa. Sun y colaboradores (183) reportaron en estudios de microperfusión y de suspensión de túbulos de asa ascendente gruesa de Henle, la existencia de un sistema de transporte sensible a furosemida, dependiente de sodio y cloro, pero independiente de potasio, mismo que en presencia de vasopresina se convierte en transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, es decir, se vuelve dependiente de la presencia de K^+ en la luz tubular. A este respecto, Eveloff y colaboradores (46; 47), habían demostrado que la osmolaridad extracelular altera la dependencia de K^+ en el transporte de sal en el asa de Henle. En células aisladas y vesículas de membrana preparadas de células de asa ascendente gruesa de Henle de médula de conejo (46; 47) observaron que en condiciones isotónicas, ~ 300 mOsm en mamíferos, la vía apical de reabsorción de Na^+ , medida como captación de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a furosemida y dependiente de Cl^- , no requería K^+ , mientras que al aumentar la osmolaridad extracelular, con la adición de

200mM de manitol, la reabsorción de NaCl se volvió dependiente de K^+ , es decir, se convirtió en cotransporte de $Na^+:K^+:2Cl^-$.

Estos hallazgos sugieren que el sistema de cotransporte de sodio en la membrana apical del asa ascendente gruesa de Henle es regulado por estímulos hormonales y volumen celular (Figura 14). Los mecanismos moleculares de estos fenómenos se desconocen. Como se mencionó anteriormente, el cotransporte de $Na^+:K^+:2Cl^-$ junto con el reciclaje de K^+ hacia la luz tubular favorecen la reabsorción de un segundo catión por vía paracelular, condición ausente en presencia de un sistema de transporte de $Na^+:Cl^-$. Por lo tanto, en condiciones de antidiuresis, cuando el organismo intenta retener agua y sal, el intersticio medular renal se vuelve muy hipertónico y aumenta la secreción de vasopresina, con lo que el epitelio del asa ascendente gruesa de Henle se torna termodinámicamente más eficiente, porque se reabsorben mayor cantidad de cationes por el mismo gasto de energía. En contraste, en condiciones de diuresis de agua, la tonicidad del intersticio medular renal y la secreción de vasopresina disminuyen, con lo que el transporte de sal se convierte en cotransporte de $Na^+:Cl^-$.

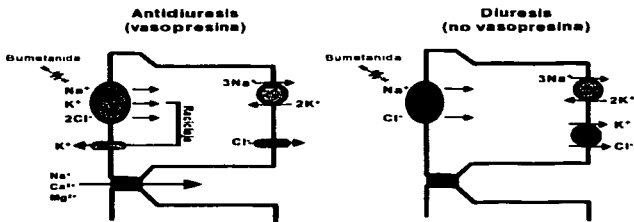


Figura 14. Fisiología del transporte en el asa ascendente gruesa de Henle. En condiciones de antidiuresis y en presencia de vasopresina, el transporte es de $Na^+:K^+:2Cl^-$ y en condiciones de diuresis y en ausencia de vasopresina el transporte es de $Na^+:Cl^-$

En el asa ascendente gruesa de Henle, la relación entre moles de Na^+ reabsorbidos por mol de O_2 consumido puede cambiar de 17:1 en ausencia de vasopresina (85; 86; 86), a una relación cercana a 36:1 en su presencia, es decir, el doble de reabsorción, con el mismo gasto de energía (183).

Apoyando la evidencia funcional de la existencia de dos sistemas diferentes de cotransporte sensible a diuréticos de asa, presentes en el asa ascendente gruesa de Henle, se han identificado dos sitios de unión a [^3H]bumetanida en preparaciones de membrana de médula externa de riñón de ratón (78), así como dos sitios de unión a [^3H]piretanida en preparaciones de membrana de médula externa de riñón de perro (62; 63). Además, en membranas de riñón de ratón, los estudios de fotomarcaje con el análogo fotosensible de bumetanida [^3H]ácido 4-benzoil-5-sulfamoil-3-(3-theniloxi)benzóico o [^3H]BSTBA revelaron que el sitio de alta afinidad a [^3H]bumetanida correspondía a una proteína de ~150-kDa, mientras que el sitio de baja afinidad a una proteína de ~75-kDa (78). Estos hallazgos, junto con las evidencias funcionales mostradas en los párrafos anteriores, generaron dos posibles hipótesis. La primera fue que el cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ en el asa de Henle fuera llevado a cabo por dos diferentes proteínas. Una de 150-kDa activable con AMPc e hipertonicidad y la otra, de 75-kDa, inhibible con AMPc e hipertonicidad. Así, en condiciones de antiuresis se activaría la de 150-kDa ($\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$), con inhibición de la de 75-kDa ($\text{Na}^+:\text{Cl}^-$), mientras que en condiciones de diuresis de agua sucedería lo contrario. La segunda hipótesis fue que el cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ en el asa de Henle fuera llevado a cabo por la misma proteína. En este caso, una proteína de 75-kDa podría ser la responsable de transportar $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$. Ante el estímulo apropiado (AMPc e hipertonicidad), la proteína de 75-kDa podría formar un dímero con peso de 150-kDa y adquirir la posibilidad de transportar $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

En el sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus laevis*, se analizó la función de proteínas que resultan por transcripción del gen SLC12A1 del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. La expresión funcional consiste en determinar la captación de $^{22}\text{Na}^+$ o $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de bumetanida en ovocitos previamente inyectados con RNA complementario (RNAc). Con este sistema se estudió el efecto de la actividad de la PKA sobre la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ codificado por CSB1-L y se

observó que en las tres isoformas tipo L (A, B ó F), la activación de la PKA con AMPc, junto con el inhibidor de las fosfodiesterasas isometil-butiril-metilxantina (IBMX) o la inhibición de la PKA presente en los ovocitos, con un inhibidor específico como el H89, no tiene ningún efecto sobre la función del cotransportador CSB1-L (Figura 4) (152). Este hallazgo llamó la atención ya que es bien conocido que la vasopresina estimula la producción de AMPc en el asa ascendente gruesa de Henle y aumenta el transporte de NaCl (2; 8; 82; 87; 131; 183), por lo que se pensó que quizá había falta algún factor, subunidad o proteína en los ovocitos inyectados con CSB1-L que permitiera la activación de este cotransportador con AMPc. Con el conocimiento de que la isoforma corta CSB1-S está presente junto con CSB1-L en las células del asa ascendente gruesa de Henle (Figura 12 y Figura 13) y con la idea de que pudiera afectar de alguna manera la función de CSB1-L, Plata y colaboradores (152) estudiaron la captación de $^{22}\text{Na}^+$ dependiente de bumetanida en ovocitos inyectados con ambas isoformas. Se observó que la estimulación del CSB1-L por AMPc requiere de la coexpresión con la isoforma CSB1-S. En la figura 15 se muestra la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con RNAc de CSB1-L y coinyectados con RNAc de CSB1-L y CSB1-S. La coinyección de CSB1-S con CSB1-L resulta en disminución significativa de la función de CSB1-L, efecto que fue revertido al agregar AMPc + IBMX al medio de incubación. El efecto negativo de CSB1-S sobre CSB1-L es dosis dependiente ya que a mayor concentración de CSB1-S se observó menor función de CSB1-L. Así mismo, se observó que este efecto es específico ya que no se reproduce al coinyectar CSB1-L con RNAc no relacionado, como renina o el canal shaker de potasio. Por lo tanto, Plata y colaboradores (152) propusieron que el efecto de AMPc sobre CSB1-L depende de la presencia de CSB1-S, mediante un modelo de efecto negativo dominante, en el que la actividad de transporte por CSB1-L está reducida por la presencia de CSB1-S. El efecto negativo de CSB1-S es modulado por fosforilación dependiente de AMPc (152). El trabajo de Plata y colaboradores (152) representa el primer acercamiento hacia el mecanismo molecular por el cual las hormonas que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G, como vasopresina a través de los receptores V2 en el asa ascendente gruesa de Henle, aumentan la reabsorción de NaCl. Debido a que CSB1-S se expresa exclusivamente en vesículas submembranales (134), una de las posibles

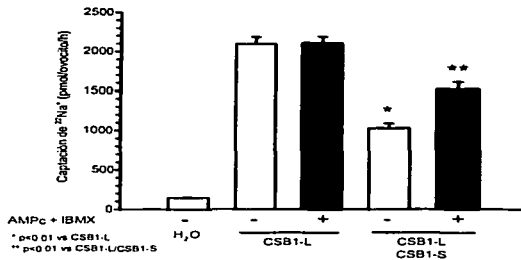


Figura 15. Efecto de CSB1-S sobre la función de CSB1-L en presencia y en ausencia de AMPc+IBMX. La captación de ²²Na⁺ en ovocitos inyectados CSB1-L es significativamente mayor que la observada en ovocitos control inyectados con agua, misma que no es afectada en presencia de AMPc+IBMX (primera barra negra). Los ovocitos coinjectados con CSB1-L y CSB1-S disminuyen la captación de ²²Na⁺ efecto revertido en presencia de AMPc+IBMX (segunda barra negra)

explicaciones es que el efecto negativo dominante de CSB1-S sobre CSB1-L implique regulación del tráfico de CSB1-L a la membrana plasmática, afectando la expresión del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ en la superficie del ovocito y por lo tanto su actividad. En la presente tesis nos propusimos profundizar en el estudio de las propiedades funcionales de las isoformas CSB1-L y CSB1-S del gen SLC12A1, para lo cual se generaron tres hipótesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

1. La isoforma corta CSB1-S disminuye la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ mediante la regulación a nivel de tráfico de vesículas.
2. La isoforma truncada del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, CSB1-S, es un cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida.
3. Las isoformas A, B y F del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (CSB1-L) presentan diferencias cinéticas, farmacológicas y funcionales, que correlacionan con las características fisiológicas y estructurales del asa ascendente gruesa de Henle.

OBJETIVOS

- I. Caracterizar los efectos de la activación de la proteína cinasa A (PKA), sobre la función de transporte y la expresión en membrana plasmática, de CSB1-L en ausencia y presencia de CSB1-S.
- II. Caracterizar las propiedades funcionales y de regulación de la isoforma CSB1-S.
- III. Determinar las características cinéticas, farmacológicas y funcionales de las isoformas A, B y F de CSB1-L.

METODOLOGÍA

El presente trabajo incluye técnicas de biología molecular y análisis de la expresión funcional y de la expresión en membrana plasmática de las isoformas de CSB1, en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

La proteína verde fluorescente

Para analizar y cuantificar la expresión de la proteína CSB1 en la membrana plasmática, se usó la proteína verde fluorescente conocida como EGFP por sus siglas en inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*. Esta proteína EGFP es una variante mutante de la proteína GFP, que genera fluorescencia 4-35 veces más brillante que la proteína GFP silvestre (30) y se encuentra insertada en el vector pEGFP-C1.

La proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) es una proteína extraída de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*. La luz es producida cuando la energía es transferida de la fotoproteína aequorina (activada por calcio), a la proteína verde fluorescente (209; 174). Así, la proteína GFP funciona como un sistema genético reportero que al ser expresado en células procariontes o eucariontes e iluminado con luz azul o ultravioleta, genera fluorescencia verde brillante. La fluorescencia de GFP es independiente de la especie, ya que no requiere cofactores, sustratos o productos génicos adicionales de *Aequorea victoria*.

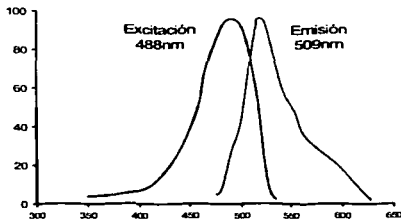


Figura 18. Picos de emisión y excitación de EGFP

El cromóforo GFP consiste en un tripéptido cíclico derivado de Ser-Tyr-Gly en la secuencia primaria de la proteína y fluoresce sólo cuando se encuentra en la secuencia completa de la proteína GFP. Del polipéptido completo de 238 aminoácidos, los aminoácidos 7-229 son necesarios para la fluorescencia. La proteína GFP silvestre absorbe luz ultravioleta y azul con un pico máximo de

absorbencia a 395 nm y un pico menor a 470 nm y emite luz verde con un pico máximo a 509 nm y con un hombro a 540 nm.

La proteína EGFP tiene dos sustituciones de aminoácidos Phe64Leu y Ser65Thr. Estas mutaciones en el cromóforo cambian el pico máximo de excitación a 490 nm y el pico máximo de emisión permanece en 509nm (Figura 16). La proteína EGFP ha mostrado ser una herramienta útil en el análisis de la expresión de proteínas en la superficie de membrana expresadas en sistemas de expresión heterólogo como los ovocitos de *Xenopus laevis* (28; 29; 51; 104), y células en cultivo (150).

Generación de la clona CSB1-L-EGFP

Para el análisis de la expresión de CSB1-L en la superficie de los ovocitos de *Xenopus laevis*, la proteína EGFP fue insertada en el extremo amino terminal de CSB1 (Figura 17). La construcción CSB1-L-EGFP se obtuvo de la siguiente manera. La secuencia de DNA que codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ fue liberada del plásmido pSPORT1, mediante digestión con las enzimas de restricción *Sal* I (extremo 5') y *Not* I (extremo 3'). El DNAC digerido se corrió en un gel de agarosa (Apéndice A), la banda de 4462 pb correspondiente a CSB1-L fue purificada a partir del gel con el estuche comercial 'Gel Purification Kit' de Quiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante y resuspendido en 30 μl de agua. Posteriormente fue ligado con la enzima ligasa T4 a 16°C, en el plásmido pSPORT2, el cual había sido previamente digerido con las enzimas *Sal* I y *Not* I. De esta manera fue posible tener enzimas de restricción flanqueando la secuencia de CSB1-L en los extremos 5' y 3' no transcritos, que coincidieran con enzimas de restricción presentes en el sitio de muticionamiento del vector pEGFP-C1.

El DNAC correspondiente al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ fue liberado nuevamente del plásmido pSPORT2 con las enzimas *Sal* I (extremo 5') y *Kpn* I (extremo 3') y la banda de 4492 pb fue purificada a partir del gel de agarosa y posteriormente ligada en el plásmido pEGFP-C1, el cual había sido previamente digerido con las enzimas *Sal* I y *Kpn* I.

Como resultado de esta ligación se obtuvo el plásmido pEGFP/CSB1-L, que contenía el inserto de la secuencia para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ unido al extremo 3'

(carboxilo terminal) del DNA que codifica para la proteína verde fluorescente EGFP. El DNac que contenía la región codificante de EGFP y parte de CSB1-L fue extraída del plásmido pEGFP-C1 por medio de digestión con las enzimas de restricción *Age* I y *Nsi* I. Con esta digestión se obtuvo un fragmento de DNA de 1339 pb que correspondía a la secuencia completa de EGFP (769 pb entre *Age* I y *Sal* I) y a 570 pb del inicio de la secuencia de CSB1-L (de *Sal* I a *Nsi* I). El DNac digerido se corrió en un gel de agarosa, la banda de 1339 pb fue purificada y posteriormente, mediante reacción de ligación, fue insertado nuevamente en el plásmido pSPORT1-CSB1-L digerido previamente con *Age* I y *Nsi* I. Finalmente se obtuvo la construcción pSPORT1/EGFP-CSB1-L, representada en la figura 17, lo cual fue comprobado con mapas de restricción usando diferentes enzimas de restricción y con secuenciación.



Figura 17. La proteína verde fluorescente, EGFP, insertada en el extremo amino-terminal de CSB1-L.

Para insertar la secuencia de EGFP a la isoforma corta CSB1-S, la clona pSPORT1/EGFP-CSB1-L fue digerida con las enzimas de restricción *Age* I y *Nsi* I para liberar el fragmento de DNA de 1339 pb correspondiente a la secuencia completa de EGFP y parte de la secuencia de CSB1-L. El DNac digerido fue purificado y mediante reacción de ligación fue insertado en el plásmido pSPORT1-CSB1-S digerido previamente con *Age* I y *Nsi* I. Así se obtuvo el plásmido pSPORT1/EGFP-CSB1-S.

Se transformaron células ultracompetentes de *Escherichia coli* XL10-Gold (Stratagene) mediante choque térmico con el DNA de pSPORT1/EGFP-CSB1-L y pSPORT1/EGFP-CSB1-S (Apéndice B), para obtener suficiente DNA con la realización de minipreps (Apéndice C).

Determinación de la expresión en membrana plasmática

Para estudiar la presencia en la membrana plasmática de CSB1-L-EGFP y el efecto de CSB1-S sobre ésta, el RNA complementario (RNAc) de CSB1-L-EGFP fue sintetizado a partir del DNAc e inyectado en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Para sintetizar RNAc, el DNAc se linearizó en el extremo 3' con la enzima de restricción *Xba* I (Apéndice D). El RNAc fue sintetizado *in vitro* utilizando la enzima T7 RNA polimerasa, con el estuche comercial 'mMessage mMachine' de Ambion, siguiendo las instrucciones del fabricante (Apéndice E). La calidad del RNAc se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa/formaldehído (Apéndice F) y la cantidad determinada por espectrofotometría de ácidos nucleares a 260 nm.

Los ovocitos maduros extraídos y defoliculados de ranas hembras adultas *Xenopus laevis* (Apéndice G) fueron inyectados con 50 nl de agua que contenía 25 ng de RNAc de CSB1-L-EGFP en ausencia o presencia de diferentes cantidades de RNAc de CSB1-S (de 0 a 50 ng por ovocito). En cada experimento se inyectaron ovocitos con 50 nl de agua o con 25 ng de RNAc de CSB1-L (sin EGFP) como control. Después de la inyección, los ovocitos fueron incubados durante 4-5 días a 16°C en ND96 suplementado con 2.5 mM de piruvato de Na⁺ como fuente de energía y 5µg/ml de gentamicina para prevenir contaminación bacteriana, tiempo suficiente para la producción e inserción de la proteína en la membrana. El medio de incubación se cambió todos los días. Los ovocitos fueron analizados en el microscopio confocal, en solución Ringer ligeramente hipotónica (150 mOsm) (Apéndice G).

Para analizar la fluorescencia emitida por la proteína EGFP, cada uno de los ovocitos inyectados fue analizado con un microscopio confocal de barrido Carl Zeiss LSM510, con objetivo 10x, usando una longitud de onda de excitación de 488 nm (láser iónico multilínea de argón) y registrando la emisión con un filtro de 505 nm. La autofluorescencia en los ovocitos inyectados con agua fue minimizada ajustando los

parámetros de contraste y brillo a un tamaño de pinhole constante. Estos parámetros fueron usados para analizar la fluorescencia de CSB1-L-EGFP en todos los ovocitos estudiados.

La fluorescencia en la membrana plasmática fue cuantificada en secciones a nivel del ecuador del ovocito, usando el programa para análisis de imágenes SigmaScan Pro (Jandel Scientific).

En la microscopía confocal de barrido el haz de luz, llamado láser, 'corta' la imagen del objeto en rebanadas de micras de espesor, recogiendo el contenido de la imagen de la materia excitada por la luz y transformándola en señales digitales. En el microscopio confocal son usados mecanismos dirigidos por rayos de luz para escanear el espécimen observado punto por punto. Una pequeña región es iluminada mediante una fuente de láser que provee una alta intensidad de luz incidente sobre el objeto observado, el cual a su vez emite luz en forma de fluorescencia. La señal resultante es captada en un punto a la vez, por un tubo fotomultiplicador. La apertura focal de la lente del microscopio está estratégicamente colocada enfrente de este detector en un plano conjugado (condición denominada confocal), de manera que el punto iluminado está en foco mientras que se filtra e ignora toda luminosidad que esté fuera de foco. El conjunto de señales puntuales, con un increíble grado de nitidez y profundidad de campo, ingresa a la memoria de la computadora. Allí ésta las ordena para reconstruir la imagen total, la que finalmente se presenta al observador con procedimientos estándar de video.

Los resultados obtenidos en los análisis de expresión en membrana plasmática están representados en gráficas de barras, cada una de las barras es un grupo de ovocitos, inyectados con RNAc de CSB1-L-EGFP o coinyectados con RNAc de CSB1-L-EGFP y CSB1-S. Los grupos control inyectados con agua han sido eliminados de las gráficas para facilitar su comprensión y su comparación con las gráficas de expresión funcional. Sin embargo, es importante aclarar que en todos los experimentos realizados el grupo de ovocitos control, inyectado con agua, no presentaba fluorescencia que pudiera ser detectada en la membrana plasmática. En el eje de las ordenadas (Y) se muestra la media \pm el error estándar de la fluorescencia cuantificada en unidades arbitrarias. Las pruebas estadísticas usadas para analizar los resultados obtenidos fueron análisis de

varianza de una vía (ANOVA), con múltiple comparación usando las pruebas de corrección de Bonferroni; y la comparación entre el mismo grupo de ovocitos expuestos a diferentes condiciones fue realizada por la prueba t de Student pareada.

Determinación de la expresión funcional

Para analizar y comparar actividad y expresión en la membrana plasmática del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, se realizaron experimentos de expresión funcional de CSB1-L junto con los análisis de fluorescencia de CSB1-L-EGFP, en ovocitos provenientes de la misma rana. Esto con el fin de obtener datos sobre la interacción de las isoformas larga y corta de CSB1, realizados con captación de $^{86}\text{Rb}^+$ y con RNAC sintetizado al mismo tiempo.

Como el CSB1-L es un cotransportador electroneutro, no es posible utilizar la determinación de potencial transmembranal ya que la translocación de iones no tiene ningún efecto sobre ésta. Por este motivo medimos la expresión funcional mediante la captación de isótopos radioactivos como el $^{86}\text{Rb}^+$, el cual atraviesa la membrana celular por las mismas vías de transporte que el potasio.

Los experimentos de expresión funcional (Apéndice H) se llevaron a cabo en grupos de 10-15 ovocitos inyectados con RNAC de CSB1-L, a razón de 50 nl por ovocito de una solución a 0.5 μg de RNAC/ μl (25 ng por ovocito). En experimentos de co-inyección se inyectaron ovocitos con 50 nl de una solución con 25 ng de RNAC de CSB1-L y diferentes cantidades de RNAC de CSB1-S. Los ovocitos control fueron inyectados con 50 nl de agua por ovocito. Cuatro días después, la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ fue medida con el siguiente protocolo: 30 minutos de incubación en una solución ligeramente hipotónica (150 mOsm) sin Cl^- y K^+ , en presencia de ouabaina, seguida de captación de una hora, a una temperatura de 32°C, en una solución Ringer ligeramente hipotónica (150 mOsm) en presencia de ouabaina y con 2.0 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^{86}\text{Rb}^+$. La ouabaina se utilizó para bloquear la entrada de $^{86}\text{Rb}^+$ vía la bomba de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ ATPasa. Para determinar la captación específica por el CSB1 se incubó un grupo paralelo, en presencia de 100 μM de bumetanida, inhibidor específico del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$. La ligera reducción en la osmolaridad se utiliza porque los ovocitos de *Xenopus laevis* expresan el CSB2 que es completamente inhibido por la hiposmolaridad (55; 184).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Terminada la hora de captación los ovocitos fueron lavados en solución de captación fría y la radioactividad acumulada por ovocito se determinó por centelleo líquido en ovocitos lisados en SDS al 10%.

Los resultados obtenidos en los experimentos de expresión funcional están representados en gráficas de barras, cada una de las cuales es un grupo de ovocitos, inyectados con RNAc de CSB1-L o coinyectados con RNAc de CSB1-L y CSB1-S. En todos los experimentos los ovocitos inyectados con RNAc de CSB1-L presentaron incremento significativo en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en relación con el grupo de ovocitos control inyectado con agua, misma que fue inhibida en un 95% en presencia de bumetanida. Por lo tanto, los grupos control inyectados con agua, así como los grupos en presencia de bumetanida, han sido eliminados de las gráficas para facilitar su comprensión y su comparación con las gráficas de expresión en la superficie del ovocito. En el eje de las ordenadas (Y) se muestra la media \pm el error estándar de la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ expresada como nmol/ovocito/h. Las pruebas estadísticas usadas para analizar los resultados obtenidos fueron análisis de varianza de una vía (ANOVA), con múltiple comparación usando las pruebas de corrección de Bonferroni.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se dividen en tres partes, concordantes con las hipótesis y objetivos, y han sido reportados en los artículos correspondientes:

1. El análisis de la interacción de las isoformas larga y corta del gen SLC12A1 (Apéndice J; Meade P. et al, 2003 Am J Physiol Renal Physiol) (128).
 2. El análisis de la función independiente de la isoforma corta (Apéndice J; Plata C. et al, 2001 Am J Physiol Renal Physiol) (151).
 3. El análisis de las propiedades funcionales de las tres isoformas A, B y F del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (Apéndice J; Plata C. et al, 2002 J Biol Chem) (153).
- Los resultados correspondientes a la primera parte de la tesis se describen en detalle a continuación. Estos resultados corresponden al artículo publicado como primer autor. En la segunda y tercera parte de la tesis trabajé activamente en colaboración con otros miembros del laboratorio. Los artículos correspondientes se encuentran en el apéndice J y en esta sección se presenta un resumen de cada una de ellas. En el artículo acerca de la caracterización de CSB1-S como cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida, trabajé en los experimentos de expresión funcional, mientras que en el artículo de las propiedades funcionales de las isoformas A, B y F de CSB1-L participé en el estudio de la expresión en membrana plasmática. Todos estos resultados son parte del estudio de las características moleculares y funcionales del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

Interacción de CSB1-L y CSB1-S

El cotransportador apical de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSB1) es la principal vía para reabsorción de sal en el asa ascendente gruesa de Henle. El gen de CSB1 de ratón da origen a dos isoformas que difieren en la longitud y secuencia del extremo carboxilo terminal: una larga (CSB1-L), que codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y otra corta (CSB1-S), que ejerce un efecto dominante negativo sobre la función del CSB1-L, efecto que puede ser revertido por la activación de la proteína cinasa A (PKA) con AMPc, sugiriendo que la interacción entre ambas isoformas es necesaria para la regulación de CSB1-L por vasopresina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con el objetivo de estudiar más a fondo los mecanismos de la interacción entre CSB1-L y CSB1-S, centramos nuestro interés en determinar no solamente la actividad funcional del CSB1-L, sino también la expresión en la superficie de la membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus laevis*, para poder correlacionar función con presencia en la membrana. Esto con el fin de probar la hipótesis de que la reducción en la función de CSB1-L en presencia de CSB1-S es secundaria a la disminución de CSB1-L en la membrana plasmática del ovocito.

Expresión en membrana plasmática de CSB1-L-EGFP

Al analizar ovocitos inyectados con 25 ng de RNAc de CSB1-L-EGFP, en el microscopio confocal, se observó fluorescencia presente exclusivamente en la superficie del ovocito (Figura 18b). Los ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP fueron excitados a 488 nm y la fluorescencia emitida fue registrada a 505 nm. Los ovocitos control, inyectados con agua o con CSB1-L (sin EGFP) no mostraron fluorescencia alguna al ser analizados con los mismos parámetros (Figura 18a).



Figura 18. Imágenes representativas de ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP. Ovocito control inyectado con agua (a) y ovocito inyectado con RNAc de CSB1-L-EGFP (b)

Con el fin de determinar si la fluorescencia registrada en los ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP correspondía a la presencia en la membrana plasmática del cotransportador. Se analizó la colocalización en membrana plasmática de CSB1-L-EGFP y del marcador rojo fluorescente de lípidos de membrana *N*-(3-triethyl ammonium propyl) -4-(6-(4-

(diethylamino)phenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide, FM 4-64.

FM 4-64 es un fluoróforo lipofílico que ha sido usado para medir expresión en la membrana plasmática de otros transportadores, incluyendo el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST) que pertenece a la misma familia de proteínas (92; 102; 103). El FM 4-64 posee las propiedades óptimas para ser un marcador de membrana fluorescente. FM 4-64 se une a la capa externa de lípidos de la membrana

plasmática y satura los sitios de unión en ~50 segundos. Se mantiene unido a la membrana plasmática mientras esté presente en el medio de incubación a una concentración suficientemente alta. Es muy fluorescente en ambientes lipídicos, no penetra la membrana plasmática y no es citotóxico, por lo cual cuenta con las características para ser un marcador ideal de membrana plasmática en células vivas. Los ovocitos inyectados con RNAc de CSB1-L-EGFP fueron incubados a 4°C en presencia de FM 4-64 (2 μ M). La baja temperatura fue usada para inhibir la endocitosis de FM 4-64, y así asegurar que la fluorescencia provenía del marcador localizado en la membrana plasmática (103). La fluorescencia emitida por FM 4-64 en los ovocitos fue registrada con un filtro de 650 nm en ovocitos excitados con longitud de onda de 543 nm, la fluorescencia de FM 4-64 es indetectable a longitudes de onda menores a 580 nm.



Figura 19. Coexpresión de CSB1-L-EGFP con el marcador de lípidos de membrana FM 4-64.

Como muestra la figura 19, la fluorescencia de FM 4-64 obtenida a 4°C en el mismo ovocito inyectado con CSB1-L-EGFP se observa en color rojo. La fluorescencia específica de FM 4-64 fue detectada en la superficie del ovocito de manera similar que la fluorescencia específica de CSB1-L-EGFP (en verde) y la superimposición de las dos imágenes genera una señal amarilla, indicando colocación de FM 4-64 y de la proteína CSB1-L-EGFP. Se observó colocación en la superficie >99% de FM 4-64 y CSB1-L-EGFP en todos los ovocitos analizados. La correspondencia entre la fluorescencia observada a 488 nm correspondiente a CSB1-L-EGFP y la observada a 650 nm correspondiente a FM 4-64, indicó que la fluorescencia cuantificada en ovocitos

inyectados con RNAc de CSB1-L-EGFP era, en efecto, presencia en membrana plasmática del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$.

Con el microscopio confocal la fluorescencia intracelular de EGFP, en ovocitos de *Xenopus laevis*, no es detectada, ya que el láser no penetra células tan grandes y de ser así, la distribución de la señal de EGFP en células grandes es tan difusa que cae bajo los niveles de detección (3). Además, para descartar la posibilidad de que estuviéramos detectando fluorescencia de EGFP en vesículas submembranales, también analizamos la fluorescencia en ovocitos inyectados con RNAc de la isoforma corta CSB1-S-EGFP. CSB1-S no es capaz de llegar a la membrana plasmática y permanece en vesículas submembranales en ovocitos de *Xenopus laevis* incubados en condiciones isotónicas (151). En los ovocitos inyectados con CSB1-S-EGFP no se detectó fluorescencia específica de EGFP, con el microscopio confocal, al ser

analizados en las mismas condiciones que CSB1-L-EGFP (Figura 20a). La ausencia de fluorescencia en la superficie de los ovocitos inyectados con CSB1-S-EGFP no fue debida a la falta de expresión de la proteína, ya que como se observa en la figura 20b la proteína CSB1-S-EGFP fue detectada con análisis de Western blot (Apéndice I) usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra GFP.

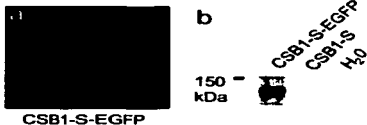


Figura 20. CSB1-S-EGFP. Imagen representativa de un ovocito inyectado con RNAc de CSB1-S-EGFP (a). Análisis de western blot en ovocitos inyectados con CSB1-S-EGFP, CSB1-S y agua (b)

Para demostrar que la fluorescencia de CSB1-L-EGFP representa expresión del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en la membrana plasmática de los ovocitos, estudiamos la correlación entre la expresión de CSB1-L-EGFP en la superficie del ovocito y la expresión funcional de CSB1-L (Figura 21). La actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ fue medida como captación de $^{86}\text{Rb}^+$ (nmol/ovocito/h) en ovocitos inyectados con concentraciones crecientes de RNAc de CSB1-L (3-25 ng). Como muestra la figura 21, se observó incrementó en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$, en función de la cantidad de RNAc inyectado en los ovocitos, alcanzando la fase de meseta alrededor

de 20 ng/ovocito de RNAc de CSB1-L. La expresión en la superficie de CSB1-L-EGFP se analizó de igual forma, en ovocitos inyectados con concentraciones crecientes de RNAc de CSB1-L-EGFP (3-25 ng). La fluorescencia se cuantificó en unidades arbitrarias y aumentó de manera similar, en función de la cantidad de RNAc inyectado, alcanzando la fase de meseta alrededor de 20 ng/ovocito de RNAc de CSB1-L-EGFP. Para construir la figura 21 se analizaron aproximadamente 20 ovocitos por grupo de dos diferentes ranas.

Al inyectar cantidades similares de RNAc de CSB1-L-EGFP o de CSB1-L, se observó correlación entre la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ y la expresión en membrana plasmática de la proteína CSB1-L-EGFP.

Todos estos resultados indicaron que la fluorescencia de EGFP detectada en la superficie de ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP era predominantemente expresión del cotransportador en la membrana plasmática.

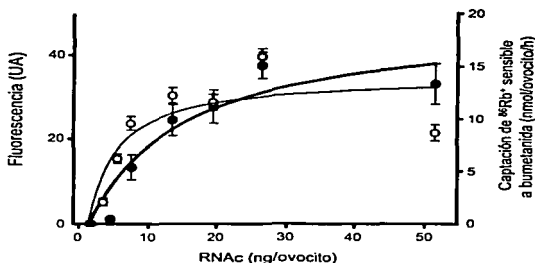


Figura 21. Dosis dependencia en la actividad y la expresión en membrana plasmática del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$. La expresión en la membrana plasmática de CSB1-L-EGFP (círculos negros) es expresada como intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias y corresponde al eje de la izquierda. La actividad de CSB1-L (círculos blancos) es expresada como captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en nmol/ovocito/h y corresponde al eje de la derecha. Cada punto representa el promedio \pm SEM de 20 ovocitos

Efecto del AMPc sobre la expresión en membrana plasmática y la función de CSB1-L

En estudios anteriores se había demostrado que el inyectar ovocitos de *Xenopus laevis* con RNAc de CSB1-L resulta en un incremento en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ que no es afectada con la activación de la proteína cinasa A (PKA) con AMPc (152; 153). Como primer paso en el estudio de la interacción de las isoformas larga y corta de CSB1, se estudió el posible efecto del AMPc, ahora sobre la expresión en la membrana plasmática del CSB1-L-EGFP.

Para determinar el efecto del análogo permeable de AMPc, dibutilil-AMPc (1 mM) y del inhibidor de las fosfodiesterasas isometil-butiril-metilxantina IBMX (1 μM), sobre la presencia de la proteína CSB1-L-EGFP en la membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus laevis*, varios grupos de ovocitos se analizaron antes y después de 30 minutos de exposición a AMPc + IBMX. Como se observa en las imágenes representativas de la Figura 22, no hubo cambio alguno en la intensidad de la fluorescencia después de la activación de la PKA. Los resultados obtenidos después



Figura 22. Imágenes representativas de ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP. En ausencia (a) y en presencia de AMPc + IBMX (b)

de analizar la expresión en membrana plasmática de CSB1-L-EGFP en ausencia y en presencia de AMPc + IBMX, en 80 ovocitos de cinco diferentes ranas, están representados en la Figura 23a. La intensidad de fluorescencia en ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP fue 37.5 ± 3.1 UA antes y 35.8 ± 5.8 UA después de añadir AMPc + IBMX ($p=\text{NS}$).

Estos resultados correlacionaron con la actividad del cotransportador medida como captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos inyectados con RNAc de CSB1-L, en ausencia y presencia de AMPc + IBMX. Como muestra la figura 23b y en concordancia con nuestras previas observaciones (152), la actividad de CSB1-L no fue afectada al añadir el análogo permeable de AMPc, junto con el inhibidor de fosfodiesterasas IBMX al medio extracelular (15.8 ± 0.7 nmol/ovocito/h en ausencia vs. 17.4 ± 1.4 nmol/ovocito/h en presencia de AMPc + IBMX, $p=\text{NS}$). Por lo tanto, la expresión en membrana

plasmática y la expresión funcional del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, inducida por la expresión heteróloga de la isoforma CSB1-L no fue afectada con la activación de PKA con AMPc + IBMX.

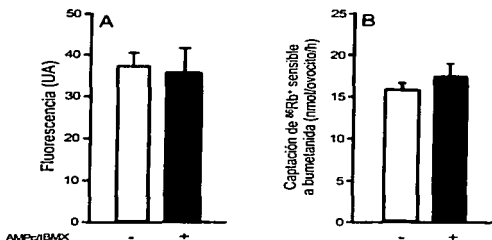


FIGURA 23. Efecto de la activación de la PKA sobre la expresión en membrana plasmática y la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$. A. Análisis de la intensidad de fluorescencia de ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP, antes (barra blanca) y después (barra negra) de exposición a AMPc + IBMX. B. Captación de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida en grupos de ovocitos inyectados con CSB1-L en ausencia (barra blanca) y presencia (barra negra) de AMPc + IBMX. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 80 ovocitos

Coexpresión de las isoformas larga y corta de CSB1 y la regulación por AMPc

En el asa ascendente gruesa de Henle, las isoformas CSB1-L y CSB1-S se expresan en la membrana apical (134) y en ovocitos de *Xenopus laevis*, la isoforma corta CSB1-S inhibe la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, efecto que puede ser revertido al activar la PKA con AMPc + IBMX (152).

Estos resultados sugirieron que el mecanismo a través del cual la vasopresina estimula la reabsorción de NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle, involucra la interacción de CSB1-L y CSB1-S y así, sugirieron la posibilidad de que el efecto negativo dominante de CSB1-S sobre CSB1-L implica regulación del tráfico de CSB1-L a la

membrana plasmática, afectando la expresión del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en la superficie del ovocito y por lo tanto su actividad.

Con el fin de conocer más a fondo el mecanismo por el cual CSB1-S regula a CSB1-L en un fenómeno dependiente de AMPc, analizamos los efectos de CSB1-S sobre la expresión en membrana plasmática de CSB1-L. Así, estudiamos la intensidad de fluorescencia en ovocitos inyectados con 25 ng de RNAc de CSB1-L-EGFP, solo o con 25 ng de RNAc de CSB1-S. En la figura 24, se presentan ejemplos de un ovocito inyectado con CSB1-L-EGFP (Figura 24a) y de un ovocito coinyectado con CSB1-L-EGFP y CSB1-S (Figura 24b), como se observa claramente, la intensidad de fluorescencia es menor en el ovocito coinyectado con CSB1-L-EGFP y CSB1-S en comparación con el ovocito inyectado únicamente con CSB1-L-EGFP. Después de



FIGURA 24. Imágenes representativas de ovocitos de *Xenopus laevis*. Ovocito coinyectado con RNAc de CSB1-L-EGFP (a) y ovocito inyectado con RNAc de CSB1-L-EGFP y CSB1-S (b)

analizar 100 ovocitos por grupo provenientes de seis ranas diferentes, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25a, los ovocitos coinyectados con CSB1-L-EGFP y CSB1-S mostraron fluorescencia significativamente menor al compararlos con los ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP (42.9 ± 3.5 UA y 73.9 ± 5.3 UA respectivamente, $p < 0.01$).

También se midió la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en el mismo grupo de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAc de CSB1-L solo o junto con RNAc de CSB1-S (Figura 25b). Consistente con la reducción en la expresión en la superficie de CSB1-L-EGFP inducida por CSB1-S, el análisis funcional en 100 ovocitos por grupo, confirmó una reducción significativa en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos coinyectados con 25 ng de RNAc de CSB1-L y 25 ng de RNAc de CSB1-S (7.76 ± 0.5 nmol/ovocito/h), comparado con los valores obtenidos en ovocitos inyectados únicamente con RNAc de CSB1-L (15.8 ± 0.7 nmol/ovocito/h, $p < 0.01$).

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que la isoforma corta del cotransportador apical de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ induce una reducción en la expresión en la membrana plasmática del cotransportador, que resulta en una reducción en la función del cotransportador.

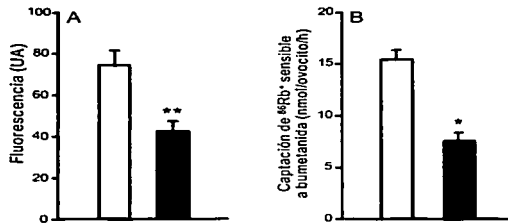


FIGURA 25. CSB1-S reduce la expresión en membrana plasmática y la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. A: Análisis de la intensidad de fluorescencia en ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP (barra blanca) y con CSB1-L-EGFP/CSB1-S (barra negra) ** $p < 0,01$ vs. CSB1-L-EGFP. B: Captación de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida en ovocitos inyectados con CSB1-L (barra blanca) y con CSB1-L/CSB1-S (barra negra) * $p < 0,01$ vs. CSB1-L. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 100 ovocitos.

La reducción en la expresión de CSB1-L-EGFP en la membrana plasmática del ovocito y en la actividad de CSB1-L, mostró un comportamiento similar en relación con la cantidad de RNAc de CSB1-S coinyectado. Cuando inyectamos ovocitos con 25 ng de RNAc de CSB1-L-EGFP junto con cantidades crecientes de RNAc de CSB1-S, de 6 a 50 ng/ovocito, se observó una disminución significativa y dosis dependiente en la intensidad de fluorescencia (Figura 26a), analizando 50 ovocitos provenientes de 5 ranas diferentes. Un patrón similar de inhibición dosis dependiente se obtuvo como resultado en los experimentos de expresión funcional, realizados en las mismas condiciones (Figura 26b), en ovocitos coinyectados con 25 ng de RNAc de CSB1-L junto con cantidades crecientes de RNAc de CSB1-S, de 6 a 50 ng/ovocito.

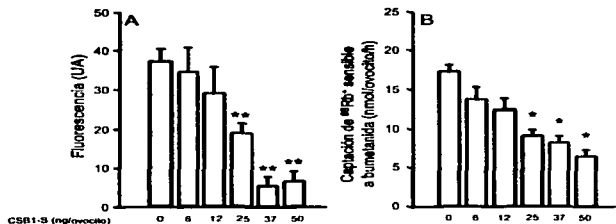


FIGURA 26. Dosis dependencia del efecto inhibitorio de CSB1-S sobre el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$. A: Análisis de la intensidad de fluorescencia en ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP solo o junto con concentraciones crecientes de CSB1-S ** $p < 0.01$ vs. CSB1-L-EGFP. B: Captación de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida en ovocitos inyectados con CSB1-L solo o junto con concentraciones crecientes de CSB1-S. * $p < 0.01$ vs. CSB1-L. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 50 ovocitos.

Dada la reducción en la expresión en membrana plasmática y en la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ inducida por CSB1-S en ovocitos de *Xenopus laevis*, estudiamos el efecto del AMPc + IBMX sobre la intensidad de fluorescencia y la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos coinyectados con ambas isoformas.

Al analizar ovocitos coinyectados con 25 ng de RNac de CSB1-L-EGFP y 25 ng de RNac de CSB1-S, antes y después de 30 minutos de exposición a AMPc + IBMX, se observó un incremento claro en la intensidad de fluorescencia en los ovocitos después de añadir AMPc + IBMX. Como se observa en la Figura 27, donde se muestra la imagen del mismo ovocito antes y después de ser expuesto a AMPc + IBMX. Con



FIGURA 27. Imagen representativa de un ovocito coinyectado con CSB1-L-EGFP y CSB1-S. Ovocito coinyectado con RNac de CSB1-L-EGFP y CSB1-S en ausencia (a) y en presencia de AMPc + IBMX (b)

el análisis de 40 ovocitos de 3 diferentes ranas, obtuvimos los resultados graficados en la Figura 28a. La reducción en la expresión en membrana plasmática de CSB1-L-EGFP en ovocitos coinyectados con CSB1-S fue parcialmente revertida al añadir al medio de incubación AMPc + IBMX (30.3 ± 4.8 UA antes vs. 49 ± 7.1 UA después de AMPc + IBMX $p < 0.01$).

Como se muestra en la figura 28b, resultados similares fueron obtenidos al estudiar la actividad en ovocitos coinyectados con 25 ng de RNac de CSB1-L y 25 ng de RNac de CSB1-S (7.76 ± 0.5 nmol/ovocito/h en ausencia vs. 9.0 ± 0.7 nmol/ovocito/h en presencia de AMPc + IBMX, $p < 0.01$).

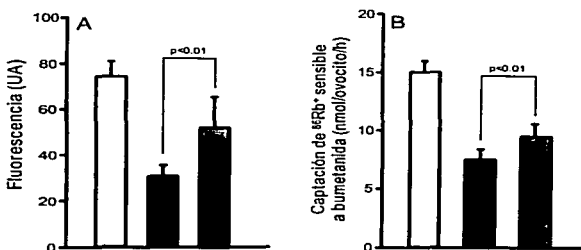


FIGURA 28. Efecto de la activación de la PKA sobre el efecto inhibitorio de CSB1-S sobre el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$. A: Análisis de la intensidad de fluorescencia en ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP solo (barra blanca) o junto con CSB1-S antes (barra negra) y después (barra gris) de AMPc + IBMX. B: Captación de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida en ovocitos inyectados con CSB1-L solo (barra blanca) o junto con CSB1-S en ausencia (barra negra) o presencia (barra gris) de AMPc + IBMX. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 40 ovocitos.

Adicionalmente, la construcción CSB1-S-EGFP también es capaz de reducir la función de CSB1-L y esta reducción también puede ser revertida en presencia de AMPc + IBMX (Figura 29).

En los ovocitos de *Xenopus laevis* la expresión en la superficie y por lo tanto, la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ pueden ser reguladas por el AMPc solo cuando las

isoformas CSB1-L y CSB1-S son coexpresadas, pero no cuando CSB1-L es expresada sola. El efecto de CSB1-S sobre la actividad de CSB1-L y su regulación por AMPc + IBMX se observaron cuando EGFP estuvo insertado en CSB1-L o en CSB1-S.

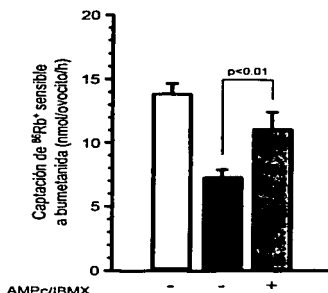


FIGURA 29. Efecto de CSB1-S-EGFP sobre la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. Captación de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a bumetanida en ovocitos inyectados con CSB1-L solo (barra blanca) y junto con CSB1-S-EGFP en ausencia (barra negra) o presencia (barra gris) de AMPc + IBMX.

Con la información de estos resultados, se puede proponer la hipótesis de que el mecanismo por el cual CSB1-S inhibe la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ incluye una reducción en la expresión en membrana plasmática, que es parcialmente revertida al activar a la PKA con AMPc.

Los resultados observados hasta el momento podrían explicarse en general por dos diferentes posibilidades. Una es que el efecto de CSB1-S y del AMPc sobre CSB1-L se lleva a cabo a nivel de tráfico de vesículas y la otra es que exista interacción entre CSB1-L y CSB1-S en la membrana celular que resulta en disminución de la actividad de CSB1-L. En este caso, el efecto del AMPc sería el de reducir esta

interacción, lo que permitiría a CSB1-L trabajar en forma adecuada, pero sin que esté implicado el tráfico de vesículas entre el espacio submembranal y la membrana celular. Para estudiar más a fondo estas posibilidades, se usó la construcción de la isoforma corta CSB1-S-EGFP. Se coinyectaron ovocitos con RNAc de CSB1-L y CSB1-S-EGFP. Como era de esperarse no se observó fluorescencia en la membrana plasmática de los ovocitos, ya que experimentos previos en nuestro laboratorio ha demostrado que en estas condiciones CSB1-S no llega a la membrana plasmática (152). Una de las posibles acciones de la PKA es la estimulación de la llegada a la membrana de vesículas con heterodímeros formados por CSB1-L y CSB1-S o en su defecto la

liberación de CSB1-L de los complejos heteroméricos formados con CSB1-S. Por lo cual, estudiamos el efecto de la activación de la PKA con AMPc + IBMX en este grupo de ovocitos, coinyectados con CSB1-L y CSB1-S-EGFP. Se registraron 20 ovocitos a diferentes tiempos de incubación con AMPc + IBMX, de 5 a 30 minutos, y no se observó fluorescencia emitida por CSB1-S-EGFP en la membrana plasmática de los ovocitos (agua 0.18 ± 0.1 UA; CSB1-L/CSB1-S-EGFP en ausencia 0.28 ± 0.06 UA y en presencia 0.23 ± 0.04 UA de AMPc + IBMX. $p=NS$). Este resultado sugiere que CSB1-S no llega a la membrana plasmática bajo estas condiciones, ni como homodímero o como heterodímero con CSB1-L.

La regulación de la expresión de CSB1-L en la superficie de los ovocitos, podría ser el resultado de alteraciones en el tráfico hacia (exocitosis) o desde (endocitosis) la membrana plasmática. Para estudiar este posible mecanismo, analizamos el efecto de colchicina, un inhibidor de la polimerización de tubulina (132) sobre la expresión en la superficie y la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se coinyectaron ovocitos con 25 ng de RNAc de CSB-L-EGFP y 25 ng de RNAc de CSB-S, y mediante microscopía confocal se estudio el efecto del AMPc + IBMX sobre la expresión en membrana plasmática de CSB-L-EGFP en presencia del inhibidor de la exocitosis colchicina (20 μM) (132). Los ovocitos fueron preincubados 15 minutos en presencia de colchicina antes de la incubación con AMPc + IBMX + colchicina. La

intensidad de fluorescencia en ovocitos coinyectados con CSB1-L-EGFP y CSB1-S es menor que la de ovocitos inyectados únicamente con CSB1-L-EGFP y el incremento debido al AMPc + IBMX fue prevenido con la adición previa de colchicina al medio extracelular. Un ejemplo de un ovocito coinyectado con CSB1-L-EGFP y CSB1-S en presencia de colchicina y en



FIGURA 30. Imagen representativa de un ovocito coinyectado con CSB-L-EGFP/CSB-S. En presencia de colchicina (a) y con colchicina en presencia de AMPc + IBMX (b)

presencia de colchicina + AMPc + IBMX se observa en la Figura 30. Después de varios experimentos los datos obtenidos se muestran en la Figura 31a (7.1 ± 2.8 UA antes vs. 6.7 ± 0.7 UA después de AMPc + IBMX + colchicina, $p=NS$).

De igual manera se analizó la actividad de CSB1-L en ovocitos coinyectados con 25 ng de RNAc CSB-L y 25 ng de RNAc de CSB-S. Se midió el efecto del AMPc + IBMX sobre la captación de $^{86}Rb^+$ en ovocitos tratados previamente durante 15 minutos con colchicina. Los resultados observados (Figura 31b) fueron similares a los análisis de expresión en membrana plasmática. La captación de $^{86}Rb^+$ observada en ovocitos coinyectados en CSB1-L y CSB1-S (6.2 ± 0.6 nmol/ovocito/h) no fue afectada por AMPc + IBMX en presencia de colchicina (6.3 ± 0.8 nmol/ovocito/h). Así, al bloquear los mecanismos de exocitosis con colchicina, se previene la respuesta de CSB1-L al AMPc + IBMX, tanto en expresión en membrana plasmática como en actividad del cotransportador de $Na^+K^+:2Cl^-$. La adición de colchicina en ovocitos inyectados con CSB1-L no tuvo efecto alguno sobre la presencia en la membrana plasmática de CSB1-L-EGFP, ni tampoco sobre la función de CSB1-L (Figura 31).

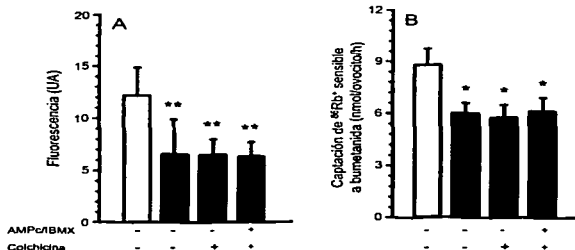


FIGURA 31. La inhibición de la endocitosis bloquea el efecto de AMPc + IBMX. A: Análisis de la intensidad de fluorescencia en ovocitos inyectados con CSB1-L-EGFP solo (barra blanca) o junto con CSB1-S (barras negras) antes y después de colchicina y de AMPc + IBMX + colchicina. B: Captación de $^{86}Rb^+$ sensible a bumetanida en ovocitos inyectados con CSB1-L solo (barra blanca) o junto con CSB1-S (barras negras) en presencia y en ausencia de colchicina y de AMPc + IBMX + colchicina. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 25 ovocitos.

Los resultados anteriores muestran que el efecto que la activación de la PKA con AMPc + IBMX tiene sobre la presencia en la membrana plasmática del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, involucra el tráfico de vesículas hacia la membrana, permitiendo que las vesículas que contienen CSB1-L migren a la membrana plasmática.

En resumen, en esta parte de la tesis se muestran los resultados que describen el efecto de la isoforma truncada en el extremo carboxilo terminal del gen murino *SLC12A1*, CSB1-S, sobre la expresión en membrana plasmática y la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$. Usando el sistema de expresión heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis*, demostramos mediante análisis de microscopía confocal que la isoforma CSB1-S ejerce un efecto negativo dominante sobre la expresión en membrana plasmática de la isoforma larga CSB1-L. Esta reducción en la superficie se acompaña de una disminución en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ y es dosis dependiente, entre más CSB1-S se inyecte en los ovocitos, menor es la expresión en membrana plasmática, así como la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$. Este efecto dominante negativo es revertido parcialmente con la activación de la PKA por AMPc + IBMX, en presencia de la isoforma corta CSB1-S, la expresión en la membrana plasmática de CSB1-L-EGFP aumenta con AMPc + IBMX, este fenómeno también está asociado con un incremento en la actividad del cotransportador. Finalmente, el incremento inducido por AMPc + IBMX sobre la expresión membrana plasmática y la función es bloqueada con el inhibidor de la excitosis colchicina.

Este trabajo reúne información suficiente para sugerir que el mecanismo por el cual la isoforma corta CSB1-S disminuye la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, es mediante la inhibición de la llegada a la membrana plasmática del cotransportador.

La posibilidad de que CSB1-L y CSB1-S compitan por la maquinaria de traducción en los ovocitos coinyectados, se descartó con los experimentos de coinyección de CSB1-L con RNac no relacionados, como renina o el canal shaker de potasio, donde no se observó reducción alguna en el transporte de Na^+ (152).

La regulación funcional de proteínas de membrana mediante isoformas reguladoras ha sido previamente descrita. Existen estudios en varios genes que sugieren un efecto de isoformas truncadas, incluyendo algunos cotransportadores renales (57; 190), proteínas no membranales, como factores de transcripción (7; 187) y en la regulación

de la actividad de la GMP-ciclase dependiente de óxido nítrico (12). El gen del cotransportador Na^+ /fosfato también produce isoformas truncadas con un efecto negativo dominante sobre la función del cotransportador (190).

Un ejemplo interesante en regulación negativa dominante, ocurre en el canal de potasio KvLQT1 , este gen está asociado al síndrome congénito de QT largo, y produce dos isoformas por empalme alternativo. Una forma el canal de potasio funcional y la otra, la isoforma truncada en el extremo carboxilo terminal, no tiene función como canal, pero ejerce un fuerte efecto negativo dominante bloqueando la función del canal, tanto en ovocitos de *Xenopus laevis*, como en células de mamífero (35). Además, se ha demostrado que los ratones transgénicos que sobreexpresan la isoforma truncada desarrollan arritmias cardíacas (35) y que en humanos, con la forma recesiva del síndrome de QT largo (síndrome de Jervell y Lange-Nielsen), las mutaciones en la isoforma negativa dominante correlacionan con el fenotipo de la arritmia cardíaca (129). Los mecanismos por los cuales las isoformas truncadas producen sus efectos negativos no han sido descritos. La competencia entre vesículas intracelulares que contienen diferentes isoformas o la formación de heterodímeros entre isoformas se han sugerido como posibles mecanismos. El único estudio que existe al respecto es en el receptor para glucocorticoides en el que se ha observado que la formación de heterodímeros no funcionales parece ser el mecanismo por el cual la isoforma negativa dominante reduce la función del receptor (144). La extensa revisión de la literatura e interacción con miembros de la comunidad científica nos permitió concluir que no existen estudios sobre este tema en transportadores de membrana. Por lo tanto, éste es el primer estudio que reporta mecanismos de interacción entre las isoformas de cotransportadores de membrana, generadas por empalme alternativo de exones. Se ha detectado la presencia del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ dentro de vesículas subapicales (141), por lo tanto, el tráfico de vesículas con CSB1-L a la membrana apical debe jugar un papel importante en su regulación. Además, en el riñón de ratón el anticuerpo contra CSB1-S reconoce principalmente la región submembranal, sugiriendo que esta isoforma tiene una distribución subapical en el asa ascendente gruesa de Henle (134).

Como posible mecanismo de regulación se propone que la interacción entre las isoformas corta y larga de CSB1 genera complejos heteroméricos de CSB1-L y CSB1-S, los cuales permanecen en vesículas submembranales. La interacción de CSB1-L y CSB1-S impide que las vesículas con el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ se inserten en la membrana. La acción del AMPc podría ser prevenir o disolver la interacción, lo que libera a CSB1-L y le permite migrar a la membrana plasmática; o bien, estimular la llegada de los heterodímeros de CSB1-L y CSB1-S a la membrana plasmática. La posibilidad de que CSB1-S no llegue a la membrana plasmática no está del todo descartada, es posible que permanezca un periodo de tiempo muy corto ahí y que sea inmediatamente internalizado a través de endocitosis o que la cantidad de CSB1-S que es insertado en la membrana junto con CSB1-L es poca para ser detectada con el microscopio confocal. Esta posibilidad se podría estudiar analizando este mecanismo en presencia de un inhibidor de la endocitosis como la concanavalina A (132) o coinyectando concentraciones mayores de CSB1-S-EGFP en los ovocitos. No sabemos si el complejo heteromérico de las isoformas CSB1-S y CSB1-L es activo cuando está presente en la membrana apical, de ser así es necesario estudiar si ambas proteínas son capaces de transportar iones al interior de la célula.

Una de las diferencias importantes entre CSB1-L y CSB1-S, es la presencia de diferentes sitios potenciales para fosforilación vía PKA (134). Esto quiere decir que la PKA puede actuar en cualquiera de las dos isoformas.

Tomando en cuenta todos estos resultados, sugerimos que la presencia de CSB1-S impide que CSB1-L se inserte en la membrana plasmática. Este efecto negativo es inhibido al activar la PKA con AMPc y el hecho de que la colchicina prevenga el efecto del AMPc, sugiere la participación de la exocitosis de vesículas submembranales. La presencia de CSB1-S es necesaria para la activación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ por AMPc. La distribución axial de CSB1-S en el asa ascendente gruesa de Henle, menos en corteza en relación con la médula externa (134), apoya la observación de que la vasopresina afecta la reabsorción de NaCl en el asa ascendente gruesa de Henle medular, más que cortical (24; 158).

En resumen, hemos demostrado que el efecto negativo dominante de CSB1-S sobre CSB1-L es la interacción al nivel de tráfico de vesículas. Se requieren más estudios

para definir el papel de la formación de heterodímeros en este mecanismo de interacción.

CSB1-S Codifica para el Cotransportador de Na⁺:Cl⁻ Sensible a Bumetanida

Como mencionamos en la introducción, evidencias fisiológicas y bioquímicas sugirieron la presencia de dos tipos de cotransporte en el asa de Henle. El de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ y el de Na⁺:Cl⁻. Ambos sensibles a diuréticos de asa como furosemida y bumetanida. El estudio de las propiedades funcionales de la isoforma CSB1-S mostró que esta isoforma es la que se comporta como un cotransportador de Na⁺:Cl⁻ sensible a bumetanida (151).

Las características funcionales de CSB1-S fueron estudiadas en el sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus laevis*, mediante captación de ²²Na⁺ o ⁸⁶Rb⁺ dependiente de bumetanida y furosemida en ovocitos previamente inyectados con 25 ng de RNAc de CSB1-S.

En condiciones de osmolaridad normal para el ovocito (~200 mOsm), los ovocitos inyectados con RNAc de CSB1-S no presentaron captación de ²²Na⁺ y los análisis de inmunohistoquímica mostraron que la mayoría de la proteína de CSB1-S, en estas condiciones, se encuentra en el citoplasma del ovocito y no en la membrana plasmática.

Al exponer a los ovocitos inyectados con CSB1-S a hipotonicidad (100 mOsm), se observó un incremento significativo en los niveles de captación de ²²Na⁺ pero no en los de ⁸⁶Rb⁺. La captación de ²²Na⁺ fue dependiente de Cl⁻, sensible a bumetanida, inhibida con la estimulación de PKA con AMPc + IBMX y estimulada con el inhibidor de la PKA H89, pero fue independiente de la presencia de K⁺. Además, la captación de ²²Na⁺ incrementó al disminuir la osmolaridad del medio entre 120 y 70 mOsm. En condiciones hipotónicas, los estudios de inmunohistoquímica mostraron que CSB1-S se expresa en la membrana plasmática.

Estos resultados demuestran que la isoforma corta CSB1-S codifica para un cotransportador de Na⁺:Cl⁻, activable con hipotonicidad, sensible a bumetanida y a AMPc. Y sugieren que la generación de estas dos isoformas, por empalme alternativo del gen de CSB1, forma parte del mecanismo molecular para el cambio de transporte

de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ a $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en las células del asa ascendente gruesa de Henle. Así, la presencia de dos isoformas del gen CSB1 afecta la estequiometría del transporte, la respuesta a cambios de volumen celular y la regulación de la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$

Artículo publicado en Apéndice J.

Propiedades Funcionales de las Isoformas A, B y F de CSB1-L

Como se mencionó en la introducción, existen tres isoformas del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, generadas por empalme alternativo, conocidas como A, B y F. Estas isoformas son el resultado de la existencia de tres exones mutuamente excluyentes, que codifican para parte del segmento transmembrana TM2 y para la unión con el segmento transmembrana TM3.

El análisis de las propiedades funcionales de las tres isoformas de CSB1-L, se realizó en el sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus laevis*, mediante captación de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de bumetanida en ovocitos previamente inyectados con 25 ng de RNAc de cada una de las tres isoformas de CSB1-L.

Las isoformas A y B tienen propiedades cinéticas similares, que difieren de las de la isoforma F. La isoforma F tiene la menor afinidad por los iones transportados. A pesar de la expresión de las tres isoformas en membrana plasmática de los ovocitos fue similar, la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ fue significativamente mayor en la isoforma A, lo cual sugiere que esta isoforma tiene una mayor capacidad de transporte.

Con lo cual proponemos que la isoforma A es un cotransportador de alta afinidad y alta capacidad de transporte; la isoforma B es un cotransportador de alta afinidad y baja capacidad de transporte; mientras que la isoforma F es un cotransportador de baja afinidad y baja capacidad de transporte.

Estas características cinéticas de transporte correlacionan con la localización de las isoformas a lo largo del asa ascendente gruesa de Henle. En el asa ascendente gruesa de Henle medular se ha reportado una mayor capacidad de transporte de NaCl , mientras que en la parte cortical se ha observado una mayor capacidad de dilución de iones (24; 158). La isoforma A con la mayor capacidad de transporte, se expresa a lo largo del asa ascendente gruesa de Henle, pero presenta mayor nivel de expresión en

la médula externa. La isoforma F con la menor afinidad por los iones, se expresa únicamente en la parte medular, predominantemente en la parte interna de la médula externa, donde las concentraciones de iones son muy altas (94; 204). La isoforma B con alta afinidad por los iones, se expresa en la corteza.

Por otro lado, la sensibilidad de bumetanida fue mayor en la isoforma B. Las tres isoformas A, B y F, fueron parcialmente inhibidas por hipotonicidad, pero en diferentes grados: $F > B > A$. Lo cual concuerda con la mayor exposición a una reducción de la tonicidad de la médula renal de la parte interna de la médula externa.

Los resultados de este trabajo demuestran la existencia de diferencias cinéticas, farmacológicas y funcionales importantes que concuerdan con la localización axial de las isoformas a lo largo del asa ascendente gruesa de Henle, lo cual tiene implicaciones fisiológicas y estructurales.

Artículo publicado en Apéndice J.

CONCLUSIONES

Todos los resultados anteriores son parte del estudio de las propiedades moleculares y funcionales de las isoformas del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

Con base en los resultados obtenidos proponemos el siguiente modelo de reabsorción de sal en el asa ascendente gruesa de Henle. El sistema de cotransporte de sodio en la membrana apical del asa ascendente gruesa de Henle es regulado por estímulos hormonales y volumen celular. Por lo tanto, en condiciones de antiuresis, cuando el organismo intenta retener agua y sal, el intersticio medular renal se vuelve muy hipertónico y aumenta la secreción de vasopresina, en la membrana apical aumenta la reabsorción de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y el reciclaje de K^+ como resultado de la activación de la PKA, la intensa reabsorción de sal diluye el fluido tubular y concentra el intersticio medular. En esta situación el Na^+ es reabsorbido por medio del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, CSB1-L. En cambio, en condiciones de diuresis de agua, cuando la tonicidad de la médula renal disminuye y la secreción de vasopresina es baja, el Na^+ es reabsorbido en ausencia de K^+ por medio del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, CSB1-S. Por otro lado, en las condiciones en las que CSB1-S no está activo como transportador y no llega a la membrana plasmática, su función es la regulación de la reabsorción de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ por CSB1-L. Así, CSB1-S reduce la función de CSB1-L previniendo su llegada a la membrana plasmática por medio de interacción a nivel de tráfico de vesículas.

APÉNDICE A

GEL DE AGAROSA PARA DNA

Gel

Por cada 10 ml de gel:
0.1 g agarosa
10 ml de TAE 1x *

Mezclar la agarosa con el TAE 1x en un matraz.
Disolver calentándolo (horno de microondas 1 minuto).
Dejar enfriar a ~50° C y vaciar en la caja.
Dejarlo secar 20 minutos.

Buffer de Carga

Para 2 ml:
1 ml glicerol (50%)
40 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 (10 mM)
5 mg Azul de Bromofenol (0.25%)
5 mg Xylene Iyanol FF (0.25%)
Esterilizar por filtración

Para correr el DNA mezclarlo con buffer de carga a razón de 1:4.
Vaciar las muestras en el gel sumergido en TAE 1x.
Correr el gel a 75 V durante 1 hora.

Teñir el gel en un recipiente con 100 ml de agua y 7 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml)
durante 10-15 minutos.
Para desteñir lavar en agua durante 5 minutos.

* **TAE 50x** (1 litro)
242 gr tris base
56 ml ácido acético glacial
100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
Esterilizar por filtración

APÉNDICE B

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS

Todo el procedimiento debe de ser en frío y con puntas de pipeta resistentes a aerosol (PCR) para prevenir la entrada de otros plásmidos no deseados

PREPARACIÓN

Enfriar tubos de 15ml (Falcon 352059) en hielo

Enfriar puntas de pipeta para PCR en el congelador para tomar las células

Descongelar en hielo las células competentes *Escherichia coli* tipo XL10-Gold (Stratagene), mezclar con la punta de la pipeta antes de usarlas

DNA de las clonas a 50 ng/ μ l

Cajas de Petri (100 x 200 mm) con agar LB y agar LB-ampicilina (100 μ g/ml)

Baño maría a 42°C

Medio LB a temperatura ambiente (100 μ l por tubo)

Baño seco o maría a 37°C

Horno a 37°C

Varillas para plaqurear

Controles: plásmido sin DNA en agar con ampicilina y agua en agar con y sin ampicilina

PROCEDIMIENTO

1. Mezclar el templete y las células: poner en un tubo frío 25-100 μ l de células con una punta fría y 1 μ l de DNA (~ 50 ng/ μ l)
2. Mezclar suavemente
3. Incubar en hielo durante 30 minutos
4. Calentar a 42°C durante 45 segundos
5. Incubar en hielo durante 2 minutos
6. Agregar 100 μ l de medio LB estéril a temperatura ambiente
7. Mezclar suavemente
8. Incubar durante 1 hora a 37°C y 225 rpm
9. Sembrar las células en el agar
10. Incubar toda la noche a 37°C

APÉNDICE C

OBTENCIÓN DE DNAC PLASMÍDICO (Miniprep)

1. Crecer una colonia en 2 ml de medio LB-ampicilina (100 µg/ml)
2. Incubar a 37°C y 225 rpm durante toda la noche
3. Centrifugar 1.5 ml del cultivo bacteriano durante 30 segundos, a 14,000 rpm y 4°C. Guardar el resto del cultivo a 4°C
4. Deshechar el sobrenadante
5. Resuspender en 100 µl de solución I fría
6. Agitar en vortex
7. Agregar 200 µl de solución II preparada antes de usar
8. Mezclar por inversión (cinco veces) y mantener en hielo
9. Agregar 150 µl de solución III fría
10. Mezclar por inversión
11. Incubar en hielo 3-5 minutos
12. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm y 4°C
13. Añadir 1 V de fenol-cloroformo-isoamil alcohol 25:24:1
14. Agitar en vortex
15. Centrifugar 2 minutos a 14,000 rpm y 4°C
16. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo
17. Precipitar el DNAC con 2 V de etanol a temperatura ambiente
18. Agitar en vortex
19. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente
20. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm y 4°C
21. Deshechar el sobrenadante e invertir el tubo en una sanita para eliminar el resto de sobrenadante
22. Añadir 1 ml de etanol al 70%
23. Mezclar por inversión
24. Centrifugar 2 minutos a 14,000 rpm y 4°C
25. Deshechar el sobrenadante
26. Incubar el tubo abierto a temperatura ambiente 5-10 minutos para evaporar el resto de etanol
27. Resuspender en 50 µl de agua biología molecular
28. Almacenar a -20°C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Solución I

50 mM glucosa
25 mM Tris-HCl (pH 8)
10 mM EDTA (pH 8)
esterilizar en autoclave
almacenar a 4°C

Solución II

0.2 N NaOH (diluida en el momento de stock 10N)
1% (w/v) SDS
preparar en el momento
usar a temperatura ambiente

Solución III

5 M acetato de potasio	60 ml	
ácido acético glacial		11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml	

almacenar a 4°C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE D

DIGESTIÓN DE DNAC

1. Digerir el DNAC (3µg) con la enzima de restricción apropiada (volumen final 50 µl):
3 µl de enzima Xba I
5 µl de buffer
3 µl de DNAC
39 µl de agua biología molecular
2. Incubar dos horas a 37°C
3. Llevar a un volumen final de 100 µl (50 µl) con agua biología molecular
4. Extraer con 1 V de fenol-cloroformo-isoamil alcohol 25:24:1 (100 µl)
5. Agitar en vortex
6. Centrifugar durante 4 minutos a 4°C a 14,000 rpm
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo ependorf (~95 µl)
8. Precipitar con 45 µl de acetato de amonio y 450 µl de etanol al 100%
9. Guardar a -20°C 1 hora
10. Centrifugar durante 30 minutos a 4°C a 14,000 rpm
11. Desechar el sobrenadante
12. Lavar el pellet con 1000 µl de etanol al 70%
13. Mezclar por inversión
14. Centrifugar durante 15 minutos a 4 °C a 14,000 rpm
15. Quitar el exceso de etanol y secar bien en el speed vac (3-5 minutos)
16. Resuspender en 8 µl con agua biología molecular
17. Tomar 1 µl para correr un gel de agarosa

APÉNDICE E

SÍNTESIS DE cRNA

1. Añadir al DNAc linearizado (7 μ l):
 - Agitar en vortex y microcentrifugar los reactivos (kit de Ambion)
 - 10 μ l de la mezcla 2x de ribonucleótidos
 - 2 μ l de buffer 10x de transcripción
 - 2 μ l de la mezcla 10x de enzima T7
2. Mezclar bien e incubar durante dos horas a 37° C
3. Agregar 1 μ l de DNAsa libre de RNAsas, mezclar bien
4. Incubar durante 15 minutos a 37° C
5. Agregar 115 μ l de agua del kit y 15 μ l de acetato de amonio
6. Agitar en vortex (volumen final 150 μ l)
7. Extraer en 1 V de fenol-cloroformo-isoamil alcohol 25:24:1 (150 μ l)
8. Agitar en vortex
9. Centrifugar durante 4 minutos a 4° C a 14,000 rpm
10. Pasar la fase acuosa a otro tubo ependorf (~145 μ l)
11. Precipitar con 1 V de isopropanol 150 μ l
12. Agitar en vortex
13. Incubar a -20° C mínimo 30 minutos
14. Centrifugar 30 minutos a 4 ° C a 14,000 rpm
15. Lavar con 1000 μ l de etanol al 70% frío
16. Mezclar por inversión
17. Centrifugar 15 minutos a 4° C a 14,000 rpm
18. Quitar el exceso de etanol y secar en el speed vac ~2 minutos
19. Resuspender en 20 μ l de agua biología molecular
20. Leer en el espectrofotómetro 2 μ l de cRNA con 498 μ l de agua
20. Tomar 1 μ l de cRNA para correr un gel de agarosa-formaldehído

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE F

GEL DE AGAROSA AL 1% FORMALDEHIDO PARA RNA

Gel

Por cada 10 ml de gel:
0.1 gr agarosa
8.5 ml agua destilada
1 ml MOPS 10x *
0.5 ml formaldehído

Mezclar la agarosa con el agua destilada en un matraz.
Disolver calentándolo (horno de microondas 1 minuto).
Añadir el MOPS 10x.
Dejar enfriar a 50° C y añadir el formaldehído.
Mezclar y vaciar en la caja.
Dejarlo secar 20 minutos.

Buffer de Carga

Por cada muestra de RNA:
5 µl formamida
1 µl MOPS 10x
2 µl formaldehído
1 µl gel loading (Sigma)
0.16 bromuro de etidio (10 mg/ml)

Mezclar 8.1 µl de buffer de carga con 1 µl de RNA.
Calentar a 65° C por 10 minutos.
Vaciar las muestras en el gel sumergido en MOPS 1x.
Correr el gel a 75 V durante 1 hora.
Para desteñir el gel se enjuaga en agua durante 10 minutos.

* **MOPS 10x** (1 litro)
41.86 g MOPS
6.8 g acetato de sodio
20 ml EDTA 0.5 M
pH 7.0 con NaOH 10 N
Esterilizar por filtración

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE G

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

1. Anestesar una rana por inmersión en tricaina al 0.17% (ácido etil éster 3-amino-benzoico), durante 30 minutos
2. Hacer una pequeña incisión en la parte inferior del abdomen
3. Exponer el ovario y cortar suficientes lóbulos para obtener los ovocitos necesarios. Suturar la herida incluyendo peritoneo interno con seda de 5-0
4. Colocar los lóbulos en una caja de petri con ND96 (ringer de rana) y cortarlos en pequeños racimos
5. Incubar los ovocitos en ND96 sin calcio durante 30 minutos y en ND96 sin calcio con colagenasa tipo B (2 mg/ml Boehringer) durante 90 minutos
6. Lavarlos tres o cuatro veces en ND96
7. Incubar durante la noche a 16°C en ND96
8. Pelar la capa folicular de cada ovocito individual utilizando pinzas finas bajo el microscopio
9. Inyectar ovocitos con el RNAc correspondiente
10. Incubar a 16°C en ND96 con 2.5 mM de piruvato de sodio y 5 mg/100 ml de gentamicina

ND 96

96 mM NaCl
2.0 mM KCl
1.8 mM CaCl₂
1.0 mM MgCl₂
5.0 mM HEPES/Tris
pH 7.4
Esterilizar por filtración

ND 96 sin Ca²⁺

96 mM NaCl
2.0 mM KCl
1.0 mM MgCl₂
5.0 mM HEPES/Tris
pH 7.4
Esterilizar por filtración

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE H

CAPTACIÓN DE $^{86}\text{Rb}^+$ EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Incubar en ND96 sin cloro la noche anterior al experimento

Precaptación

1. Incubar durante 30 minutos en solución de precaptación, ligeramente hipotónica (150 mOsm) sin Cl^- y sin K^+ con 1 mM de ouabaina

Captación

1. Incubar durante 60 minutos a 32°C en solución de captación, ligeramente hipotónica (150 mOsm) con 1 mM de ouabaina y $2.0 \mu\text{Ci/ml}$ de $^{86}\text{Rb}^+$

2. Lavar los ovocitos cinco veces en la solución de captación sin $^{86}\text{Rb}^+$ a 4°C

3. Transferir cada ovocito a un tubo de centelleo con $300 \mu\text{l}$ de 10% SDS

4. Después de que el ovocito esté lisado, añadir 1.0 ml de líquido de centelleo y contar las emisiones de cada tubo en el contador de centelleo

5. Para conocer la actividad específica en cada grupo contar las emisiones de $10 \mu\text{l}$ de la solución de captación en la que estuvieron los ovocitos, por triplicado

Ouabaina

Concentración final 1 mM (10^{-3} M)

Peso molecular 733.3

Stock 10 mM (10^{-1} M) 44 mg/600 μl de DMSO

10 μl de solución stock en 1 ml de solución de precaptación o captación

Bumetanida

Concentración final 100 μM (10^{-4} M)

Peso molecular 364.4

Stock 10 mM (10^{-2} M) 3.64 mg/1000 μl de DMSO

10 μl de solución stock en 1 ml de solución de precaptación o captación

Dibutiril-AMP c

Concentración final 1 mM (10^{-3} M)

Peso molecular 509.4

Stock 100 mM (10^{-1} M) 10 mg/200 μl de DMSO

10 μl de solución stock en 1 ml de solución de precaptación o captación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IBMX

Concentración final 100 μM (10^{-4} M)

Peso molecular 222.2

Stock 100 mM (10^{-1} M) 2.2 mg/100 μl de DMSO

1 μl de solución stock en 1 ml de solución de precaptación o captación

Colchicina

Concentración final 20 μM (20^{-5} M)

Peso molecular 399.4

Stock 20 mM (20^{-2} M) 1 mg/125 μl de agua

1 μl de solución stock en 1 ml de solución de precaptación o captación

ND 96 sin Cl^-

96 mM Isetionato de Na^+

2 mM gluconato de K^+

1.8 mM gluconato de Ca^{2+}

1 mM gluconato de Mg^{2+}

5 mM HEPES/Tris

pH 7.4

Esterilizar por filtración

Solución de Precaptación

150 mOsm

68 mM gluconato de Na^+

6.0 mM gluconato de Ca^{2+}

1.0 mM gluconato de Mg^{2+}

5 mM HEPES/Tris

pH 7.4

Esterilizar por filtración

Solución de Captación

150 mOsm

62 mM NaCl

10 mM KCl

1.8 mM CaCl_2

1.0 mM MgCl_2

5 mM HEPES/Tris,

pH 7.4

Esterilizar por filtración

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE I

WESTERN BLOT

Extracción de Proteínas

Homogenizar ovocitos en 2 μ l/ovocito de buffer de homogenización, pasando los ovocitos por una aguja varias veces

Centrifugar 10 minutos a 100g y 4°C

Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, evitando el precipitado y la capa blanca en la superficie

Centrifugar 10 minutos a 100g y 4°C

Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo

Cuantificar proteínas

Almacenar a -80°C

Buffer de homogenización

250 mM sacarosa

0.5 mM EDTA

5 mM Tris-HCl

pH 6.9

Añadir antes de usar

Cocktail de inhibidores de proteasas 1 tableta/50ml (Roche 1697 498)

1 mM de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)

Cuantificación de Proteínas

Reactivos de Bio-Rad

Mezclar

10 μ l del estándar o de la muestra (previamente diluida)

50 ml del reactivo A

400 μ l del reactivo B

Incubar durante 15 minutos

Leer las muestras en el espectrofotómetro a 750nm

Curva de calibración con albúmina bovina

Estándar	Stock (μ l)	Solución Salina (μ l)	Concentración (mg/ml)
St 5	100	0	1.47
St 4	80	20	1.176
St 3	60	40	0.88
St 2	40	60	0.588
St 1	20	80	0.294
Blanco	0	100	0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gel de Poliacrilamida

Gel de separación al 7.5%

Agua destilada	5.05 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	2.25 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 μ l
APS 10%	100 μ l
Temed	6 μ l

Gel de concentración

Agua destilada	2.8 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	600 μ l
Tris 1.0 M pH 6.8	500 μ l
SDS 10%	40 μ l
APS 10%	40 μ l
Temed	6 μ l

Hacer una marca en el vidrio chico a 5 cm de la base

Vaciar el gel de separación hasta la marca

Agregar lentamente agua hasta el borde, para evitar malformación del gel

Una vez solidificado el gel de separación, tirar el agua y secar el exceso

Vaciar el gel de concentración y colocar el peine (1mm)

Buffer de carga 2x

50 ml	
SDS 6%	3 g
Glicerol 15%	6 ml
Tris 150 mM	0.91 g
Azul de bromofenol 0.3%	0.15 g
pH 7.6	
β -mercaptoetanol 2%	1 ml

Buffer para electroforesis 5x

1 litro

Tris	15.1g
Glicina	94g
SDS 10%	50ml
Agua	1l
pH 8.3	

Preparar las muestras 1:1 con buffer de carga

Calentar las muestras a 94°C por 5 minutos

Correr el gel a 50V gel de concentración y a 100V gel de separación

Tinción de las Proteínas en el Gel

Para observar la separación de las proteínas en el gel de poliacrilamida, se tinte el gel en una solución de azul de Coomasie durante 1 hora, en agitación. El gel se destiñe con la solución de desteñido en agitación, hasta eliminar el exceso de colorante, cambiando la solución cuantas veces sea necesario

Azul de Coomasie

100 ml	
Metanol	45 ml
Agua destilada	45 ml
Ácido acético	10 ml
Azul de coomasie 0.25%	0.25g

Solución de desteñido

1 litro	
Metanol	450 ml
Agua destilada	450 ml
Ácido acético	100 ml

Transferencia de Proteínas

Membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF)

Buffer de transferencia, ánodo y cátodo

10x Tris/CAPS buffer (60 mM Tris y 40 mM CAPS) Bio Rad 161-0778

Buffer Ánodo

1 litro	
10x Tris/CAPS buffer	100 ml
Metanol 15%	150 ml
Agua nanopura	750 ml

Buffer Cátodo

1 litro	
10x Tris/CAPS buffer	100 ml
SDS 10%	10 ml
Agua nanopura	890 ml

Remojar membranas de PVDF

15 segundos en metanol
2 minutos en agua destilada
30 minutos en buffer cátodo

Remojar geles

15 minutos en buffer cátodo

Remojar papel filtro
15 minutos en su respectivo buffer
uno en buffer cátodo y uno en buffer ánodo

Transferir las proteínas a la membrana. Método de transferencia semiseco
Trans-Blot SD-Dry (Bio Rad 170-3940)
Durante 20 minutos a 0.4 amperes

Detección de Proteínas

Bloquear las membranas en leche (svelty) al 10% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación vigorosa
Diluir el anticuerpo primario en leche al 1% en TBST
Incubar toda la noche a 4°C con agitación, en una pequeña bolsa de plástico sellada.
Se puede reciclar el anticuerpo si es necesario
Lavar en TBST la membrana 3 veces 10 minutos, 4 veces 15 minutos y 1 vez 30 minutos, con agitación vigorosa
Diluir el anticuerpo secundario (HRP-conjugado anti-ratón o anti-cabra) en leche 5% en TBST.
Incubar 1-2 horas con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente con agitación, en bolsa de plástico sellada
Lavar con TBST la membrana 3 veces 10 minutos, 4 veces 15 minutos y 1 vez 30 minutos con agitación vigorosa

Revelar con el kit ECL +plus de Amersham (RPN2132)
Mezclar 1000 ml de solución A y 25 µl de solución B
Ecurrir bien la membrana e incubar en el revelador durante 5 minutos
Exponerla a placa radiográfica

TBST 10x
1 litro
1 M Tris pH 9 100 ml
NaCl 87.6 g
Tween 20 10 ml

cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking

Patricia Meade,^{1,2} Robert S. Hoover,² Consuelo Plata,¹ Norma Vázquez,¹ Norma A. Bobadilla,¹ Gerardo Gamba,¹ and Steven C. Hebert²

¹Molecular 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; and ²Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University Medical School, New Haven, Connecticut 06520

Submitted 10 December 2002; accepted in final form 4 February 2003

Meade, Patricia, Robert S. Hoover, Consuelo Plata, Norma Vázquez, Norma A. Bobadilla, Gerardo Gamba, and Steven C. Hebert. cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1145-F1154, 2003. First published February 25, 2003; 10.1152/ajprenal.00421.2002. —The murine apical bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter gene (mBSC1) exhibits two spliced isoform products that differ at the COOH-terminal domain. A long COOH-terminal isoform (L-mBSC1) encodes the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter, and a short isoform (S-mBSC1) exerts a dominant-negative effect on L-mBSC1 cotransporter activity that is abrogated by cAMP. However, the mechanism of this dominant-negative effect was not clear. In this study, we used confocal microscopic analysis of an enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion construct (L-mBSC1-EGFP) expressed to characterize the surface expression of the L-mBSC1 isoform in *Xenopus laevis* oocytes. Fractional expression was also assessed in L-mBSC1-injected oocytes by measuring the bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake. Oocytes injected with L-mBSC1-EGFP displayed a distinct plasma membrane-associated fluorescence that colocalized with the fluorescent membrane dye FM 4-64. The fluorescence intensity in L-mBSC1-EGFP oocytes did not change after cAMP was added to the extracellular medium. In contrast, L-mBSC1-EGFP fluorescence intensity was reduced in a dose-dependent manner, with coexpression of S-mBSC1. The inhibitory effect of S-mBSC1 was abrogated by cAMP. Finally, the exocytosis inhibitor colchicine blocked the effect of cAMP on the L-mBSC1-EGFP/S-mBSC1-coexpressed oocytes. All changes in L-mBSC1 surface expression correlated with modification of bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake. Our data suggest that the dominant-negative effect of S-mBSC1 on L-mBSC1 transport function is due to the effects of the cotransporter on trafficking.

kidney; thick ascending limb; *Xenopus laevis*; oocytes; green fluorescent protein; NKCC2

channels, and basolateral Cl⁻ efflux by CLCNKB channels (38). Loss-of-function mutations in any of the genes encoding these transport proteins in the human TAL cause Bartter's syndrome (34–36), an autosomal recessive disease featuring hypokalemic metabolic alkalosis with hypercalciuria and low arterial blood pressure (23).

A fundamental mechanism for enhancing salt transport in the TAL is the generation of cAMP via activation of Gα-coupled receptors by hormones such as vasopressin, calcitonin, parathyroid hormone, glucagon, and catecholamine (13, 15, 16). The effects of these hormones are crucial to the normal functioning of the TAL in reabsorbing 10–15% of filtered NaCl, providing for normal diluting and concentrating power and regulating divalent mineral excretion. While vasopressin has been shown to directly activate the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in mouse TAL (25), the molecular mechanism of this activation is not known.

An emerging field of regulation of several membrane transporters, including the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter, appears to involve alternative splicing that generates isoforms with regulatory roles (9). In this regard, the murine renal specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter gene *SLC12A1*, known as *BSC1* or *NKCC2*, gives rise to six alternative spliced isoforms due to the combination of two independent splicing mechanisms (18, 27). One splicing event produces A, B, and F isoforms that vary in a portion of the predicted second transmembrane segment and the contiguous intracellular loop connecting transmembrane domain 2 with 3 (18). The other splicing mechanism is an alternative polyadenylation site that predicts two mBSC1 proteins that are identical at the NH₂-terminal and transmembrane domains, as well as the first 74 amino acid residues of the COOH-terminal domain (27). These isoforms differ in the sequence and length of the remaining COOH-terminal domain. The longer isoform, L-mBSC1 (previously known as mBSC1-9), contains 1,095 amino acid residues, with the last 383

SALT REABSORPTION IN THE THICK ASCENDING LIMB OF HENLE (TAL) involves NaCl entry across apical membranes by the apical bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (BSC1, NKCC2), apical recycling via ROMK K⁺

Address for reprint requests and other correspondence: S. C. Hebert, Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 70926, New Haven, CT 06520-8026. E-mail: steven.hebert@yale.edu.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

residues being unique. The shorter isoform, S-mBSC1 (previously known as mBSC1-4), consists of 770 amino acids residues, with the initial 74 amino acids of the COOH terminus being identical to that of L-mBSC1 but followed by a short, unique segment of 55 residues. The shorter COOH-terminal domain of S-mBSC1 predicts distinct consensus PKA and PKC phosphorylation sites. Because the two splicing events are independent of each other, the combination of both mechanisms results in the production of six different isoforms: three with a long COOH-terminal domain (L-mBSC1A, B, or F) and three with a short COOH-terminal domain (S-mBSC1A, B, or F). Both L-mBSC1 and S-mBSC1 are expressed in the apical membrane of the TAL (27).

Using heterologous expression in *Xenopus laevis* oocytes, we have previously shown that the L-mBSC1 isoform is a bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (32, 33), whereas the S-mBSC1 isoform is a hypotonicity-activated, K⁺-independent, bumetanide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter that is inhibited by cAMP (31). Under isotonic conditions, however, S-mBSC1 is not trafficked to the plasma membrane when expressed alone but exerts a dominant-negative effect on the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter function. This latter effect can be abrogated with PKA activation by cAMP (33). Thus S-mBSC1 and L-mBSC1 interaction could be critical for activation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter by hormones such as vasopressin. This type of interaction between alternatively spliced isoforms has been observed in several renal cotransporters, but the mechanisms are not known (9). Competition between intracellular vesicles or heterodimers containing different isoforms has been suggested as possible mechanisms of regulation, but this study has addressed this issue for membrane transporters.

In the present study, we investigated the mechanism of interaction between the long and short isoforms of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. To this end, we assessed the effects of the S-mBSC1 on the expression of the surface and functional expression of the L-mBSC1 isoform in *X. laevis* oocytes. Our results show that S-mBSC1 reduces the surface expression, and hence the activity, of the L-mBSC1 Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoform by a mechanism that involves PKA phosphorylation processes and the exocytosis machinery.

METHODS

***X. laevis* oocyte preparation and injection.** Adult female *X. laevis* frogs were purchased from Nasco (Fort Atkinson, MI). Frogs were maintained at the animal facility under constant control of room temperature and humidity at 16°C and 65%, respectively. Oocytes were harvested from tritanein (0.17%) ethanolic extracts for 7 h before use. Oocytes were kept in Ca²⁺-free ND-96 (in mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4) in the presence of 2 mg/ml of collagenase B. Oocytes were washed three times in regular ND-96 (in mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4), manually defolliculated, and incubated overnight at 16°C in incubation medium (ND-96 supplemented with 2.5 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin). Oocytes (6) were injected with 50 nl of water or

a solution containing L-mBSC1 cRNA at 0.5 µg cRNA/µl (25 ng cRNA/oocyte). In coinjection experiments, oocytes were injected with the same volume and amount of L-mBSC1 plus various amounts of S-mBSC1 cRNA. After injection, oocytes were incubated at 16°C during 4–5 days, and the medium was changed every day. Oocytes were incubated overnight in Cl⁻-free ND-96 (in mM) 96 sodium isothionate, 2 potassium gluconate, 1.8 calcium gluconate, 1.0 magnesium gluconate, 5 HEPES, and 2.5 sodium pyruvate as well as 5 mg/100 ml gentamicin, pH 7.4 (11) before ⁸⁶Rb⁺ uptake experiments were performed.

L-mBSC1 cDNA isoforms. The cDNA encoding the long and short COOH-terminal spliced isoforms of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter, L-mBSC1 and S-mBSC1, respectively, were inserted into the pSP6T vector (New England Biolabs, Beverly, MA) as described (27). For preparation of a cRNA template, each cDNA isoform was linearized at the 3'-end using XbaI restriction enzyme, and cRNA was in vitro transcribed, using the T7 RNA polymerase (MESSAGE kit (Ambion, Austin, TX)). Transcript integrity was confirmed on agarose gels, and concentration was determined by absorbance at 260 nm (DU 640, Beckman, Fullerton, CA) and by densitometry of the corresponding bands in agarose gels. cRNA was stored frozen in aliquots at -80°C until use.

Assessment of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter function. The function of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter was assessed by measuring tracer ⁸⁶Rb⁺ uptake (New England Nuclear) in groups of 10–15 oocytes. Four days after water or cRNA injection, uptake was measured with the following protocol: a 30-min incubation period in mild hypotonic (~160 mosmol/kgH₂O) K⁺- and Cl⁻-free medium (in mM) 68 sodium gluconate, 1.6 calcium gluconate, 1.0 magnesium gluconate, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4), with 1 ouabain; this was followed by a 60-min uptake period in a mild hypotonic (~160 mosmol/kgH₂O) uptake medium (in mM) 62 NaCl, 10 KCl, 8.8 calcium gluconate, 5 HEPES/Tris, pH 7.4), with ouabain and 2.0 µCi/ml of ⁸⁶Rb⁺. To study the effect of PKA activation on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter function, during the present study the ⁸⁶Rb⁺ uptake in groups of oocytes was analyzed in the absence of 10⁻⁶ M concentration of the cell membrane-permeable dibutyryl-cAMP (Roche, Mannheim, Germany) plus 10⁻⁶ M concentration of the phosphodiesterase inhibitor IBMX (Sigma, St. Louis, MO). Although the hypotonic conditions used in our experiments inhibit the endogenous Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter that is expressed in *X. laevis* oocytes (10), uptakes were also measured in water-injected oocytes that do not show any of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ water groups were subtracted from corresponding L-mBSC1 groups to assess total ⁸⁶Rb⁺ uptake due to L-mBSC1. Ouabain (Sigma) was added to prevent ⁸⁶Rb⁺ entry via Na⁺-K⁺-ATPase. Uptakes were performed at 32°C, and at the end of the uptake period oocytes were washed five times in ice-cold uptake solution without isotope to remove tracer in extracellular fluid. Oocytes were then dissolved in 10% SDS. Uptakes were determined for each oocyte by β-scintillation counting.

Assessment of mBSC1 expression in oocyte plasma membrane. Surface expression of the L-mBSC1 isoform in the oocyte plasma membrane was measured by fluorescence using an enhanced green fluorescent protein (EGFP)-mBSC1 fusion construct. To obtain the pSPORT1/S-mBSC1-EGFP construct, the fragment encoding the EGFP sequence was removed from pSPORT1/S-mBSC1 and ligated into pSPORT1-S-mBSC1. L-mBSC1-EGFP cRNA was in vitro transcribed and microinjected into *X. laevis* oocytes in a volume of 50 nl at 0.5 µg cRNA/µl (25 ng cRNA/oocyte). In

coincubation experiments, oocytes were injected with the same volume and amount of L-mBSC1-EGFP plus varying amounts of S-mBSC1 cRNA. After injection, oocytes were incubated at 4°C for 3 days. During this time, the incubation medium was changed every day. Individual oocytes were monitored for EGFP fluorescence (excitation = 488 nm; emission = 505 nm) using a confocal laser-scanning microscope LSM510 (×10 objective lens, excitation wavelength 488-nm line of a multiline argon ion laser; Carl Zeiss). Fluorescent emissions were passed through a 505-nm band-pass filter. Water and wet-type L-mBSC1-Ligase were used as controls. Background autofluorescence of water-injected oocytes was minimized by adjusting brightness and contrast settings at a constant pinhole size. These settings were then used to assess fluorescence of mBSC1-EGFP. To study the effect of PKA activation on the surface expression of L-mBSC1-EGFP, the fluorescence intensity was assessed in oocytes before and 30 min after exposure to dibutyryl-cAMP-IBMX. All confocal microscopic experiments were performed using conditions identical to those for the functional experiments (i.e., the same hypotonic solutions, incubation times, and drug concentrations).

For membrane colocalization, oocytes were bathed at 4°C with 2 μM FM 4-64 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-iodo-diethylamino) phenyl-hexatrienyl] pyridinium dibromide (Molecular Probes, Eugene, OR) – membrane marker. The low temperature was used to minimize endocytosis of FM 4-64 so as to ensure that fluorescence was primarily coming from dye localization in the plasma membrane. For determination of fluorescence secondary to FM 4-64 membrane labeling, the excitation was at 543 nm and the emissions were passed through a 560-nm band pass filter. To use this dye for colocalization experiments with EGFP-tagged membrane proteins, the fluorescence emission of FM 4-64 detected at ~670 nm becomes undetectable at wavelengths below 580 nm (data from Molecular Probes). We used in preliminary experiments that the fluorescence of FM 4-64 fluorescence becomes undetectable when measured at 565 nm, the emission wavelength for EGFP fluorescence. Fluorescence of both EGFP and FM 4-64 was quantified at equatorial focal sections of oocytes using SigmaScan Pro (Jandel Scientific, San Rafael, CA) image-analysis software.

Western blotting. Oocyte homogenates were obtained 4 days after preliminary experiments. S-mBSC1 and L-mBSC1-EGFP cRNAs. Groups of 30–50 oocytes were homogenized in 2 μl/oocyte of homogenization buffer (in mM) 250 sucrose, 0.5 EDTA, and 3 Tris/HCl, pH 6.9; plus protease inhibitors, centrifuged twice at 100 × g for 10 min at 4°C, and the supernatant was recollected. Oocyte protein (6 oocytes/lane, 12 μl) was heated in sample buffer containing 6% SDS, 15% glycerol, 0.3% bromophenol blue, 150 mM Tris, pH 7.6, and 5% mercaptoethanol, resolved on 10% SDS-PAGE (7.5% T, 3.7% S) and transferred in 10 × Tris/CAPS to a polyvinylidene difluoride membrane by semidry electroblotting. Prestained molecular mass markers were used (Bio-Lab in Hercules, VA).

For immunodetection, resolved and blotted antibody against GFP diluted 1:1,000 (Clontech, Palo Alto, CA). The membrane was blocked for 1 h in 10% milk (10 mM Tris, pH 9, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100). TBS-T, 0.05% Tween-20, anti-GFP antibody diluted in 1% BSA powder/TBS-T overnight at 4°C. After a washing in TBS-T, the membrane was exposed to horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, Westborough, Heights, IL) for 1 h at room temperature. After a washing in TBS-T, antigen-antibody complexes were detected by autoradiography-enhanced chemiluminescence (ECL Plus Western blot analysis system, Amersham Life Science).

Statistical analysis. The significance of the differences between groups was tested by one-way ANOVA with multiple comparisons using Bonferroni correction. The significance between the two groups was analyzed using the paired *t*-test. The results are presented as means ± SE.

RESULTS

Surface expression of L-mBSC1-EGFP protein in *X. laevis* oocytes. *X. laevis* oocytes injected with L-mBSC1-EGFP cRNA exhibited a ring of fluorescence at their surfaces, as determined by confocal fluorescence microscopy (Fig. 1*b*). Control oocytes injected with water showed no significant fluorescence at the emission and excitation wavelengths for EGFP (Fig. 1*a*). To determine the specificity of L-mBSC1-EGFP-specific fluorescence was mainly at the oocyte plasma membrane, we loaded oocytes with FM 4-64 under conditions that would suppress endocytosis of the dye, i.e., 4°C (22). FM 4-64 is a lipophilic fluorophore that has been used to measure surface expression of other membrane transporters (19, 20), including the rat thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter in *X. laevis* oocytes (17), because it possesses the optimal properties for a fluorescent membrane marker. Figure 1*c* shows FM 4-64 fluorescence at 4°C obtained in the same L-mBSC1-EGFP-injected oocyte shown in Fig. 1*b*. The red FM 4-64-specific fluorescence was detected in a surface ring pattern similar to that for L-mBSC1-EGFP-specific fluorescence (Fig. 1*b*). As shown in Fig. 1*d*, the superposition of the two images (Fig. 1, *b* and *c*) gives a yellow signal, indicating colocalization of FM 4-64 and L-mBSC1-EGFP protein. We observed >99% surface colocalization of L-mBSC1-EGFP and FM 4-64 fluorescence in all tested oocytes, suggesting that the L-mBSC1-EGFP fluorescence was primarily at the plasma membrane in oocytes as indicative of expression on plasma membrane.

To further exclude the possibility that we were detecting primarily EGFP fluorescence in vesicles below the plasma membrane, we also examined fluorescence from an EGFP-labeled protein that we had previously shown to be exclusively expressed just below the plasma membrane. S-mBSC1 protein does not reach the plasma membrane but remains in what appears to be a submembrane pool of vesicles in *X. laevis* oocytes incubated under isotonic conditions (31). S-mBSC1-EGFP-injected oocytes exhibited no EGFP surface fluorescence (Fig. 1*e*). The absence of surface fluorescence in the S-mBSC1-EGFP-injected oocytes was not due to the lack of protein expression because S-mBSC1-EGFP protein was detected by Western blot analysis using anti-GFP monoclonal antibody (Fig. 1*f*). In addition, S-mBSC1-EGFP protein retained the ability to interact with L-mBSC1 (see below).

To further demonstrate that L-mBSC1-EGFP fluorescence represents cotransporter expression in oocyte plasma membranes, we assessed the correlation between L-mBSC1-EGFP surface expression and L-mBSC1 functional expression (Fig. 2). Activity of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter assessed by measuring ⁸⁶Rb⁺ uptake increased as a function of the amount of

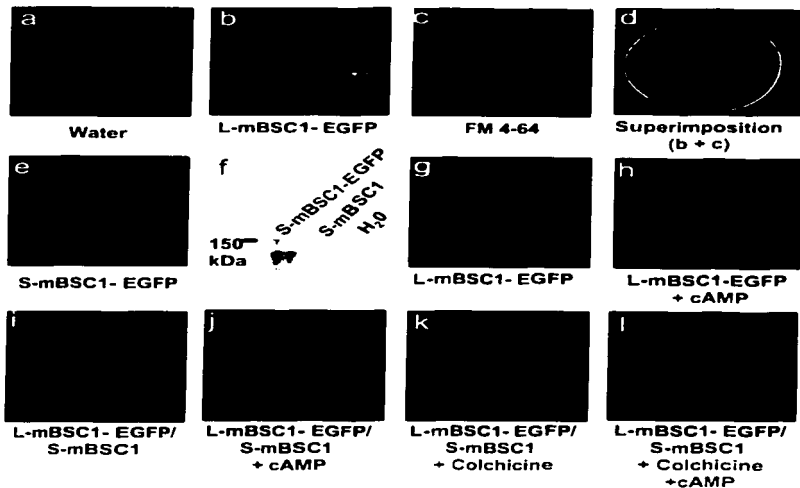


Fig. 1. *Top*: representative confocal images of *X. laevis* oocytes injected with water (*a*) or 25 ng of long COOH-terminal isoform of mouse apical bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter gene (mBSC1)-enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion construct (L-mBSC1-EGFP) (*b*) or without the FM 4-64 fluorescence dye (*c, d*). *Superimposition* (*b* and *c*). *Middle*: confocal images of oocytes injected with 25 ng of short COOH-terminal isoform of mBSC1-EGFP fusion construct (S-mBSC1-EGFP) (*e*) or with L-mBSC1-EGFP before (*f*) and after exposure to dibutyryl-cAMP + IBMX (*g, h*). *f*: Western blot using anti-EGFP monoclonal antibody of proteins obtained from 6 oocytes injected with S-mBSC1-EGFP cRNA, S-mBSC1 cRNA, or water. *Bottom*: representative images of oocytes injected with 25 ng L-mBSC1-EGFP plus 25 ng of S-mBSC1 cRNA before (*i*) and after exposure to dibutyryl-cAMP + IBMX (*j*) and (*k*) or colchicine (*l*) as indicated.

cRNA injected in oocytes, reaching a plateau at ~ 20 ng/oocyte. The surface expression of L-mBSC1-EGFP protein increased similarly as a function of the amount of cRNA injected. All of these results when taken together indicate that the surface EGFP fluorescence detected in our L-mBSC1-EGFP-injected oocytes was predominantly coming from cotransporter expression in plasma membranes.

Absence of cAMP in *X. laevis* oocytes and surface expression of L-mBSC1 in *X. laevis* oocytes. We have shown previously (33) that microinjection of *X. laevis* oocytes with L-mBSC1 cRNA results in a significant increase in $^{22}\text{Na}^+$ uptake that is not affected by PKA activation. Because $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter in native TAL cells is enhanced by cAMP and PKA (25), this previous

experiment suggested that some factor or protein was missing in L-mBSC1-injected oocytes that would allow the activation of this cotransporter by cAMP. To determine the effect of dibutyryl-cAMP + IBMX on the surface expression of the mouse $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter in *X. laevis* oocytes, we analyzed 20 oocytes injected with L-mBSC1-EGFP cRNA before and 30 min after addition of dibutyryl-cAMP + IBMX. As shown in Fig. 2*a*, no change in fluorescence intensity was observed after PKA activation. Oocytes exhibited a mean of 37.5 ± 3.1 arbitrary units (AU) before and 35.8 ± 5.8 AU after addition of dibutyryl-cAMP + IBMX. A representative example of the fluorescence observed in a single L-mBSC1-EGFP cRNA-injected oocyte before and after addition of dibutyryl-cAMP + IBMX is shown

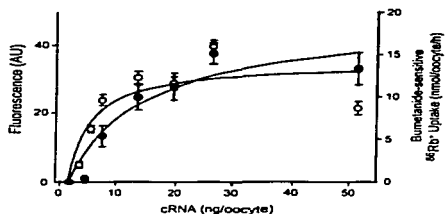


Fig. 2. Correlation between the dose dependency of L-mBSC1-EGFP surface expression, assessed by laser-scanning confocal microscopy (○), and the dose dependency of ⁸⁶Rb⁺ uptake by L-mBSC1 (●) in *Xenopus laevis* oocytes. Each point represents the mean ± SE of 20 oocytes. AU, arbitrary units.

in Fig. 1, *g* and *h*, respectively. Note that fluorescence intensity is similar in both pictures. Similarly, dibutyryl-cAMP + IBMX failed to increase bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake in L-mBSC1-injected oocytes [15.5 ± 0.7 vs. 17.4 ± 1.4 nmol·oocyte⁻¹·h⁻¹, respectively, *P* = not significant (NS)], consistent with our previous results (32). Thus the plasma membrane and functional expression of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter induced by heterologous expression of the L-mBSC1 isoform were not affected by PKA activation with dibutyryl-cAMP + IBMX.

Coexpression of the long and short BSC1 isoform and regulation by cAMP. In native TAL cells, L-mBSC1 and S-mBSC1 isoforms are coexpressed in the apical

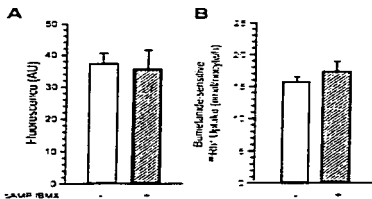


Fig. 3. Effect of dibutyryl-cAMP and IBMX on the function and surface expression of L-mBSC1 or L-mBSC1-EGFP in groups of *X. laevis* oocytes analyzed in the absence (open bars) or presence (filled bars) of 1 mM cAMP + 1 μM IBMX. *A*: laser-scanning confocal microscopy of 50 oocytes from 5 different frogs injected with L-mBSC1-EGFP cRNA before and 10 min after dibutyryl-cAMP + IBMX coapplication. Representative images are shown in Fig. 1, *g* and *h*. *B*: bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake in 2 groups of oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1 cRNA. Bumetanide was added to the preincubation and uptake medium at 10⁻⁶ M. Each bar represents the mean ± SE of ~100 oocytes from 5 different frogs.

membrane (27). We have also previously shown that S-mBSC1 exerts a dominant-negative-like effect on the bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport activity of L-mBSC1 expressed in oocytes and that the inhibitory effect of S-mBSC1 was largely reversed by addition of cAMP + IBMX (33). Given that S-mBSC1 is exclusively expressed in a submembranal pool when expressed alone (31), we hypothesized that the dominant-negative effect of S-mBSC1 on L-mBSC1 function may involve modulation in trafficking of L-mBSC1 to or from the plasma membrane.

To begin to assess the mechanism by which S-mBSC1 regulates L-mBSC1 in a cAMP-dependent manner, we examined the effects of the S-mBSC1 isoform on the surface expression of the L-mBSC1 isoform. Thus we assessed the fluorescence intensity in oocytes injected with L-mBSC1-EGFP cRNA alone or surface with S-mBSC1 cRNA. We also measured ⁸⁶Rb⁺ uptake in the same batch of *X. laevis* oocytes injected with L-mBSC1 cRNA alone or together with S-mBSC1 cRNA. As shown in Fig. 4*A*, the fluorescence intensity of oocytes injected with L-mBSC1-EGFP alone was significantly higher (73.9 ± 5.3 AU) than intensity observed in oocytes coinjected with L-mBSC1-EGFP and S-mBSC1 (42.9 ± 3.5 AU, *P* < 0.001). A representative example showing the confocal images from a L-mBSC1-EGFP oocyte and L-mBSC1-EGFP + S-mBSC1 oocyte is presented in Fig. 1, *g* and *i*, respectively. Consistent with the reduced surface expression of L-mBSC1-EGFP induced by S-mBSC1 (Fig. 4), functional analysis confirmed a significant reduction in bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake in L-mBSC1-S-mBSC1-injected oocytes (7.76 ± 0.5 nmol·oocyte⁻¹·h⁻¹)

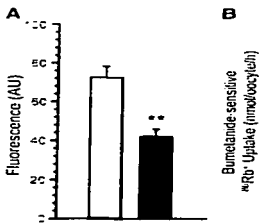


Fig. 4. Reduction of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter surface and functional expression induced by S-mBSC1 cRNA in *X. laevis* oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1-EGFP cRNA alone (open bars) or together with 25 ng of S-mBSC1 cRNA (filled bars). *A*: laser-scanning confocal microscopy fluorescence intensity. Representative images are depicted in Fig. 1, *g* and *i*. **P* < 0.001 vs. L-mBSC1-EGFP-injected group. *B*: bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake in nmol·oocyte⁻¹·h⁻¹. Bumetanide was added to the preincubation and uptake medium at 10⁻⁶ M concentration. Each bar depicts the mean ± SE of 100 oocytes from 5 different frogs. **P* < 0.001 vs. L-mBSC1.

compared with values obtained in L-mBSC1 oocytes (15.8 ± 0.7 nmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, $P < 0.001$). The reduction in surface expression of L-mBSC1-EGFP and in L-mBSC1 bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ transport showed similar relationships to the amount of coinjected S-mBSC1. As shown in Fig. 5A, when oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1-EGFP cRNA were additionally injected with increasing concentrations of S-mBSC1 cRNA, from 6 to 50 ng/oocyte, a significant dose-dependent decrease in fluorescence intensity was observed. We observed a dose-dependent inhibition of ⁸⁶Rb⁺ uptake within the same range of S-mBSC1 coinjections (Fig. 5B). Thus the lower the L-mBSC1.1-to-S-mBSC1 ratio, the lower the surface expression and activity of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter.

Given the reduction in Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter surface expression and function induced by S-mBSC1 isoform in *X. laevis* oocytes, we measured the effect of dibutyryl-cAMP+IBMX on the fluorescence intensity and ⁸⁶Rb⁺ uptake in coinjected oocytes. As shown in Fig. 6A, the reduction in the surface expression of L-mBSC1-EGFP in S-mBSC1 coinjected oocytes was partially reversed by the addition of dibutyryl-cAMP+IBMX (30.3 ± 4.8 vs. 49 ± 7.1 AU with dibutyryl-cAMP+IBMX, $P < 0.001$). A representative example of an oocyte coinjected with L-mBSC1-EGFP and S-mBSC1 isoforms before and 30 min after exposure to dibutyryl-cAMP+IBMX is shown in Fig. 1, i and j, respectively. A clear increase in fluorescence intensity is observed in Fig. 1j compared with Fig. 1i. As depicted in Fig. 6B, similar results were obtained when functional expression was assessed (7.76 \pm 0.5 in the absence vs. 10.9 ± 0.7 nmol-oocyte⁻¹·h⁻¹ in the presence of dibutyryl-cAMP+IBMX, $P < 0.001$). In addition, Fig. 6C shows that the S-mBSC1-EGFP construct is also able to reduce the function of L-mBSC1 and that this reduction can also be abrogated by dibutyryl-cAMP+IBMX. Thus in *X. laevis* oocytes, the surface expression, and hence the function, of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter can be modulated by dibutyryl-cAMP only when L-mBSC1 and S-mBSC1 isoforms are coexpressed but not when the L-mBSC1 isoform is

expressed alone (Fig. 3). Furthermore, similar ⁸⁶Rb⁺ responses to dibutyryl-cAMP+IBMX are observed whether the EGFP reporter is on S-mBSC1 or L-mBSC1. Moreover, experiments were performed in which L-mBSC1 and S-mBSC1-EGFP were coinjected and EGFP fluorescence intensity was assessed in the absence and presence of cAMP. No S-mBSC1-EGFP fluorescence was detected 30 min after cAMP (H₂O) injected 0.18 ± 0.1 AU ($n = 10$); L-mBSC1+S-mBSC1 coinjected, 0.28 ± 0.06 AU ($n = 18$); cAMP, $n = 19$; and 0.23 ± 0.04 AU ($n = 19$); $P = NS$ compared with H₂O injected], suggesting that S-mBSC1 may be rapidly removed from the membrane after coinjection with L-mBSC1 after cAMP.

The results in Fig. 6 suggest that the mechanism by which the S-mBSC1 isoform reduces the function of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter includes a reduction in the surface expression of L-mBSC1, which is partially abrogated after PKA activation with dibutyryl-cAMP+IBMX. The modulation of L-mBSC1 surface expression could result from alterations in trafficking to (exocytosis) or from (endocytosis) the plasma membrane. To study this possible mechanism, we assessed the effects of colchicine, an inhibitor of microtubules (26), on the surface and functional expression of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in oocytes coinjected with L-mBSC1-EGFP or L-mBSC1 cRNA, together with S-mBSC1 cRNA. As shown in Fig. 7A, the fluorescence intensity in L-mBSC1-EGFP+S-mBSC1-coinjected oocytes was lower than oocytes alone and the dibutyryl-cAMP+IBMX increment was prevented by prior exposure to colchicine. Colchicine alone had no effect on the fluorescence intensity either in the L-mBSC1-EGFP-injected group (data not shown) or in the L-mBSC1-EGFP+S-mBSC1-coinjected group. Representative images of an oocyte exposed to colchicine alone or to colchicine and dibutyryl-cAMP+IBMX are shown in Fig. 1, k and l, respectively. No change in fluorescence intensity is observed. Similar results were observed when ⁸⁶Rb⁺ uptake was assessed. The ⁸⁶Rb⁺ uptake observed in L-mBSC1+S-mBSC1-injected oocytes (6.2 ± 0.6 nmol-oocyte⁻¹·h⁻¹) was not affected in the

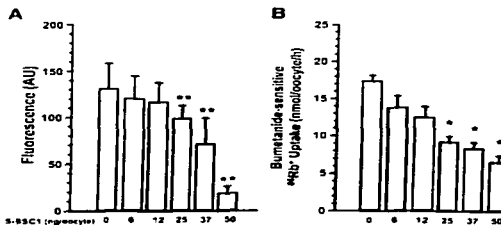


Fig. 5. Effect of increasing concentrations of S-mBSC1 cRNA on surface expression of L-mBSC1-EGFP and functional expression of L-mBSC1 in *X. laevis* oocytes. **A:** Fluorescence intensity in oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1-EGFP cRNA alone or together with increasing amounts of S-mBSC1 cRNA as indicated. **** $P < 0.001$ vs. L-mBSC1-EGFP-injected group.** **B:** Bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake was assessed in groups of oocytes that were injected with 25 ng of L-mBSC1 cRNA alone or together with increasing amounts of S-mBSC1 cRNA as stated. Bumetanide was added to the preincubation and uptake mediums at 10^{-4} M concentration. Each bar depicts the mean \pm SE of 50 oocytes from 3 different frogs. *** $P < 0.001$ vs. L-mBSC1.**

presence of colchicine ($5.9 \pm 0.8 \text{ nmol}/\text{oocyte}^{-1}\text{h}^{-1}$) or by dibutyryl-cAMP-IBMX in the presence of colchicine ($6.3 \pm 0.8 \text{ nmol}/\text{oocyte}^{-1}\text{h}^{-1}$), suggesting that blocking the exocytosis mechanisms with colchicine prevents the L-mBSC1 response to dibutyryl-cAMP-IBMX (Fig. 7B).

DISCUSSION

The present work describes the effect of the COOH-terminal truncated, alternatively spliced isoform of the murine *SLC12A1* gene S-mBSC1 on the surface and functional expression of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (L-mBSC1). Using the *X. laevis* oocyte's heterologous expression system, we show by confocal laser

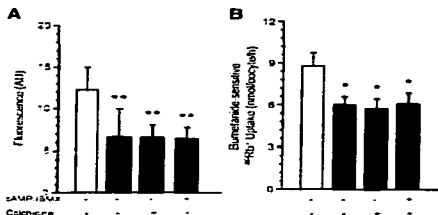
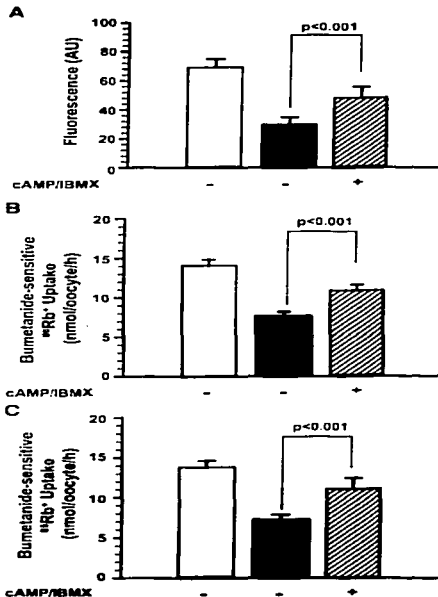


Fig. 7. Colchicine prevents the effect of the dibutyryl-cAMP and IBMX on surface expression and transport. L-mBSC1 and S-mBSC1 cotransporter oocytes. **A**: fluorescence intensity in oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1-EGFP cRNA alone (open bar) or together with 25 ng of S-mBSC1 (filled bars) with or without colchicine and dibutyryl-cAMP-IBMX as indicated. The filled bars depict the fluorescence intensity in the same group of oocytes before and 30 min after exposure to colchicine and 30 min after exposure to colchicine and dibutyryl-cAMP-IBMX. Representative images are shown in Fig. 1, k and l . $^{**}P < 0.001$ vs. L-mBSC1-EGFP-injected group. **B**: bumetanide-sensitive $^3\text{Hb}^+$ uptake in oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1 cRNA alone (open bar) and together with 25 ng of S-mBSC1 cRNA (filled bars) with or without colchicine and/or dibutyryl-cAMP-IBMX as indicated. Colchicine was added to the preincubation medium at 20 μM , 15 min before the addition of cAMP-IBMX. Each bar represents the mean \pm SE of 25 oocytes from 3 different frogs. $^{*}P < 0.001$ vs. L-mBSC1.

image analysis that the S-mBSC1 isoform exerts a dominant-negative effect on the surface expression of the longer isoform L-mBSC1, which results in a reduction of the cotransporter activity (Figs. 1, 4, and 5). The dominant-negative effect on surface expression, and hence functional activity, was partially abrogated by PKA activation with dibutyryl-cAMP-IBMX (Fig. 6). Finally, we demonstrate that the effect of dibutyryl-cAMP-IBMX was prevented by the exocytosis inhibitor colchicine (Fig. 7).

Fig. 6. Effect of dibutyryl-cAMP and IBMX on S-mBSC1-induced reduction of surface expression and in S-mBSC1 or S-mBSC1-EGFP-induced reduction of functional expression of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter. **A**: fluorescence intensity in oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1-EGFP cRNA alone (open bar) or together with 25 ng of S-mBSC1 in the absence (filled bar) or presence (hatched bar) of 1 μM cAMP and 1 μM IBMX. The filled and hatched bars depict the fluorescence intensity in the same group of oocytes before and 30 min after exposure to dibutyryl-cAMP-IBMX. Representative images are shown in Fig. 1, k and l . **B**: bumetanide-sensitive $^3\text{Hb}^+$ uptake in oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1 cRNA alone (open bar) or together with 25 ng of S-mBSC1 cRNA in the absence (filled bar) and presence (hatched bar) of dibutyryl-cAMP-IBMX. **C**: bumetanide-sensitive $^3\text{Hb}^+$ uptake in oocytes injected with 25 ng of L-mBSC1 cRNA alone (open bar) and together with 25 ng of S-mBSC1 cRNA in the absence (filled bar) and presence (hatched bar) of dibutyryl-cAMP-IBMX. In both **B** and **C**, bumetanide, cAMP, and IBMX were added to the preincubation and uptake media at 10^{-6} , 10^{-5} , and 10^{-6} M concentration, respectively. Each bar represents the mean \pm SE of 40 oocytes from 3 different frogs.

It is well established that generation of cAMP by hormones, such as vasopressin, activates transepithelial salt transport in the murine TAL (1, 12, 15). However, the mechanism of this activation was unknown. We previously showed that PKA activation with cAMP did not enhance the uptake of $^{22}\text{Na}^+$ by L-mBSC1 expressed in *X. laevis* oocytes, suggesting that other factors/proteins not present in oocytes are required to reconstitute the observed cAMP activation of apical $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport in murine TAL (33). We had previously suggested that the critical additional protein required for cAMP-dependent modulation of the functional cotransporter isoform, L-mBSC1, was the short COOH-terminal mBSC1 splice variant. This was based on the following observations. First, both isoforms are expressed in the mouse TAL. The L-mBSC1 isoform was expressed almost equally in both medullary (MTAL) and cortical TAL (CTAL) segments, but expression of the S-mBSC1 isoform was highest in the MTAL and diminished significantly along the CTAL toward the cortical surface (27). This gradient of S-mBSC1 expression parallels the medullary-to-cortical magnitude of hormone-induced cAMP accumulation in the TAL and may account for the observation that vasopressin enhances salt reabsorption predominantly in MTAL rather than CTAL (14). In addition, we had also previously reported that the short COOH-terminal isoform, S-mBSC1, exerts a dominant-negative-like effect on ion transport by the L-mBSC1 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter (33). This was not due to competition for translation in S-mBSC1-L-mBSC1-cojected oocytes because unrelated cRNAs such as renin or the *Shaker K*⁺ channel did not significantly affect transport by L-mBSC1. Thus S-mBSC1 would reduce the functional expression of L-mBSC1 in native TAL cells. Importantly, we showed that cAMP reversed the negative effect of S-mBSC1 on L-mBSC1-mediated transport. The latter could provide a mechanism for cAMP-mediated activation of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport in native TAL cells.

There is precedence for a dominant-negative type of effect of alternatively spliced isoforms of several genes, including several renal cotransporters (9). For example, the $\text{Na}^+\text{-phosphate}$ cotransporter gene can express truncated isoforms with dominant-negative effects on the cotransporter function (37). One interesting example of dominant-negative regulation occurs in the human KvlQT1 K^+ channel that is associated with the congenital long QT syndrome. One of the two alternatively spliced KvlQT1 variants forms the functional K^+ channel. The other, a COOH-terminal truncated isoform, does not possess channel function but exerts a strong dominant-negative effect on channel function (4). It has been shown that transgenic mice overexpressing the truncated isoform develop several interesting cardiac arrhythmias (5) and that, in humans with the recessive form of the long QT syndrome (Jervell and Lange-Nielsen syndrome), mutations in the dominant-negative isoform correlate with the phenotype of the cardiac arrhythmia (24). The mecha-

nisms by which truncated isoforms produce their negative effects are still poorly understood.

The competition between intracellular vesicles containing different isoforms or formation of heterodimers between isoforms has been suggested as possible mechanisms. In the glucocorticoid receptor, the formation of nonfunctional heterodimers seems to be at least part of the mechanism by which the dominant-negative isoform reduces the function of the receptor (29). However, to our knowledge no study has addressed this issue in membrane transporter proteins.

The interaction between the long and short isoforms of mBSC1 could be due to competition between S-mBSC1 and L-mBSC1 containing vesicles. L-mBSC1 has been detected in subapical vesicles (29). Thus trafficking of L-mBSC1 vesicles to the apical membrane could play a role in cotransporter regulation. We observed no S-mBSC1-EGFP fluorescence in L-mBSC1+S-mBSC1-EGFP-cojected oocytes after cAMP treatment, suggesting that S-mBSC1-EGFP protein may be rapidly removed from the membrane after coinsertion with L-mBSC1. In addition, we have shown that S-mBSC1 antibody staining was predominantly in a subapical distribution in mouse kidney (27). Therefore, it is possible that the alternatively spliced S-mBSC1 isoform affects the interaction of the transporter proteins with the cytoskeleton (7) and/or the vesicular trafficking machinery. If so, then coassociation of S-mBSC1 and L-mBSC1 isoforms may result in "trapping" of the L-mBSC1 complex within subapical vesicles.

To begin to understand the interaction between the short and long isoforms of the murine $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter, we assessed the effect of the short mBSC1 isoform on the surface expression of an EGFP-tagged long mBSC1 isoform using the *X. laevis* heterologous expression system. Several lines of evidence suggest that the EGFP fluorescence observed in our present study quantified cotransporter localization in the oocyte membrane. First, EGFP has been used to assess surface expression of many membrane proteins expressed in oocytes (2, 3, 8, 21) as well as cultured cells (30). In oocytes, intracellular EGFP fluorescence is not detected with confocal microscopy because the laser does not penetrate deeply enough to visualize the intracellular EGFP pool at equatorial sections in these large cells. Even if there were some intracellular light penetration, the distribution of the EGFP signal in these large cells is so diffuse that it would likely fall below the level of detection (3). Second, we show in Fig. 1 that L-mBSC1-EGFP fluorescence is colocalized with the membrane marker FM 4-64 under conditions that would reduce FM 4-64 endocytosis and potential labeling of a subplasma membrane pool. Third, we show that the S-mBSC1-EGFP isoform, which under isotonic conditions remains in the submembrane compartment of the oocyte (31), was not detected by confocal analysis. Finally, we show in Fig. 2 a direct correlation between EGFP fluorescence and the magnitude of bumetanide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ uptake. When taken together, these results demonstrate that the L-mBSC1-EGFP fluorescence de-

ected in the present study was predominantly at theocyte plasma membrane. While our results in oocytes suggest one mechanism for regulation of BSC1 function by cAMP, verification of this mechanism in TAL cells would be informative; however, no one has been able to stably express BSC1 in a mammalian cell line.

Our results indicate that the S-BMSC1 isoform regulates cotransporter function by inhibiting L-BMSC1 trafficking to the plasma membrane. The following observations support this conclusion. The alternatively spliced S-BMSC1 isoform reduces, in a dose-dependent manner, both ⁸⁶Rb⁺ uptake by, and plasma membrane expression of, the L-BMSC1 Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. We also show that in the presence of the S-BMSC1 isoform, but not in its absence, the surface expression of L-BMSC1-EGFP is increased by PKA activation with dibutyryl-cAMP-IBMX. This increase in plasma membrane expression is also associated with an increase in ⁸⁶Rb⁺ uptake by the cotransporter. Finally, the dibutyryl-cAMP-IBMX-induced increase in surface and functional expression was blocked by colchicine, an inhibitor of the exocytosis machinery. Thus the presence of the S-BMSC1 isoform precludes the L-BMSC1 complex from migrating to the plasma membrane, and this inhibitory effect is abrogated by cAMP. To our knowledge, this is the first study to address the mechanisms of interaction between alternatively spliced isoforms of membrane cotransporters. Further studies will be required to determine whether S-BMSC1 and L-BMSC1 form heterodimers and the role of PKA phosphorylation processes on this interaction and the trafficking mechanism.

We are grateful to Dr. Jorge Sosa-Niagarajaro for help in using the laser-scanning confocal microscope and to members of the Physiology Unit for suggestions and assistance.

This work was supported by Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) Research Grant 976201 and 361249, Howard Hughes Medical Institute Grant 75197-353601 to G. Gamba, Robert Wood Johnson Grant 756845 to R. S. Hoover, and National Institutes of Health Grant DC-38003 to G. C. Hebert and G. Gamba. P. Meade was supported by scholarship grants from CONACYT and from the Dirección General del Personal Académico of the National University of the Mexico.

Present address of R. S. Hoover: Dept. of Medicine, The Univ. of Chicago, 5841 S. Maryland Ave., MC-5100, Chicago, IL 60637.

REFERENCES

- Bailly C. Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the proximal limb of Henle's loop. *Kidney Int* 53: Suppl 69: S-29-S-33, 1998.
- Chan KW, Sui JL, Vivudum N, and Logothetis DE. Specific regions of the Na⁺-K⁺-ATPase are involved in the regulation of protein-gated K⁺ channel activity. *J Biol Chem* 272: 6545-6555, 1997.
- Chappell R, Busco OF, Alvarez-Hernandez X, Robinson LC, and Leidenheimer NJ. Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 274: 2994-2999, 1999.
- Dumolombe S, Baró I, Féron V, Bliok J, Mohammad-Panah R, Pollard H, Morid S, Mannens M, Wilde A, Barhanin J, Charpentier F, and Escanade D. A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J Biol Chem* 273: 6637-6643, 1998.
- Dumolombe S, Charpentier F, Escanade D, Baró I, Guilhard G, Le Berre N, Corbier A, de Bakker J, Opthoff T, Wilde A, Moorman

- and Escanade D. Transgenic mice overexpressing human hKvLQT1 dominant-negative isoform. Part I: phenotypic characterization. *Cardiovasc Res* 50: 314-327, 2001.
- Dumolombe S, Escanade D, Baró I, Opthoff T, Wilde A, Moorman JC, and Logothetis DE. Dauding. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Morph* 136: 137-150, 1970.
- Greer MB, Wang ET, O'Brien RL, and Huggan RL. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci* 18: 720-730, 1998.
- Flagg TP, Tate M, Merot J, and Welling PA. A mutation linked with Bartter's syndrome locks Kir 1.1a (ROMK1) channel in the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 114: 685-700, 1999.
- Gamba G. Alternative splicing and diversity of renal transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F781-F794, 2001.
- Gamba G, Miyashita A, Cappelletti R, Baró I, Lee WS, Hediger MA, and Hebert SC. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian extracellular sodium-potassium-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 268: 17713-17722, 1993.
- Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyashita A, Lyton J, Hediger MA, Brenner BM, and Hebert SC. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2740-2753, 1993.
- Greger H. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci* 319: 324-330, 1999.
- Hebert SC and Andreoli TE. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 269: F743-F756, 1995.
- Hebert SC, Cuipepper RM, and Andreoli TE. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 241: F412-F431, 1991.
- Hebert SC, Cuipepper RM, and Andreoli TE. NaCl-F343 transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular cotransport: origin of transepithelial voltage. *Am J Physiol Renal Physiol* 269: F432-F442, 1995.
- Hebert SC, Cuipepper RM, and Andreoli TE. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. III. Modulation of ADH effect by peritubular osmolality. *Am J Physiol Renal Physiol* 269: F743-F756, 1995.
- Hoover RS, Poch E, Monroy A, Vazquez N, Nishio T, Gamba G, and Hebert SC. N-glycosylation at two sites critical for the binding and activity of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Am Soc Nephrol* 14: 271-282, 2003.
- Itanishi P, Vanden Heuvel GH, Payne JA, and Forbush B III. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F1007-F1015, 1999.
- Janecki AJ, Janecki M, Akhter S, and Donowitz M. Basic fibroblast growth factor stimulates surface expression and activity of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and results in its transmembrane phosphorylation. *J Biol Chem* 275: 8133-8142, 2000.
- Janecki AJ, Janecki M, Akhter S, and Donowitz M. Quantitative analysis of membrane and cytosolic isoforms of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and green fluorescence protein (GFP) in living PS120 fibroblasts. *J Histochem Cytochem* 48: 1479-1492, 2000.
- Ji HL, Chalfant ML, Jovov B, Lockhart JP, Parker SB, Fuller GM, Stanton BA, and Benos DJ. The cytosolic termini of the gamma and delta NHE3 subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 275: 27564-27569, 2000.
- Kuismanen E and Saraste J. Low temperature-induced transport blocks as tools to manipulate membrane traffic. *Methods Mol Biol* 192: 21-27, 1999.
- Kurts I. Molecular pathogenesis of Bartter's and Gitelman's syndromes. *Nephrol Int* 54: 1396-1410, 1998.

REGULATION OF APICAL Na⁺-K⁺-2Cl⁻ COTRANSPORTER

24. Mohammad-Panah R, Demolombe S, Neyroud N, Gulcheney P, Kyndt F, van den HM, Baro I, and Escande D. Mutations in a dominant-negative isoform correlate with phenotype in inherited cardiac arrhythmias. *Am J Hum Genet* 64: 1018-1023, 1999.
25. Malony DA, Reeves WB, Hebert SC, and Andreoli TE. ADH increases apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F177-F187, 1997.
26. Moral Z, Dong K, Wei Y, Sterling H, Deng H, Ali S, Gu R, Huang XY, Hebert SC, Giebisch G, and Wang WH. Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 276: 7156-7163, 2001.
27. Mount DB, Baekgaard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DL, Gamba G, and Hebert SC. Isoforms of the Na-K-2Cl transporter in murine TAL. I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F347-F358, 1999.
28. Nielsen S, Maunbach AB, Ecelbarger CA, and Knepper MA. Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F885-F893, 1998.
29. Oakley RH, Jewell CM, Yuda MK, Bofenhardt DM, and Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274: 27857-27866, 1999.
30. Petrecca K, Atanasiu R, Akhavan A, and Shrier A. N-linked glycosylation sites determine HENK channel surface membrane expression. *J Physiol* 515: 41-48, 1999.
31. Plata C, Meade P, Hall AE, Welch RC, Vazquez N, Hebert SC, and Gamba G. Alternatively spliced isoform of the apical Na-K-Cl cotransporter gene encodes a furosemide sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F574-F582, 2001.
32. Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, and Gamba G. Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms. *J Biol Chem* 277: 11004-11012, 2002.
33. Plata C, Mount DB, Rubio V, Hebert SC, and Gamba G. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL. II. Functional characterization and activation by cAMP. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F359-F366, 1999.
34. Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams N, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pili D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, and Lifton RP. Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genet* 17: 171-178, 1997.
35. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, Di Pietro A, Sanjad SA, and Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalcaemia, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genet* 13: 183-188, 1996.
36. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, and Lifton RP. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, *ROMK*. *Nature Genet* 14: 152-156, 1996.
37. Tatsuji S, Miyamoto K, Kouda T, Motoyaga K, Katal K, Ohkido I, Morita K, Segawa H, Fuzii Y, Yamamoto H, Taketani Y, and Takeda E. Identification of three isoforms for the Na⁺-dependent phosphate cotransporter (Nalp-2) in rat kidney. *J Biol Chem* 273: 28568-28575, 1998.
38. Winters CJ, Reeves WB, and Andreoli TE. A survey of transport properties of the thick ascending limb. *Semin Nephrol* 11: 236-247, 1991.

Alternatively spliced isoform of apical Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter

CONSUELO PLATA,¹ PATRICIA MEADE,¹ AMY HALL,² RICK C. WELCH,³ NORMA VÁZQUEZ,¹ STEVEN C. HEBERT,¹ AND GERARDO GAMBÁ¹

¹Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City CP 14000, Mexico; ²Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University Medical School, New Haven, Connecticut 06520; and ³Division of Nephrology, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee 37232

Received 3 June 2000; accepted in final form 17 November 2000

Plata, Consuelo, Patricia Meade, Amy Hall, Rick C. Welch, Norma Vázquez, Steven C. Hebert, and Gerardo Gamba. Alternatively spliced isoform of apical Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F574–F582, 2001. — In the absence of vasopressin, medullary thick ascending limb cells express a K⁺-independent, furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter that is inhibited by hypertonicity. The murine renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter gene *SLC12A1* gives rise to six alternatively spliced isoforms. Three feature a long COOH-terminal domain that encodes the bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (BSC1-9NKCC2), and three with a short COOH-terminal domain, known as mBSC1-A4, B4, or F4 (19). Here we have determined the functional characteristics of mBSC1-A4, as expressed in *Xenopus laevis* oocytes. When incubated at normal osmotic osmolarity (~200 mosmol/kgH₂O), mBSC1-A4-injected oocytes do not express significant Na⁺ uptake over H₂O-injected controls, and immunohistochemical analysis shows that the majority of mBSC1-A4 protein is in theocyte cytoplasm and not at the plasma membrane. In contrast, when mBSC1-A4 oocytes are exposed to hypotonicity (~100 mosmol/kgH₂O), a significant increase in Na⁺ uptake but not in ⁸⁶Rb uptake is observed. The increased Na⁺ uptake is dependent on furosemide sensitivity, and cAMP sensitive but K⁺ independent. Sodium uptake increases with decreasing osmolarity between 120 and 70 mosmol/kgH₂O ($r = 0.95$, $P < 0.01$). Immunohistochemical analysis shows that in hypotonic conditions mBSC1-A4 protein is expressed in the plasma membrane. These studies indicate that the mBSC1-A4 isoform of the *SLC12A1* gene encodes a hypotonically activated, cAMP- and furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter. Thus it is possible that alternative splicing of the BSC1 gene could provide the molecular mechanism enabling the Na⁺-Cl⁻-to-Na⁺-K⁺-2Cl⁻ switching in thick ascending limb cells.

bumetanide; protein kinase A; adenosine 3',5'-cyclic monophosphate; thick ascending limb of Henle

INCREASING NET NaCl REABSORPTION in the thick ascending limb of Henle (TAL) by hormones such as vasopressin, which generate cAMP via their respective G_s-coupled receptors, is a fundamental mechanism for regulating salt transport in this nephron segment (13, 15, 16). The effects of these hormones are crucial to the normal functioning of the TAL in reabsorbing 10–15% of filtered NaCl, providing for normal diluting and concentrating power, and regulating divalent mineral excretion.

Vasopressin increases transepithelial reabsorption in the TAL by activating both Na⁺, K⁺, and Cl⁻ uptake and K⁺ recycling through stimulation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter and apical K⁺ conductance (14). This coupling of NaCl with K⁺ during ion reabsorption has very important implications for the cellular physiology of the TAL, because K⁺ recycling is largely responsible for the generation of the positive luminal potential difference that drives paracellular cation transport. Vasopressin appears to directly activate the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in mouse TAL by a mechanism that is not completely understood but that includes switching of the K⁺ dependence of Na⁺ cotransport in the apical membrane. In the absence of vasopressin, furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransport was observed in the mouse TAL, whereas in the presence of hormone, furosemide-sensitive Na⁺ transport became K⁺ dependent (23). Thus vasopressin can switch cotransport in mouse TAL from a completely K⁺-independent, but nevertheless loop diuretic-sensitive Na⁺-Cl⁻ mode to a K⁺-dependent Na⁺-K⁺-2Cl⁻ mode (23). Evidence for switching between K⁺-independent and K⁺-dependent Na⁺-Cl⁻ cotransporters in TAL had been previously observed by Eveloff and Calamita (5) in rabbit mTAL cells. They showed that extracellular osmolarity alters the K⁺ dependency of Na⁺-Cl⁻ cotransport. In normal mammalian osmolar-

Address for reprint requests and other correspondence: G. Gamba, Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, Mexico City. E-mail: gamba@main.mail.concynt.mx.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ity (~300 mosmol/kgH₂O), the apical Na⁺ pathway is mainly Na⁺-Cl⁻ transport, whereas when the extracellular osmolarity is increased, the NaCl pathway exhibited the classic characteristics of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport. Both transport systems were sensitive to the loop diuretic furosemide (5). Taken together, these findings indicate that at the luminal side of the TAL the predominant Na⁺ cotransport system appears to be determined by hormonal stimuli and cell volume. Supporting the functional evidence that two different loop diuretic-sensitive cotransport systems are present in TAL, two binding sites with distinct affinities for the tracer loop diuretics [³H]bumetanide or [³H]piretanide have been identified in crude plasma membrane preparations from mouse (11) and dog (8, 9) kidney, respectively. Furthermore, photolabeling mouse kidney membranes with the photosensitive bumetanide analog [³H]4-benzoyl-5-sulfamoyl-3(3-thienyloxy)benzoic acid revealed that the high- and low-[³H]bumetanide binding sites exhibited incorporation of the label in two regions: one of ~150 kDa and another of ~75 kDa, respectively, suggesting that either the activation and inhibition of two distinct proteins or the dimerization of one polypeptide could account for the switching between Na⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport mode. The recent identification of several isoforms of the mouse renal specific bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter gene (*SLC12A1*) provides new insights into the mechanisms of salt transport regulation in TAL (19). A total of six alternatively spliced isoforms are encoded by *SLC12A1* gene. These isoforms are produced after the combination of two independent splicing events (19). One is the utilization of an alternative polyadenylation site that predicts two type I bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (BSC1) proteins identical in the entire N⁺-terminus and transmembrane domains, as well as in the first 74 amino acid residues of the COOH-terminal domain but different in the sequence and length of the remaining COOH terminus. The longer isoform (1,095 amino acids) contains 353 residues that are not present in the shorter isoform. In contrast, the shorter truncated isoform (770 amino acids) exhibits a COOH terminus with 55 residues that are not present in the longer isoform. Interestingly, the long and short COOH-terminal domains contain different putative protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) phosphorylation sites. We have designated the longer and shorter transcripts as mBSC1-9 and mBSC1-4, respectively (19). The other splicing event is due to the presence of three mutually exclusive variants of coding exon 4, denoted A, B, and F (17). The combination of both splicing mechanisms results in the production of three mBSC1-9 (mBSC1-9A/B/F9F) isoforms that encode the bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (21) and three mBSC1-4 (mBSC1-4A/B4/F4) proteins, with unknown function. Interestingly, however, interaction between mBSC1-9 and mBSC1-4 isoforms appears to be critical for vasopressin activation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter because mBSC1-4 exerts a dominant negative effect on the cotransporter function that

can be prevented by PKA activation (21). In the present paper we demonstrate that the mBSC1-9 isoform encodes a K⁺-independent furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter that is activated by hypotonicity and inhibited by PKA activation. Our results provide a molecular mechanism that accounts for switching between Na⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters in the mammalian TAL.

METHODS

Xenopus laevis oocyte preparation and injection. In the present study we used the *X. laevis* oocytes heterologous expression system. Oocytes were harvested from anesthetized (0.17% tricaine) frogs and incubated for 1 h under vigorous shaking at room temperature in a Ca²⁺-free ND-96 (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4) containing 2 mg/ml of collagenase B (Boehringer, Mannheim, Germany). Oocytes were washed three times in standard ND-96 (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4), manually defolliculated, and incubated overnight at 17°C in incubation medium (ND-96 supplemented with 2.5 mM Na⁺-pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin). Stage V-VI oocytes (4) to be used for controls were either noninjected or injected with a 1-mM Tris solution (50 nl), and experimental oocytes were injected with either mBSC1-A4 or mBSC1-F9 cRNA (25 ng/oocyte in 50 nl). After injection, oocytes were incubated at 17°C in incubation medium for ~5 days. During this period, incubation medium was changed daily.

mBSC1 cDNAs isoforms. The mBSC1 isoform cDNAs were in the pSPOT1 (Life Technologies) plasmid, and their generation has been described in detail (19). For preparation of cRNA templates, each isoform cDNA was linearized at the 3' end by using *Not* I or *Xba* I restriction enzymes, and cRNA was then transcribed in vitro by using the T7 RNA polymerase in the presence of Cap analog (mMESSAGE, Ambion, Austin, TX). Transcription product integrity was confirmed on agarose gels, and concentration was determined by absorbance reading at 260 nm (DL 640, Beckman, Fullerton, CA). cRNA was stored in aliquots at -80°C.

Functional characterization of mBSC1 isoforms. Functional characteristics of the mBSC1 isoforms were assessed by measuring ²²Na⁺ or ⁹⁶Rb⁺ uptake in groups of 20–25 oocytes under various osmolarities. ²²Na⁺ uptake was measured with the following protocol: a 30-min incubation period in a hypotonic and Cl⁻-free medium (in mM: 25 Na⁺-gluconate, 5 HEPES/Tris, pH 7.4, and 100 μM amiloride), followed by a 60-min uptake period in a hypotonic uptake medium (in mM: 25 NaCl, 10 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES/Tris, pH 7.4) containing 2.5 μCi/ml of ²²Na⁺ (NEN, Boston, MA) and the same drugs used during the incubation period. Various degrees of tonicity were studied by adding sucrose to the incubation and uptake media to obtain osmolarities between 70 to 150 mosmol/kgH₂O. The hypotonic conditions inhibit the endogenous oocyte Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (6). Ouabain was added to prevent Na⁺ uptake via Na⁺-K⁺-ATPase, and amiloride prevents Na⁺ uptake via Na⁺ channels or Cl⁻ cotransporters. To perform uptakes in isotonicity, we used an incubation medium containing 96 mM Na⁺-gluconate and regular ND-96 as the uptake medium. To determine the Na⁺- and Cl⁻-dependent fraction of ²²Na⁺ uptake, pooled groups of oocytes were incubated in uptake media without Cl⁻ (substituted by gluconate) or without K⁺ (substituted by N-methyl-D-glucan-

ENCODING OF FLUROSEMIDE-SENSITIVE Na-Cl COTRANSPORTER

mine) in the presence of the K⁺-Cl⁻ cotransporter inhibitor (dihydroinderyl) oxylalkanoic acid (DIOA; 100 μM) (7).

⁸⁶Rb⁺ uptake was also assessed under various degrees of hypotonicity with the following protocol: 30-min incubation period in a hypotonic K⁺-Cl⁻ free solution (5 mM, 4.0 Na⁺-gluconate, 4.6 Ca²⁺-gluconate, 1.0 Mg²⁺-gluconate, 10 Ba-sulfate, 5 Hepes/Tris, pH 7.4) with 1 μM ouabain, followed by a 60-min uptake period using a hypotonic uptake medium (mM): 4.0 NaCl, 2.0 KCl, 1.6 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 10 BaCl₂, 5.0 HEPES, pH 7.4) with 1 μM ouabain, and 2.0 μCi/ml of ⁸⁶Rb, specific activity 0.37 μCi/nmol (NEN). ²²Na⁺ and ⁸⁶Rb⁺ uptakes were performed at 30°C and were linear over the first 60 min. At the end of the uptake period, oocytes were washed five times in ice-cold uptake solution without isotopes to remove extracellular fluid tracer, after which oocytes were dissolved in 10% sodium dodecyl sulfate, and tracer activity was determined by β scintillation counting.

Immunohistochemical staining of oocytes. Unfused *X. laevis* oocytes injected with mBSC1-A4 cRNA were embedded in OCT (Tissue Tek, Miles, Elkhardt, IN) and slowly frozen at -54°C. Ten-micrometer sections were cut by using a Leica 3050 cryostat at -13°C. Sections were fixed for 3 min in -20°C acetone. The sections were washed three times (5 min) with PBS-T (0.05% Tween 20 in PBS, pH = 7.4) then blocked with 1% BSA-PBS-4% normal goat serum for 30 min at room temperature. Slides were incubated overnight at 4°C with 1:100 dilution of affinity-purified rabbit anti-mouse mBSC1-4 antibody (19) diluted in 1% BSA-PBS-4% normal goat serum. This antibody is directed against the 55 unique amino acid residues present in mBSC1-4 and not in mBSC1-9 isoforms. We have shown previously that this antibody recognized only mBSC1-4 protein (19). Sections were washed three times (5 min) with PBS-T, then incubated for 1 h with anti-rabbit Alexa 394 conjugate antibody (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted 1:5,000 in 1% BSA-PBS-4% normal goat serum. Sections were washed as above and mounted with Aquapolymount (Polysciences, Warrington, PA). Slides were examined with a Nikon Eclipse 800 research microscope.

Animals and materials. Adult female *X. laevis* frogs were purchased from Carolina Biological Supply (Burlington, NC) and from Nasco (Fort Atkinson, MI). Frogs were maintained at the animal facility under constant control of room temperature and humidity at 65%, respectively. Frogs were fed with brittle dry frog food from Nasco, and water was changed twice a week. Dibutylryl cAMP (DBcAMP), collagenase B, and all restriction enzymes were from Boehringer, H89 was from Calbiochem. The cRNA transcription kit mMESSAGE was from Ambion. Tracer sodium (²²Na⁺) and rubidium (⁸⁶Rb⁺) were purchased from DuPont-NEN. Ouabain, amiloride, bumetanide, IBMX, and general chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).

Statistical analysis. Statistical significance was defined as a two-tailed *P* < 0.05, and the results are presented as means ± SE. The significance of the differences between groups were tested by the one-way ANOVA, with multiple comparison by using the Bonferroni correction or by the Kruskal-Wallis ANOVA on ranks with the Dunn's method for the multiple-comparison procedure, as needed.

RESULTS

Expression of the mBSC1-A4 isoform in oocytes. We have previously shown that mBSC1-4 exhibits no functional activity assessed by either ²²Na⁺ or ⁸⁶Rb⁺ uptake for osmolarities between 210 and 150 mosmol/

kgH₂O (21). A similar observation is shown in the first four bars in Fig. 1. Na⁺ uptake in water or mBSC1-A4 cRNA-injected oocytes was similar under isotonic (200 mosmol/kgH₂O; 2,061 ± 176 vs. 2,391 ± 115 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, respectively) or in slight hypotonic (150 mosmol/kgH₂O; 236 ± 63 vs. 284 ± 48 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, respectively) conditions. The significant decrease in ²²Na⁺ uptake observed in solutions with osmolarities between 210 and 150 mosmol/kgH₂O in both water and mBSC1-A4-injected oocytes was due to inhibition of the endogenous Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. The last two bars in Fig. 1 show the exposing the mBSC1-A4 cRNA-injected oocytes to a further reduction in osmolarity to 100 mosmol/kgH₂O resulted in an increased ²²Na⁺ uptake in mBSC1-4-injected oocytes that was 48-fold higher than in water-injected oocytes (8,685 ± 737 vs. 181 ± 35 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, respectively, *P* < 0.0001). Figure 2 shows the effects of decreasing osmolarity from 150 and 70 mosmol/kgH₂O on ²²Na⁺ uptakes in mBSC1-A4 cRNA-injected oocytes. This mBSC1-A4 functional expression in oocytes is activated by hypotonicity in a dose-dependent fashion below osmolarities of 120 mosmol/kgH₂O.

Hypotonicity alters localization of mBSC1-A4 protein from the cytosol to the plasma membrane. Figure 3 shows the immunolocalization of mBSC1-A4 protein in representative oocytes incubated in either 150 (left) or 100 mosmol/kgH₂O (right) media. The incubation protocol was identical to that used for ²²Na⁺ uptake. In oocytes incubated in the 150 mosmol/kgH₂O medium, the majority of staining is localized to the oocyte cytoplasm just beneath the plasma membrane, whereas in oocytes exposed to the 100 mosmol/kgH₂O medium, most of the staining is localized in the plasma mem-

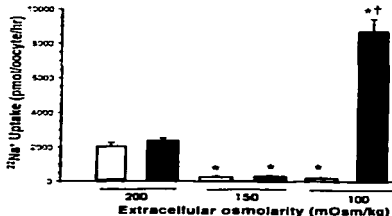


Fig. 1. Hypotonic-induced functional expression of mBSC1-A4 in *Xenopus laevis* oocytes. ²²Na⁺ uptake was measured in oocytes injected with water (open bars) or with 25 ng of mBSC1-A4 cRNA (filled bars) under 3 different extracellular osmolarities as indicated. NaCl concentrations in extracellular medium were 200 mM in 200 mosmol/kgH₂O, 62 mM in 150 mosmol/kgH₂O, and 40 mM for the 100 mosmol/kgH₂O solution. Each bar represents mean ± SE of 22 oocytes. Significantly different from uptake in the same group incubated at 200 mosmol/kgH₂O (*P* < 0.001). †Significantly different from all groups (*P* < 0.00001).

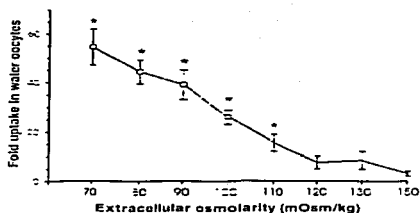


Fig. 2. Reductions in osmolarity below 120 mosmol/kgH₂O increase ²²Na⁺ uptake in mBSC1-A4-expressing oocytes in an inverse linear fashion. Each point represents mean ± SE of 20 oocytes.

brane. Thus in *X. laevis* oocytes hypertonicity alters the localization of mBSC1-A4 protein from the cytosol to the plasma membrane. This expression of mBSC1-A4 protein at the plasma membrane with 100 mosmol/kgH₂O hypertonicity is consistent with the change of mBSC1-A4 from a nonfunctional to a functional transporter as shown in Fig. 1.

mBSC1-A4 encodes the loop diuretic-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter. Figure 4, A and B, show ²²Na⁺ uptakes in mBSC1-A4 cRNA-injected oocytes in the absence or presence of 100 μM concentrations of furosemide (A) or bumetanide (B). The addition of either of the loop diuretics resulted in a 75–79% inhibition of the increased ²²Na⁺ uptake vs. water-injected controls in mBSC1-A4-expressing oocytes. Figure 5 compares the bumetanide concentration-dependent inhibition of ²²Na⁺ uptake induced by mBSC1-A4 or

mBSC1-F9 (21). Both mBSC-1 isoforms exhibited similar IC₅₀ values of ~10⁻⁶ M. Thus ²²Na⁺ uptake mediated by mBSC1-A4 is loop diuretic sensitive, and the difference in the COOH termini between mBSC1-A4 and mBSC1-F9 does not appear to alter this bumetanide sensitivity. Because thiazide diuretics inhibit the related Na⁺-Cl⁻ cotransporter TSC1 or NCC, we examined the effect of 100-μM trichloromethiazide on ²²Na⁺ uptake in mBSC1-A4 expressing oocytes. This thiazide had no effect on mBSC1-A4 function (data not shown).

Because K⁺-independent, bumetanide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransport has been described in mouse TAL 25, we assessed the ion dependency of ²²Na⁺ uptake in mBSC1-A4 cRNA-injected oocytes. Figure 6 shows that mBSC1-A4-expressing oocytes exhibited an increased ²²Na⁺ uptake over water-injected oocytes (3,570 ± 592 vs. 52 ± 10 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, respectively) that was not dependent on extracellular K⁺ (2,575 ± 438 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, P = not significant) but that was significantly reduced when Cl⁻ was omitted from the extracellular medium (1,297 ± 289 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, P < 0.0005) or when 100 μM bumetanide was added to the uptake medium (998 ± 293 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, P < 0.0002). The uptakes shown in Fig. 6 were performed in the presence of DIOA to inhibit any endogenous K⁺-Cl⁻ cotransport (20). Simultaneous experiments in oocytes showed that DIOA inhibits the endogenous K⁺-Cl⁻ cotransporter but has no effect on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity (data not shown). Thus mBSC1-A4 mediates ²²Na⁺ uptake that is Cl⁻ dependent and bumetanide sensitive but K⁺ independent. To further demonstrate the K⁺-independent nature of Na⁺ transport by mBSC1-A4 under hypotonic conditions, we assessed in the same experiment bumetanide-sensitive ²²Na⁺ and ⁸⁶Rb⁺ uptakes in 100 mosmol/kgH₂O media. As shown in Fig.

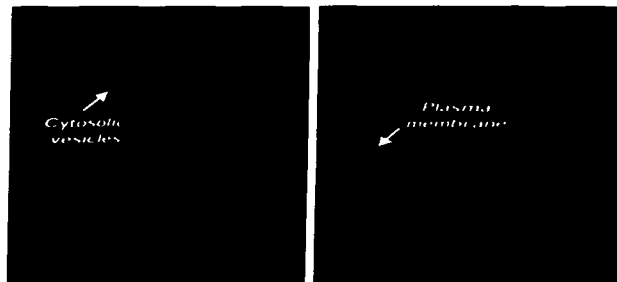
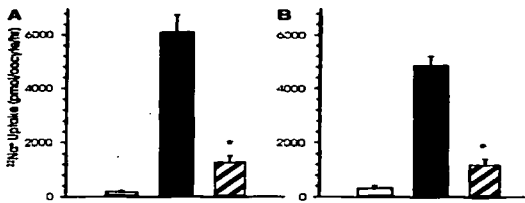


Fig. 3. Hypotonicity alters the localization of mBSC1-A4 in oocytes. mBSC1-A4 protein was localized in oocytes by using the rabbit anti-mouse polyclonal antibody directed against the unique 55-amino acid COOH-terminal domain of mBSC1-A4 described previously (19). Immunostaining was detected after incubation of oocytes in either 150 (left) or 100 mosmol/kgH₂O (right) media by using the same protocol described for ²²Na⁺ uptakes. In left panel, most of the staining is localized in the cytosol, whereas in right panel most staining is localized to the plasma membrane.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ENCODING OF FUROSEMIDE-SENSITIVE $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ COTRANSPORTER

Fig. 4. Effect of loop diuretics on $^{22}\text{Na}^+$ uptake in mBSC1-A4-injected oocytes exposed to 100 mosmol/kg H_2O hypotonicity. *A*: combined results of 3 experiments in which $^{22}\text{Na}^+$ uptake was assessed in oocytes injected with water (open bar), mBSC1-A4-injected oocytes (filled bar), and mBSC1-A4 oocytes in the presence of 100 μM furosemide (hatched bar). Each bar represents mean \pm SE of 95 oocytes, obtained from 3 different experiments. *B*: combined results of 9 experiments in which $^{22}\text{Na}^+$ uptake was assessed in oocytes injected with water (open bar), mBSC1-A4-injected oocytes (filled bar), and mBSC1-A4 oocytes in the presence of 100 μM bumetanide (hatched bar). Each bar represents mean \pm SE of 360 oocytes, obtained from 9 different experiments. * $P < 0.001$ vs. mBSC1-A4-injected oocytes.



7A, 100 mosmol/kg H_2O hypotonicity resulted in a significant increase in $^{22}\text{Na}^+$ uptake in mBSC1-A4 RNA-injected oocytes, compared with water-injected controls. The increased $^{22}\text{Na}^+$ uptake was abolished by addition of 100 μM bumetanide to the uptake medium. In contrast, hypotonicity had no effect on $^{86}\text{Rb}^+$ uptake by mBSC1-A4-expressing oocytes (Fig. 7B). The small reduction in $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in control and mBSC1-A4-expressing oocytes is due to the endogenous $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter (20). Thus with 100 mosmol/kg H_2O hypotonic conditions, mBSC1-A4 mediates $^{22}\text{Na}^+$ but not $^{86}\text{Rb}^+$ uptake. This observation is consistent with the lack of effect of K^+ omission on $^{22}\text{Na}^+$ uptake as shown in Fig. 6.

$^{22}\text{Na}^+$ uptake mediated by mBSC1-A4 is reduced by PKA activation. Because the switch from the $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ to $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ transport mode in mouse mTAL has been shown to be dependent on the presence of vasopressin (23), we assessed the effect of the cell-perme-

able cAMP analog DBcAMP and the phosphodiesterase inhibitor IBMX on the functional expression of mBSC1-A4. Figure 8 shows the result of a single experiment assessing the separate and combined effects of cAMP and IBMX on $^{22}\text{Na}^+$ uptake in mBSC1-A4-expressing oocytes under 100 mosmol/kg H_2O hypotonic conditions. The addition of 1 mM DBcAMP to the uptake medium resulted in a slight, but not significant, fall in $^{22}\text{Na}^+$ uptake ($6,611 \pm 700$ vs. $5,293 \pm 663$ pmol-oocyte $^{-1}\text{-h}^{-1}$, with and without DBcAMP, respectively). In contrast, the addition of 1 mM IBMX resulted in a significant 50% reduction of $^{22}\text{Na}^+$ uptake in mBSC1-A4-injected oocytes ($3,585 \pm 487$ pmol-oocyte $^{-1}\text{-h}^{-1}$, $P < 0.01$, vs. mBSC1-A4 control). Moreover, the combination of DBcAMP + IBMX exhibited a synergistic effect that resulted in a further reduction in $^{22}\text{Na}^+$ uptake to a value that was 70% lower than uptake in mBSC1-A4 control oocytes ($2,080 \pm 514$ pmol-oocyte $^{-1}\text{-h}^{-1}$, $P < 0.01$). This value was also

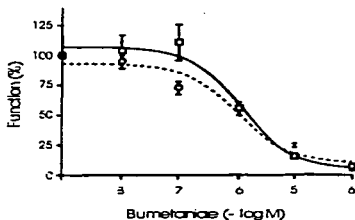


Fig. 5. Bumetanide concentration-dependent inhibition of mBSC1-A4 (—, solid line) and mBSC1-F9 (---, dashed line). Groups of 20 oocytes microinjected with mBSC1-A4 or mBSC1-F9 were exposed to increasing concentrations of bumetanide (10^{-6} to 10^{-4} M) in the preincubation and uptake media. Data were normalized as the percentage of maximal uptake obtained in the absence of bumetanide. Uptake was assessed at osmolalities of 100 mosmol/kg H_2O for mBSC1-A4 and at 150 mosmol/kg H_2O for mBSC1-F9 (21).

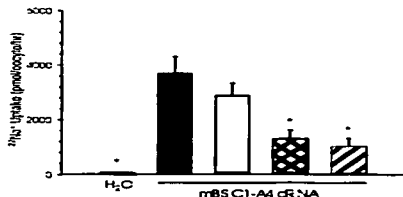


Fig. 6. Ion dependency and bumetanide sensitivity of $^{22}\text{Na}^+$ uptake in X -*in vivo* oocytes injected with water or mBSC1-A4 cRNAs as stated. Tracer uptake was performed in the presence of Na^+ , K^+ , and Cl^- in the water injected group (H_2O) and in the mBSC1-A4 injected oocytes (filled bar), in the absence of extracellular K^+ (open bar), in the absence of extracellular Cl^- (cross-hatched bar) or in the presence of all 3 ions and 100 μM bumetanide (hatched bar). Each bar represents mean \pm SE of 21 oocytes. * $P < 0.001$ vs. uptake in the presence of all 3 ions in the mBSC1-A4 injected oocytes.

ENCODING OF FUROSEMIDE-SENSITIVE Na-Cl COTRANSPORTER

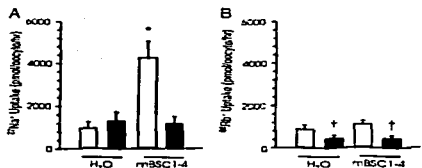


Fig. 7. $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ uptakes in *X. laevis* oocytes injected with either water or mBSC1-A4 cRNA, in the absence (open bars) or presence (filled bars) of 100 μM bumetanide. Uptakes were performed under 100 mosmol/kgH₂O conditions. Each bar represents mean \pm SE of 20 oocytes. * $P < 0.05$ vs. H₂O control. ** $P < 0.05$ vs. absence of bumetanide.

significantly different from the uptake in mBSC1-A4-expressing oocytes exposed to DBcAMP alone. We confirmed the inhibitory effect of 1 mM DBcAMP + 1 mM IBMX on mBSC1-A4 function in two additional experiments by using oocytes from different frogs ($8,425 \pm 912$ vs. $1,230 \pm 285$ pmol-oocyte⁻¹-h⁻¹ without and with cAMP+IBMX, respectively; $P < 0.00001$). In addition, Fig. 9 shows the effect of inhibition of endogenous PKA activity with 20 μM H89 on $^{22}\text{Na}^+$ uptake in mBSC1-A4-expressing oocytes under 100 mosmol/kgH₂O hypotonic conditions. The inhibition of PKA resulted in a significant increase in mBSC1-A4 function ($2,989 \pm 184$ vs. $4,762 \pm 424$ pmol-oocyte⁻¹-h⁻¹ in the absence and presence of H89, respectively; $P < 0.0001$). Moreover, $^{22}\text{Na}^+$ uptake in mBSC1-A4 cRNA-injected oocytes in the presence of H89 was abolished by 100 μM bumetanide. Thus functional expression of

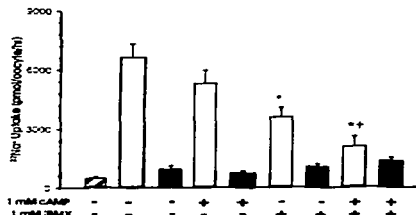


Fig. 8. Effects of dibutyryl cAMP and/or IBMX on mBSC1-A4-induced increase in $^{22}\text{Na}^+$ uptake in *X. laevis* oocytes. Water control oocytes (hatched bar), mBSC1-A4 oocytes in the absence (open bars) or presence (filled bars) of 100 μM bumetanide. Addition of 1 mM dibutyryl cAMP and/or 1 mM IBMX is depicted. Each bar represents mean \pm SE of 20 oocytes. * $P < 0.01$ vs. mBSC1-A4 control. + $P < 0.01$ vs. mBSC1-A4 + cAMP alone.

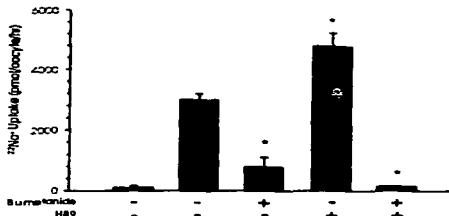


Fig. 9. Effect of H89-induced protein kinase A inhibition on mBSC1-A4 functional expression in hypotonic conditions. Open bars: uptake in water-injected controls; filled bars, mBSC1-A4 cRNA-injected oocytes as indicated. Each bar represents mean \pm SE of 20 oocytes. * $P < 0.01$ vs. uptake in mBSC1-A4 in the absence of H89.

mBSC1-A4 under hypotonic conditions is regulated by PKA activity.

DISCUSSION

The present work describes the functional properties of mBSC1-A4, the COOH-terminal truncated, alternatively spliced isoform of the murine *SLC12A1* gene expressed in TAL cells. Using the *X. laevis* oocyte heterologous expression system, we show that the mBSC1-A4 isoform is a functional transporter that encodes a K⁺-independent, loop diuretic-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter (Figs. 1, 4-7). Activation of the mBSC1-A4 cotransporter in oocytes requires exposure to reductions in osmolarity below 120 mosmol/kgH₂O (Figs. 1 and 2) and this is accompanied by a shift in expression of cotransporter protein from cytosol to the plasma membrane (Fig. 3). In addition, we demonstrate that the ion transport function of mBSC1-A4 in hypotonic media is further regulated by cAMP/IBMX (Figs. 8 and 9).

Several lines of evidence have indicated the existence of a K⁺-independent, furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter in mouse (23) and rabbit (5) TAL. Sun et al. (23), using isolated perfused mouse medullary TAL tubules, demonstrated that ouabain-induced cell swelling was absolutely dependent on salt entry into cells through the loop diuretic-sensitive, apical Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport mechanism. In the absence of vasopressin (i.e., cAMP), ouabain-induced swelling of the tubular cells was abolished by loop diuretic and by removal of luminal Na⁺ or Cl⁻ but not by omission of luminal K⁺. When vasopressin was added to the preparation, removal of luminal K⁺ resulted in prevention of cell swelling, indicating the existence of a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport system in the apical membrane. Thus vasopressin shifted the mode of apical cotransport from Na⁺-Cl⁻ to Na⁺-K⁺-2Cl⁻. In rabbit medullary TAL cells, Evelloff and co-workers (1, 5) had also shown

ENCODING OF FUROSEMIDE-SENSITIVE Na-Cl COTRANSPORTER

evidence for the coexistence of furosemide-sensitive Na⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport pathways and their regulation by osmolality (1, 5). These data taken together indicate that, in the TAL, when extracellular osmolality is low for cell swelling occurs by other means) and in the absence of vasopressin (or cAMP), the transepithelial salt reabsorption is mainly due to an apical Na⁺-Cl⁻ cotransporter, whereas when extracellular osmolality is increased and/or in the presence of vasopressin, the major salt transport pathway is the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. Both mechanisms observed in TAL cells are sensitive to loop diuretics, a finding consistent with our observations in mBSC1-A4- and mBSC1-F9-injected oocytes (Fig. 5).

We previously identified six spliced isoforms of the mouse Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter gene (19). Our initial functional expression of these isoforms revealed that the three long COOH-terminal domain mBSC1-9 proteins (A, B, and F) encode the loop diuretic-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. The shorter COOH-terminal domain isoforms (mBSC1-4A/B/F), however, showed no expression under our standard experimental conditions, with osmolalities between 150 and 210 mosmol/kgH₂O (21). Because increasing the extracellular osmolality inhibits the K⁺-independent Na⁺-Cl⁻ cotransporter in rabbit TAL cells (5), we reasoned that hypotonicity and/or increase in cell volume could be an important condition to activate the cotransporter. We now show that osmolalities below 120 mosmol/kgH₂O are required for functional expression of mBSC1-A4 in oocytes (Fig. 2). The primary cytosolic localization of mBSC1-A4 protein at an osmolality of 150 mosmol/kgH₂O shown in Fig. 3, left, provides an explanation for the lack of function of mBSC1-A4 at higher osmolalities, above 120 mosmol/kgH₂O (Fig. 2). Incubation of mBSC1-A4-injected oocytes in extracellular medium with an osmolality <120 mosmol/kgH₂O resulted in dramatic increases in Na⁺ uptake (Figs. 1 and 2) and was associated with immunohistochemical localization of mBSC1-A4 at the plasma membrane (Fig. 3, right). A similar hypotonicity-induced translocation-activation mechanism has been recently suggested by Watts and Good (24) for the Na⁺/H⁺ antiporter, NHE3, in TAL cells. In addition, other members of the electroneutral,

cation-dependent Cl⁻ cotransporter family are also regulated by hypotonicity (or cell volume), some being inhibited [by, e.g., endogenous Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in *Xenopus* oocytes, Fig. 1, (6, 22); the rat thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter (18)] and others being activated [K⁺-Cl⁻ (KCC) cotransporters (10, 20)].

However, the mechanism by which hypotonicity increases the localization of mBSC1-A4 at the plasma membrane and thus its activity as a Na⁺-Cl⁻ cotransporter is not clear from the present study. Potential mechanisms include enhanced posttranslational processing of the protein via activation of intracellular proteins such as heat shock proteins or other chaperones or alterations in local vesicular trafficking to the plasma membrane. In addition, it is also not clear whether the fundamental mechanism to explain the hypotonicity-induced activation of mBSC1-A4 is the increased cell volume per se or other mechanisms such as activation or deactivation of intracellular messengers or dilution of potential intracellular inhibitors (i.e., cAMP or intracellular Cl⁻). These are complex issues, and further studies will be necessary to clarify the mechanisms.

The activation of mBSC1-4 in the present study was observed when we reduced the extracellular osmolality below 130 mosmol/kgH₂O. The normal osmolality for oocytes is ~210 mosmol/kgH₂O. Thus this reduction represents a decrease of ~40%. Because oocytes are relatively impermeable to water, this percentage of reduction is required to develop hypotonicity-induced cell swelling. Such a low osmolality (130 mosmol/kgH₂O) will be rarely present in mammalian renal medulla. However, similar and even higher percentages of reduction in renal medulla osmolality develop during brisk diuresis induced by water loading. In these circumstances, interstitial NaCl and urea concentration decline rapidly and renal medulla osmolality can be reduced from 1,200 to 600 mosmol/kgH₂O. In contrast, due to the high content of osmolytes such as sorbitol, inositol, or betaine within the medullary cells, when medullary interstitial osmolality is reduced, cells take up water and swell (3). For this circumstance, we suggest that mBSC1-4 may be activated.

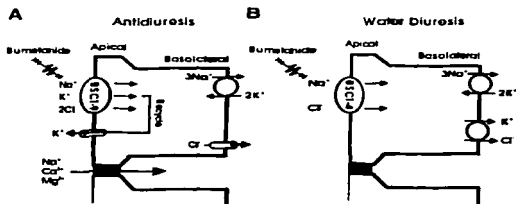


Fig. 10. Proposed model for thick ascending limb (TAL) function. A: operation of water conservation. B: operation during maximal water diuresis. See text for discussion.

According to our previous observations in mouse TAL (23), Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport should be sensitive to PKA activation induced by G_s-coupled, receptor-dependent generation of cAMP (e.g., by vasopressin). The major observations are that activation of PKA-dependent processes 1) enhance the rate of net salt reabsorption, and hence Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity, by the TAL (15); and 2) change the mode of Na⁺-Cl⁻ cotransport from K⁺-independent to K⁺-dependent (23). Because both mBSC1-9 and mBSC1-4 isoforms coexist in mouse medullary TAL cells (19), regulation of both cotransporter isoforms by PKA probably contributes to the vasopressin-stimulated state of salt transport in the mTAL. As we show in Fig. 8, addition of 1 mM CAMP-1 mM IBMX to the uptake medium resulted in an ~70% reduction in ²²Na⁺ uptake mediated by mBSC1-A4. In addition, inhibition of endogenous PKA activity by H89 in oocytes resulted in an increase in mBSC1-4 function (Fig. 9). Moreover, we have previously shown that mBSC1-A4 has a dominant negative effect on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport mediated by mBSC1-F9 and that activation of PKA abrogates this dominant negative effect (21). The latter gives rise to an increase in Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport activity. Thus PKA activation inhibits ion transport by mBSC1-A4 and abrogates the dominant negative effect of mBSC1-A4 on mBSC1-F9. These effects would inhibit K⁺-independent Na⁺-Cl⁻ cotransport and activate Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport. The specific mechanism of the dominant negative-like effect of mBSC1-A4 on mBSC1-F9 and its modulation by vasopressin are presently under investigation.

On the basis of these findings, we suggest a functional model for the molecular physiology of salt reabsorption in the renal medulla regulated by vasopressin. Two distinct functional and molecular models operate depending on the prevalent stimuli in the TAL. Figure 10A shows the functional model that operates during water conservation, a situation in which the osmolarity of the renal medulla is high and vasopressin is present. In this model, both Na⁺-K⁺-2Cl⁻ and apical K⁺ conductance will increase due to PKA activation (12). Coordinated function of both pathways ensures K⁺ recycling and generation of a lumen positive voltage. Because the apical membrane of the TAL is impermeable to water, the intense reabsorption of salt dilutes tubular fluid and concentrates the medullary interstitium. In this model, the Na⁺ entry pathway in apical membranes is the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter encoded by the mBSC1-9 isoforms. In contrast, Fig. 10B shows the functional model that operates during maximal water diuresis, a situation in which the wash-out of medullary tonicity provides a relatively hypotonic environment and vasopressin secretion rate is low. It has been shown that when the interstitial solute concentration in the renal medulla decreases rapidly, the cells take up water due to the high content of osmotically active substances such as glycine, inositol, etc. (2, 3). Thus under these circumstances, TAL cells swell and the Na⁺ pathway in the apical membrane operates as a Na⁺-Cl⁻ rather than as a Na⁺-K⁺-2Cl⁻

cotransporter. In this circumstance, in the mouse medullary TAL, the NaCl absorption rate is reduced to ~50% of that present in the antidiuretic state and in the presence of vasopressin (14, 23).

We are grateful to Octavio Villanueva and Jesús López for help with frog ears and to members of the Molecular Physiology Unit for suggestions and stimulating discussion.

This work was supported by research Grants 97629m from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and 75197-35301 from the Howard Hughes Medical Institute to G. Gamba and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grant DK-38891 to S. C. Hebert and G. Gamba. C. Plata and P. Alcázar were supported by scholarship grants from CONACYT and from the Dirección General del Personal Académico of the National University of Mexico. G. Gamba is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

Part of this work was presented at the 32nd Meeting of the American Society of Nephrology, held in 1999 in Miami, FL, and published as an abstract (*J Am Soc Nephrol* 10: 1268, 1999).

REFERENCES

- Alvo M, Calamia J, and Eveloff J. Lack of potassium effect on Na-Cl cotransport in the medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 267: F34-F39, 1995.
- Beck F, Dörge A, Rieck R, and Thurau K. Osmoregulation of renal papillary cells. *Physger Arch* 405: S28-S32, 1985.
- Blanton DG, Gamba G, and Schmolke M. Cellular osmoregulation in kidney medulla. In: *Cell Volume Regulation*, edited by Ling F, Basel: Karger, 1998, p 169-184.
- Diamond JN. Oogenesis in *Xenopus laevis*. *J Morphol* 136: 155-150, 1970.
- Eveloff J and Calamia J. Effect of osmolarity on cation fluxes in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 267: F176-F180, 1994.
- Gamba G, Calamia J, Lonardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, and Hebert SC. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian interstitial sodium-potassium-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722, 1994.
- Garay RP, Nazareet C, Hanneret PA, and Gragoe EJ Jr. Demonstration of a K⁺-Cl⁻ cotransport system in human red cells by its sensitivity to (R)-hydroxyethyl oxalyloacetic acid: regulation of cell swelling and distinction from the bumetanide-sensitive (Na⁺-K⁺-Cl⁻) cotransport system. *Mol Pharmacol* 33: 529-531, 1988.
- Giesen-Cossue E, Fandeleur P, Schmidt M, Schwartz J, and Imbs JL. Loop diuretics bind to distinct receptors in renal medulla and cortex. *J Hypertens*, 3: Suppl 3: S211-S213, 1985.
- Giesen-Cossue EM, Welsch J, Imbs JL, Schmidt M, and Schwartz J. Characterization of a high affinity piretanide receptor on kidney membranes. *Eur J Pharmacol* 114: 23-31, 1985.
- Gillen CM, Brill S, Payne JA, and Forbush B III. Molecular cloning and functional expression of a cotransporter from rabbit red cells. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271: 16237-16244, 1996.
- Gamba G, and Hebert SC. PIRATE: PIRate II. High-mannose binding to mouse kidney membranes: identification of corresponding membrane proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 260: C719-C760, 1991.
- Hebert SC. Roles of Na-K-2Cl and Na-Cl cotransporters and ROMK potassium channels in urinary concentrating mechanism. *Physiol Rev* 72: F225-F237, 1992.
- Hebert SC and Andreoli TE. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 267: F756-F766, 1994.
- Hebert SC and Andreoli TE. Effects of antidiuretic hormone on cellular conductance pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. II. Determinants of the ADH-mediated

ENCODING OF FUROSEMIDE-SENSITIVE NA-CL COTRANSPORTER

- increases in transepithelial voltage and in net Cl^- absorption. *J Membr Biol* 90: 221-230, 1984.
15. Hebert SC, Culppepper RM, and Andreoli TE. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport: origin of transepithelial voltage. *Am J Physiol Renal Physiol* 241: F432-F442, 1981.
 16. Hebert SC, Culppepper RM, and Andreoli TE. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. III. Modulation of ADH effect by peritubular osmolality. *Am J Physiol Renal Physiol* 241: F443-F451, 1981.
 17. Igarashi P, Vanden Heuvel GB, Payne JA, and Forbush B III. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 269: F406-F418, 1995.
 18. Monroy A, Plata C, Hebert SC, and Gamba G. Characterization of the thiazide-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F161-F169, 2000.
 19. Mount DB, Backgard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DR, Gamba G, and Hebert SC. Isoforms of the Na-K-2Cl transporter in murine TAL. I. Molecular characterization and intraserial localization. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F347-F358, 1999.
 20. Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, Geroge AL Jr, Delpire E, and Gamba G. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16355-16362, 1999.
 21. Plata C, Mount DB, Rubio V, Hebert SC, and Gamba G. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL. II. Functional characterization and activation by cAMP. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F359-F366, 1999.
 22. Shtelar RE, Scholermann B, Morrison AJ, and Kinne RKH. Characterization of the Na⁺K⁺2Cl⁻ cotransport system in oocytes from *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Acta* 1023: 184-190, 1990.
 23. Sun A, Grossman EB, Lombardi M, and Hebert SC. Vasopressin alters the mechanism of apical Cl^- entry from $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ to $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport in mouse medullary thick ascending limb. *J Membr Biol* 120: 83-94, 1991.
 24. Watta BA III and Good CW. Hypoosmolality stimulates apical membrane $\text{Na}^+\text{-VH}(-)$ exchange and HCO_3^- absorption in renal thick ascending limb. *J Clin Invest* 104: 1593-1602, 1999.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Functional Properties of the Apical $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Cotransporter Isoforms*

Received for publication, October 31, 2000, and in revised form, January 9, 2002
Published, JBC Papers in Press, January 14, 2002, DOI 10.1074/jbc.M110447200

Consuelo Plataz, Patricia Meade†‡, Norma Vázquez, Steven C. Hebert†, and Gerardo Gambati

From the *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 and the †Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University Medical School, New Haven, Connecticut 06520

The bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (BSC1) is the major pathway for salt reabsorption in the apical membrane of the mammalian thick ascending limb of Henle. Three isoforms of the cotransporter, known as A, B, and F, exhibit axial expression along the thick ascending limb. We report here a functional comparison of the three isoforms from mouse kidney. When expressed in *Xenopus* oocytes the mBSC1-A isoform showed higher capacity of transport, with no difference in the amount of surface expression. Kinetic characterization revealed different affinities for the three cotransported ions. The observed EC_{50} values for Na^+ , K^+ , and Cl^- were 5.0 ± 3.9 , 0.96 ± 0.16 , and 22.2 ± 4.8 mM for mBSC1-A; 3.0 ± 0.6 , 0.76 ± 0.07 , and 11.6 ± 0.7 mM for mBSC1-B; and 20.8 ± 7.2 , 1.54 ± 0.16 , and 29.2 ± 2.1 mM for mBSC1-F, respectively. Bumetanide sensitivity was higher in mBSC1-B compared with the mBSC1-A and mBSC1-F isoforms. All three transporters were partially inhibited by hypotonicity but to different extents. The cell swelling-induced inhibition profile was mBSC1-F > mBSC1-B > mBSC1-A. The function of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter was not affected by extracellular pH or by the addition of metal ions: 4,4'-dithiobis(5-cyanatobenzene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), or R^1 - β -(2-n-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-indenyl-5-yl)-oxyacetic acid (DIOA) to the extracellular solution. In contrast, exposure of BSC1 to HgCl_2 before the uptake period reduced the activity of the cotransporter. The effect of HgCl_2 was dose-dependent, and mBSC1-A and mBSC1-B exhibited higher affinity than mBSC1-F. Overall, the functional comparison of the murine apical renal-specific $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter isoforms A, B, and F reveals important functional, pharmacological, and kinetic differences, with both physiological and structural implications.

The bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter is the major salt transport pathway in the apical membrane of the

mammalian thick ascending limb of Henle's loop (TALH).¹ The function of this cotransporter in the TALH is critical for salt reabsorption, for the production and maintenance of the counter-current multiplication mechanism, and is also involved in the regulation of the acid-base and divalent mineral cation metabolism (1). The disruption of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter gene in humans (2) and mice (3) produces Bartter's syndrome, an autosomal recessive disease characterized by metabolic alkalosis, hypokalemia, hypercalciuria, and severe volume depletion, accompanied by a reduction in arterial blood pressure. In addition, the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter protein in the TALH is the main pharmacological target of loop diuretics (4), which are used extensively in the treatment of edematous states.

The primary structure of the kidney-specific, bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (BSC1 or NKCC2) has been elucidated by cloning cDNA from rat (5), rabbit (6), mouse (7), and human kidney (2). BSC1 belongs to the superfamily of electrogenic cation-coupled chloride cotransporters for which eight genes have been identified (8). Two of these genes encode for $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporters: BSC1, a kidney-specific cotransporter expressed only at the apical membrane of the TALH, and BSC2 (also known as NKCC2), a ubiquitously expressed gene at the basolateral membrane of epithelial cells, which is also expressed in several nonepithelial cells. The degree of identity between these proteins is ~50%, and in humans, the BSC1 and BSC2 genes are localized in chromosomes 15 and 3, respectively. The murine BSC1 gene gives rise to six alternatively spliced isoforms caused by the combination of two splicing mechanisms. One results from the existence of three mutually exclusive cassette exons of 96 bp named A, B, and F, which encode 31 amino acid residues that are part of the putative transmembrane segment 2 and the connecting segment between transmembrane segments 2 and 3 (6, 7). The other splicing mechanism is a polyadenylation signal in the intron 16 and 17 that produces a C-terminal truncated isoform that lacks the last 327 amino acid residues but contains 53 residues at the end which are not present in the longer isoforms (9). Because the two splicing mechanisms are independent of each other, six isoforms are present in the TALH cells: three isoforms with a long COOH-terminal domain (A, B, and F) and three with a short COOH-terminal domain (A, B, and F) (9, 10).

* This work was supported in part by Research Grants 97829M from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and 75197-935601 from the Howard Hughes Medical Institute to G. G. and DK266503 from the National Institutes of Health to S. C. H. and G. G. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Supported by scholarship grants from CONACYT and from the Dirección General del Personal Académico of the National University of Mexico.

‡ To whom correspondence should be addressed: Molecular Physiology Unit, Vaseco de Quirigua 15, Tlalpan, 14000, Mexico City, Mexico. Tel.: 525-513-3868; Fax: 525-653-0823; E-mail: gambati@conacyt.mx.

¹ The abbreviations used are: TALH, thick ascending limb of Henle's loop; cTALH, cortical TALH; mTALH, medullary TALH; BSC1, bumetanide-sensitive cotransporter 1; also known as NKCC2; BSC2, bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 2; also known as NKCC1; mBSC1, mouse BSC1; DIDS, 4,4'-dithiobis(5-cyanatobenzene-2,2'-disulfonic acid); DIOA, R^1 - β -(2-n-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-indenyl-5-yl)-oxyacetic acid; GFP, green fluorescent protein; GFP-enhanced GFP; "NB", tracer build-up.

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

The splicing at the COOH-terminal domain in mouse BSC1 has remarkable effects on the cotransporter properties. Whereas the three longer isoforms (A, B, and F) function as bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters which are partially inhibited by furosemide, the shorter isoform mBSC1 operates as a K⁺-independent, but nevertheless bumetanide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter that is activated by hypotonicity (12). Both transporters are equally sensitive to loop diuretics. In addition, the shorter isoform is sensitive to cAMP and exerts a dominant-negative effect upon the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter which can be abrogated by cAMP(11). Thus, splicing of the COOH-terminal domain changes the type and stoichiometry of the cotransporters, ions, the response to cell swelling, and provides an additional regulatory mechanism of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity.

The functional effect of splicing of the mutually exclusive cassette exons A, B, and F, encoding part of the transmembrane segment 2, is still unknown, but it has been suggested that the exons could affect the transport properties of the cotransporter. Early studies on isolated cortical TALH (cTALH) segments by Burg (13) and medullary TALH (mTALH) segments by Kocha and Kokko (14) indicated that mTALH transports NaCl more rapidly than the cTALH but with greater diluting power in the cTALH (15), suggesting heterogeneity of the transport properties along the TALH. Supporting this point, the above observations were confirmed by Greger (16), Hus-Citharel and Morel (17), and Eveloff et al. (18), when cTALH was used as a source of the plasma membrane vesicles, was different from the apparent affinity obtained by Koenig et al. (19) and Burnham et al. (20) when mTALH was used. In this regard, it has been shown that the splicing isoforms A, B, and F exhibit axial distribution along the TALH. The F isoform is absent in the cTALH and present in the mTALH, with higher expression in the inner stripe of the outer medulla. The A isoform is present in cTALH and mTALH, with higher expression in the outer stripe of the outer medulla, and the B isoform is present only in the cTALH 8, 7, 21. Thus heterogeneity in the salt transport along the TALH could be caused by the axial distribution of the three isoforms A, B, and F of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. However, the functional characterization of these isoforms has not been addressed.

In the present study, we show a functional characterization of the longer isoforms A, B, and F of the murine Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter using the *Xenopus laevis* oocytes as an heterologous expression system. Our data revealed significant differences in the sensitivity to bumetanide, furosemide, and ouabain, as well as on the sensitivity to bumetanide and response to hypotonicity.

MATERIALS AND METHODS

Xenopus Oocyte Preparation—Adult female X. laevis frogs were obtained from Nasco (Fort Atkinson, WI). Oocytes were harvested by surgery under 0.1% tricaine and incubated for 1 h in the frog buffer ND98 in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 3 HEPES/Tris, pH 7.4, in the presence of 2 mg/ml colchicine B. Then, oocytes were washed four times in ND98, defolliculated manually, and incubated overnight in the same medium at 18°C supplemented with 2.5 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml gentamicin. The next day, stage V-VI oocytes (22) were washed with 20 ml of water or cRNA at a concentration of 0.3 µg/µl (25 ng of cRNA/oocyte). After injection, oocytes were incubated for 4 days in ND98 with continuous gentamicin. The incubation medium was changed every 24 h. The night before the uptake experiments were performed, oocytes were incubated in Cl⁻-free ND98 with 100 mg/ml sodium isothionate, 2 potassium isothionate, 1 calcium gluconate, 2.0 magnesium gluconate, 5 mM HEPES, 2.5 sodium pyruvate, 3 mg/ml gentamicin, pH 7.4 (23).

In Vitro mBSC1 cRNA Transcription and Preparation of mouse mBSC1 cDNA used in the study have been reported previously (9). In brief, mBSC1-F and mBSC1-A isoforms were cloned by homology

from a mouse outer medulla cDNA library, using the flounder thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter cDNA as a probe (5, 9). The short B cassette cDNA was lengthened by PCR and ligated into the *Bam*I and *Xba*I sites of the mBSC1-F isoform. The cDNAs were then subcloned in the present study are inserted in the plasmid pSPORT1 (Invitrogen). To prepare cRNA, each isoform cDNA was linearized at the 3'-end using *Xba*I from the molecular biology kit and cRNA was synthesized *in vitro*, using the T7 RNA polymerase mMESSAGE kit (Ambion). Transcription product integrity was confirmed on agarose gels, and the concentration of the cRNA was determined by spectrophotometry at 240. Beckman, Fullerton, CA. cRNA was stored frozen in aliquots at -80°C.

Assessment of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter Function—The function of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter was assessed by measuring tracer uptake by the *Xenopus laevis* oocytes. The uptake was measured in oocytes following this general protocol: a 30-min incubation in isotonic K⁺- and Cl⁻-free medium (in mM: 96 sodium gluconate, 6.0 calcium gluconate, 2.0 magnesium gluconate, 5.0 HEPES, pH 7.4) with ouabain followed by a 60-min uptake period in the presence of Na⁺, K⁺, and Cl⁻. For most experiments the isotonic medium contained (in mM): 96 NaCl, 10 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 3 HEPES, pH 7.4, supplemented with 1 mM ouabain and 2.0 µM of "RB". Because *X. laevis* oocytes express an endogenous Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (5) every experiment included the appropriate groups of water-injected oocytes.

To analyze the ion transport kinetics of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms, experiments were performed varying the concentrations of Na⁺, K⁺ and Cl⁻. For Na⁺ kinetics, the extracellular K⁺ and Cl⁻ concentrations were fixed at 10 and 90 mM, respectively. For K⁺ kinetics, Na⁺ and Cl⁻ were fixed at 90 mM, and for Cl⁻ kinetics the Na⁺ and K⁺ concentrations were fixed at 90 mM. To maintain osmolality and ionic strength, N-methyl-D-glucamine was used as Na⁺ and K⁺ substitute, and gluconate was used as a Cl⁻ substitute. The transport kinetics for a single ion (Na⁺, K⁺, or Cl⁻) was assessed for the three mBSC1 isoforms at the same time, with a single batch oocytes and solutions. In the same experiment uptake was also measured for each point in time in oocytes (data not shown), and the mean values for water groups were subtracted in corresponding mBSC1 groups to analyze only the "RB" uptake because of the injected mBSC1 isoform. Kinetic analysis was performed by estimating the EC₅₀ values for each ion. The EC₅₀ values were calculated from log(ion concentration) versus uptake. To generate the EC₅₀ values, the initial and uphill dose-response equation with variable slope, the latter allows the Hill slope to vary from unity. The sensitivity and kinetics for bumetanide were measured by exposing groups of oocytes to bumetanide in oocytes to bumetanide at concentrations varying from 10⁻⁸ to 10⁻⁴ M. The desired concentration of the loop diuretic was present in both the incubation and uptake periods. To generate the EC₅₀ values, the osmolality upon the function of mBSC1 isoforms using the following conditions during uptake: hypotonicity of 160, isotonicity of 210, and hypertonicity of 260 mosmol/kg. To generate the EC₅₀ values, the mBSC1 isoforms were also analyzed at the same time, and all solutions contained 65 mM NaCl and 5 mM KCl, which resulted in an osmolality of 160 mosmol/kg. To generate the EC₅₀ values, the EC₅₀ values of 160 mosmol/kg we added 43 and 90 mM sucrose, respectively.

All uptake were performed at 30°C. At the end of the uptake period, oocytes were washed five times in Cl⁻-free ND98 with 100 mg/ml ouabain to remove extracellular fluid tracer. After the oocytes were dissolved in 10% SDS, tracer activity was determined for each oocyte by scintillation counting.

Assessment of mBSC1 Isoform Expression in Oocyte Plasma Membrane—The surface expression of each mBSC1 isoform in the oocyte plasma membrane was assessed using the specific murine GFP-mBSC1 fluorescent protein (GFP-mBSC1 fusion constructs). To make the GFP-mBSC1 fusion constructs, GFP fragments containing the full-length mBSC1-A, B, and F were subcloned from pSPORT1 into the restriction enzymes *Sma*I and *Nhe*I, gel isolated and ligated into pGFP-F1 (Clontech, Palo Alto, CA), which contains the GFP-mBSC1-F, GFP-mBSC1-B, and GFP-mBSC1-A. The GFP-mBSC1-F, GFP-mBSC1-B and GFP-mBSC1-A fragments containing the COOH terminus of GFP. Then, the cDNA fragment containing the GFP-mBSC1-F, GFP-mBSC1-B, and GFP-mBSC1-A fragments was removed from the GFP-mBSC1-F, GFP-mBSC1-B, and GFP-mBSC1-A fragments by restriction enzyme digestion with *Age*I and *Nhe*I and ligated into pSPORT1. To obtain GFP-mBSC1-B and GFP-mBSC1-F, the fragment *Sma*I to *Nhe*I of GFP-mBSC1-F and GFP-mBSC1-B were removed from the GFP-mBSC1-F and GFP-mBSC1-B fragments by restriction enzyme digestion with *Age*I and *Nhe*I and ligated into pSPORT1. To obtain mBSC1-B and mBSC1-F, which were already in pSPORT1 (9), GFP-mBSC1-B and GFP-mBSC1-F were removed from the GFP-mBSC1-B and GFP-mBSC1-F fragments by restriction enzyme digestion with *Age*I and *Nhe*I and ligated into pSPORT1. All GFP-mBSC1-F injected oocytes were used as control. After 4

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

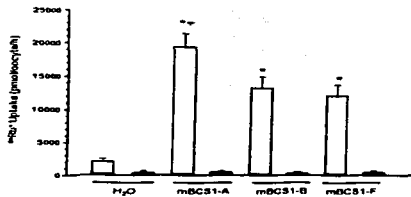


FIG. 1. Functional expression of mBSC1 isoforms in *Xenopus* oocytes that were injected with water or with 25 ng of cRNA from mBSC1-A, mBSC1-B, or mBSC1-F, as indicated. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was assessed in control conditions (white bars) or in the presence of 10^{-6} M bumetanide (black bars). Each bar represents the mean \pm S.E. of 11 experiments from different frogs. * indicates a significant difference from the uptake in a control group ($p < 0.001$); + indicates a significant difference from the uptake in mBSC1-B and mBSC1-F groups ($p < 0.001$).

days of incubation in regular ND96, oocytes were monitored for GFP fluorescence using a Zeiss laser scanning confocal microscope objective lens ($\times 10$, Nikon). Light of excitation wavelength 488 nm and emission 515–563 nm was used to visualize GFP fluorescence. Plasma membrane fluorescence was quantified by determining the pixel intensity around the entire oocyte circumference using SigmaScan Pro image analysis software.

Statistical Analysis.—The significance of the differences between groups was tested by one-way analysis of variance with multiple comparison using Bonferroni correction or by the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks with the Dunn method for multiple comparison procedures, as needed. The results are presented as mean \pm S.E.

RESULTS

Expression of mBSC1 Isoforms in *Xenopus* Oocytes.—We and others [3, 21–26] have shown previously that *Xenopus* oocytes exhibit an endogenous expression of the bumetanide-sensitive Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter. As shown in Fig. 1, $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in H₂O-injected oocytes was 2,113 \pm 346 pmol-occyte⁻¹·h⁻¹ in control conditions and 417 \pm 202 pmol-occyte⁻¹·h⁻¹ in the presence of a 10^{-6} M concentration of the loop diuretic bumetanide. Background $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was, however, increased by microinjection of *X. laevis* oocytes with mBSC1-A, mBSC1-B, or mBSC1-F cRNA. The uptake was reduced significantly in all groups in the presence of bumetanide. Thus, to analyze the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake induced only by each mBSC1 isoform, in all experiments performed for the study, $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was measured simultaneously in water-injected oocytes, and the mean values for the water groups were subtracted in corresponding mBSC1 groups.

As shown in Fig. 1, $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in mBSC1-A-injected oocytes was 19,393 \pm 1,997 pmol-occyte⁻¹·h⁻¹, whereas in mBSC1-B oocytes it was 13,229 \pm 1,640 pmol-occyte⁻¹·h⁻¹, and in mBSC1-F it was 12,068 \pm 1,561 pmol-occyte⁻¹·h⁻¹. Thus $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in the mBSC1-A isoform is significantly higher than in mBSC1-B and mBSC1-F isoforms ($p < 0.001$). The results shown in Fig. 1 are the pooled data from 11 different experiments, using oocytes from different frogs, with an average of 18 oocytes/group in each experiment. The cRNA used was obtained from three different batches, and seven to nine oocytes were injected with the same amount of cRNA (25 ng/occyte). The cDNA of the three isoforms used were inserted in the same vector (pSPORT1), contained the same 5' and 3'

untranslated regions, and cRNA was transcribed *in vitro* for the three isoforms simultaneously, using the same T7 RNA polymerase. Thus, differences among isoforms in Fig. 1 are unlikely to be the result of injecting mBSC1-A oocytes with a better quality cRNA, with higher concentration of cRNA/occyte or that mBSC1-A cRNA was better translated than the other two. Instead, these results suggest that the mBSC1-A isoform exhibits either higher surface expression or higher capacity of transport than the mBSC1-B and mBSC1-F isoforms. To determine whether the differences in surface expression were caused by variation in the surface expression of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter isoforms, *X. laevis* oocytes injected with GFP-mBSC1-A, GFP-mBSC1-B, or GFP-mBSC1-F cRNA isoforms were analyzed by confocal fluorescence microscopy, Figs. 2, A–D. As present a representative picture of oocytes injected with each isoform, and Fig. 2E shows the result of these experiments in which at least 40 oocytes/isoform were evaluated. As shown in Fig. 2E, although numbers were smaller on mBSC1-F-injected oocytes (31,212 \pm 4,165; $n = 4$) than in those injected with mBSC1-A (48,888 \pm 6,042; $n = 5$) or mBSC1-B (43,995 \pm 8,495; $n = 4$), analysis of variance showed no significant differences in surface expression among the three isoforms. Thus, under our experimental conditions it is unlikely that mutually exclusive cassette exon affects the surface expression of the cotransporter in *Xenopus* oocytes. This observation supports the hypothesis from Fig. 1 that mBSC1-A might be the isoform with the highest capacity of transport.

Transport Kinetics of mBSC1 Isoforms.—The kinetic transport parameters for each ion were assessed for the three isoforms simultaneously, in the same batch of injected oocytes. Fig. 3A shows the Na⁺ transport kinetics of each isoform, and panels B, C, and D depict the Hill coefficient plots for Na⁺ in mBSC1-B, mBSC1-A, and mBSC1-F, respectively. The Na⁺ dependence of $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was assessed with fixed concentrations of K⁺ and Cl⁻ at 10 and 96 mM, respectively, with changing concentrations of Na⁺ from 0 to 80 mM. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake increased as the Na⁺ concentration was increased until a plateau phase was reached, compatible with Michaelis-Menten behavior (Fig. 3A). The EC₅₀ and Hill coefficient values. The EC₅₀ values for Na⁺ were similar between mBSC1-A and mBSC1-B isoforms but different from the values observed for the mBSC1-F isoform. Fig. 3A shows the K⁺ transport kinetics of each isoform, and panels B, C, and D depict the Hill coefficient plots for K⁺ in mBSC1-B, mBSC1-A, and mBSC1-F, respectively. The experiments were performed with fixed concentrations of Na⁺ and Cl⁻ at 96 mM, with increased concentrations of K⁺ from 0 to 10 mM. The $^{86}\text{Rb}^+$ uptake increased as the K⁺ concentration increased in the extracellular medium until a plateau phase was reached. EC₅₀ and Hill coefficients are shown in Table I. As with Na⁺ transport kinetics, the EC₅₀ values observed in mBSC1-A and mBSC1-B were similar, whereas the EC₅₀ for K⁺ in mBSC1-F isoform was higher. Fig. 3A depicts the Cl⁻ transport kinetics for each mBSC1 isoform (panels B, C, and D show the Hill coefficient plots for Cl⁻). These experiments were carried out with Na⁺ and K⁺ concentrations fixed at 96 and 10 mM, respectively, with increased Cl⁻ concentrations from 0 to 96 mM. $^{86}\text{Rb}^+$ uptake increased as a function of the Cl⁻ concentration. The plateau phase was reached in mBSC1-A, mBSC1-B, and mBSC1-F in mBSC1-F. As shown in Table I, the EC₅₀ value for Cl⁻ was higher in mBSC1-F than in mBSC1-A or mBSC1-B. Hill coefficients for Na⁺ and K⁺ in the three isoforms were close to unity, whereas Hill coefficients for Cl⁻ were above unity, consistent with the 1Na⁺:1K⁺:2Cl⁻ stoichiometry. As shown in Fig. 3–5 show, in general mBSC1-A and mBSC1-B exhibit very similar kinetic properties for the three cotransported ions, sug-

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

FIG. 2. Plasma membrane fluorescence of GFP-mBSC1 fusion constructs expressed in *X. laevis* oocytes. Oocytes were injected with water or with 25 ng of cRNA from GFP-mBSC1-A, GFP-mBSC1-B, or GFP-mBSC1-F, as indicated. Panels A-D, confocal micrographs showing representative examples of *X. laevis* oocytes injected with water or with GFP-mBSC1 constructs. Panel A, water-injected oocytes showed no plasma membrane-associated fluorescence. Oocytes injected with GFP-mBSC1-A (panel B), GFP-mBSC1-B (panel C), and GFP-mBSC1-F (panel D) each exhibit distinct plasma membrane-associated fluorescence, which is similar in the three isoforms. Panel E, each bar represents the mean \pm S.E. of at least 40 oocytes from three different frogs. mBSC1 groups were not statistically different according to Kruskal-Wallis one-way analysis of variance.

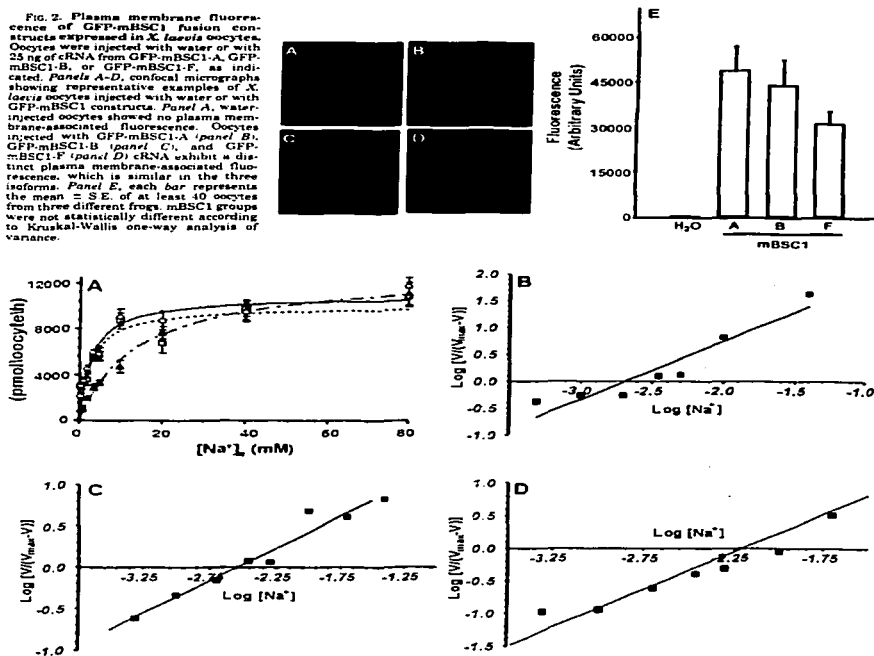


FIG. 3. Kinetic transport analysis for Na⁺ in mBSC1 isoforms. Panel A, Na⁺-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake in *X. laevis* oocytes injected with mBSC1-A cRNA, mBSC1-B cRNA, and mBSC1-F cRNA. The experiment was performed with increasing Na⁺ concentrations of 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 40, and 80 mM, with the concentrations of K⁺ and Cl⁻ fixed at 10 and 90 mM, respectively. Lines were fit using the Michaelis-Menten equation. Each point represents the mean \pm S.E. of 15 oocytes. Panels B, C, and D show the Hill plots for Na⁺ in mBSC1-B, mBSC1-A, and mBSC1-F, respectively.

gesting that affinity for each ion is similar between these two isoforms. In contrast, the EC₅₀ values for Na⁺, K⁺, and Cl⁻ in mBSC1-F-injected oocytes were higher, suggesting that this is the isoform with the lowest affinity for the cotransported ions.

Kinetics of Bumetanide Inhibition of mBSC1 Isoforms—Bumetanide-induced inhibition of cotransporter activity is one of the hallmarks of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter. Thus, we analyzed the inhibitory kinetics of bumetanide on mBSC1-A,

mBSC1-B, and mBSC1-F transport in oocytes. As shown in Fig. 6, all three isoforms were inhibited by the loop diuretic in a dose-dependent manner. However, the IC₅₀ for bumetanide inhibition of ⁸⁶Rb⁺ uptake was lower in mBSC1-B (600 nM) than in mBSC1-A (2 μM) or mBSC1-F (3.4 μM). In addition, the percentage of inhibition of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter function from 10⁻⁷ to 10⁻⁵ M concentration was significantly higher in mBSC1-B than in mBSC1-F and mBSC1-A. Thus, the

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

TABLE I
EC₅₀ values and Hill coefficient for Na⁺, K⁺, and Cl⁻ transport in mBSC1 isoforms

	Sodium		Potassium		Chloride	
	EC ₅₀	Hill	EC ₅₀	Hill	EC ₅₀	Hill
mBSC1-B	3.0 ± 0.6	1.09 ± 0.1	0.76 ± 0.07	1.00 ± 0.1	11.6 ± 0.7	1.53 ± 0.06
mBSC1-A	3.0 ± 3.9	1.16 ± 0.1	0.9 ± 0.16	0.93 ± 0.09	22.2 ± 4.6	1.93 ± 0.31
mBSC1-F	20.6 ± 7.2	0.78 ± 0.1	1.34 ± 0.16	0.95 ± 0.05	29.2 ± 2.1	2.45 ± 0.25

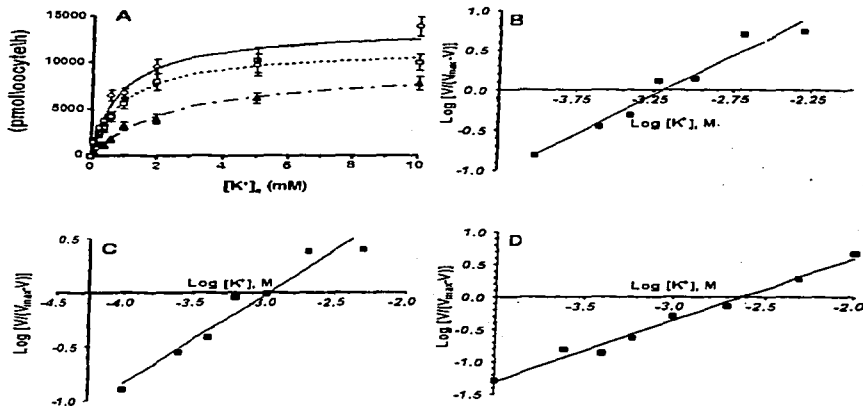


Fig. 4. Kinetic transport analysis for K⁺ in mBSC1 isoforms. Panel A, K⁺-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake in oocytes injected with mBSC1-A (squares), mBSC1-B (circles), and mBSC1-F (triangles) cRNA. Uptake was assessed in the presence of increasing K⁺ concentrations of 0.1, 0.25, 0.4, 0.6, 1.0, 2.5, and 10 mM. For the K⁺ kinetics analysis the Na⁺ and Cl⁻ concentration was fixed at 96 mM. Lines were fit using the Michaelis-Menten equation. Each point represents the mean ± S.E. of 15 oocytes. Panels B, C, and D show the Hill plots for K⁺ in mBSC1-B, mBSC1-A, and mBSC1-F, respectively.

mBSC1-B isoform exhibited higher affinity for bumetanide than the other two isoforms.

Regulation of mBSC1 Isoforms by Osmolarity—As all members of the electroneutral cation-coupled chloride cotransporter family, the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter is a cell volume-regulated protein. We have shown before [5] a significant reduction of the rat BSC1-F cotransporter function when oocytes were incubated in hypotonic medium (~160 mosmol/kg) compared with isotonic frog Ringer (~210 mosmol/kg). We also observed in hypotonic medium that the reduction of the endogenously expressed Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter in oocytes was significantly higher than the inhibition observed in rat BSC1-F, suggesting that sensitivity to cell volume might be different among Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter isoforms. Accordingly, we assessed the bumetanide-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake in oocytes injected with mBSC1-A, mBSC1-B, and mBSC1-F cRNA and exposed to an uptake medium containing 65 mM NaCl at three different osmolarities: hypotonic (~160 mosmol/kg, the osmolarity obtained by the 65 mM NaCl concentration in the uptake medium), isotonic (~210 mosmol/kg), or hypertonic (~260 mosmol/

kg) with sucrose added to the 65 mM NaCl uptake medium to adjust osmolarity. Therefore, ⁸⁶Rb⁺ uptake was assessed in three osmolar conditions, without differences in extracellular NaCl concentration or ionic strength. The uptake in isotonic medium was taken as 100% activity. As shown in Fig. 7, incubation of oocytes in 260 mosmol/kg resulted in a significant increase in the activity of the endogenously expressed oocyte Na⁺:K⁺:2Cl⁻, whereas the activity of the mBSC1 isoforms was unchanged. When ⁸⁶Rb⁺ uptake was performed in 160 mosmol/kg, the endogenous oocyte Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter activity was inhibited completely (5.1 ± 1.0% of the function observed in isotonicity), whereas the activity of mBSC1 isoforms was only partially reduced, but to a different extent among the isoforms. Comparing with uptake assessed in isotonicity, the ⁸⁶Rb⁺ uptake in 160 mosmol/kg in mBSC1-A was 74 ± 3.3%, in mBSC1-B was 57 ± 3.2%, and in mBSC1-F was 46 ± 2.9% (p < 0.01). Thus, the cell swelling-induced inhibition profile of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter isoforms was mBSC1-F > mBSC1-B > mBSC1-A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

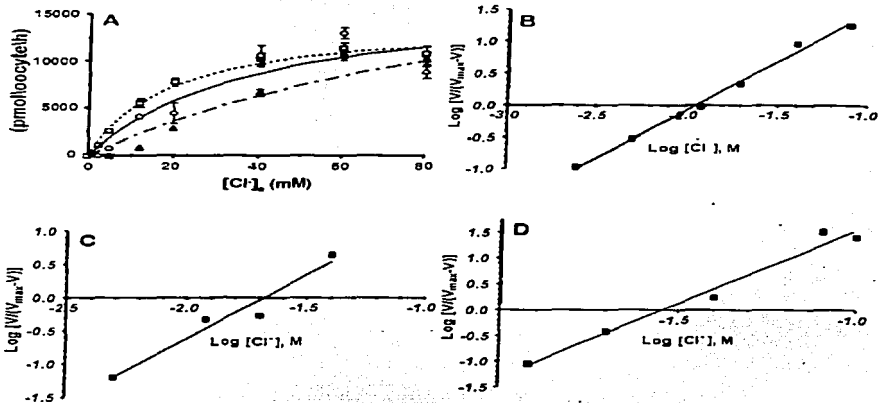


Fig. 5. Kinetic transport analysis for Cl^- in mBSC1 isoforms. Panel A, Cl^- -dependent $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in oocytes injected with mBSC1-A (circles), mBSC1-B (squares), and mBSC1-F (triangles) cRNA. Uptake was assessed in the presence of increased concentrations of extracellular Cl^- of 2.5, 3, 12, 20, 40, 60, 50, and 100 mM, with the concentration of Na^+ and K^+ fixed at 96 and 10 mM, respectively. Lines were fit using the Michaelis-Menten equation. Each point represents the mean \pm S.E. of 15 oocytes. Panels B, C, and D show the Hill plots for Cl^- in mBSC1-B, mBSC1-A, and mBSC1-F, respectively.

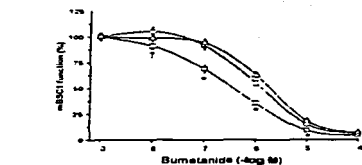


Fig. 6. Kinetic analysis of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter isoform inhibition by bumetanide. Oocytes were microinjected with mBSC1-A (circles), mBSC1-B (squares), and mBSC1-F (triangles) cRNA, and 4 days later $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was assessed under control conditions or in the presence of increased concentration of bumetanide from 10^{-7} to 10^{-6} M. Uptakes were performed during the 60 min in uptake solution containing 96 mM Na^+ and Cl^- and 10 mM K^+ . IC₅₀ values for bumetanide inhibition were 600 nM, 2 μM , and 3.4 μM for mBSC1-B, mBSC1-A, and mBSC1-F isoforms, respectively. Each point represents the mean \pm S.E. of 15 oocytes. * indicates $p < 0.05$ versus uptake in mBSC1-A and mBSC1-F; ∇ indicates $p < 0.05$ versus uptake in mBSC1-A.

Effect of pH on rBSC1 Function and Bumetanide Inhibition—Fig. 8A shows the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in *X. laevis* oocytes injected with each of the mBSC1 isoforms and exposed to extracellular pH from 6.0 to 8.0. Fig. 8B shows the percentage of bumetanide inhibition of each isoform. Uptake experiments

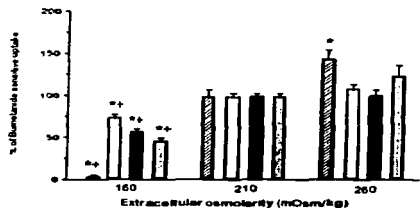


Fig. 7. Effect of osmolarity in *X. laevis* oocytes injected with H_2O (hatched bars), bumetanide (grey bars), mBSC1-A (white bars), mBSC1-B (black bars), and mBSC1-F (grey bars). Uptake was assessed in the absence and presence of 10^{-6} M bumetanide, and the mean value of the bumetanide groups was subtracted in the corresponding control group to show the bumetanide-sensitive portion of the uptake. Oocytes were exposed to uptake media with osmolarities of 160, 210, or 260 mosmol/kg. * indicates $p < 0.05$ versus the uptake in isotonicity; ∇ indicates $p < 0.01$ versus all other groups in 160 mosmol/kg. Each point represents the mean \pm S.E. of 40 oocytes from two different frogs.

were performed in solutions containing 96 mM NaCl and 10 mM KCl with pH values of 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0. Bumetanide was used at 5×10^{-7} M. As shown in Fig. 8A, $^{86}\text{Rb}^+$ uptake was

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

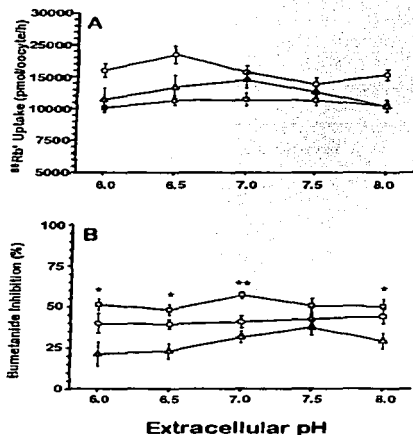


Fig. 3. Effect of extracellular pH upon the function and bumetanide sensitivity of mBSC1-A (circles), mBSC1-B (squares), and mBSC1-F (triangles). Panel A, ⁸⁶Rb⁺ uptake in control conditions. Panel B, percentage of inhibition by 5×10^{-7} M bumetanide. * indicates $p < 0.05$ mBSC1-F versus mBSC1-A or mBSC1-B. Each point represents the mean \pm S.E. of 15 oocytes.

similar from 6.0 to 8.0 for each isoform. Thus, we observed no difference in the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter activity at different pH values. Also, as shown in Fig. 5B, no significant difference was observed in the degree of bumetanide inhibition of each isoform at pH from 6.0 to 8.0. Note, however, that at most of the studied pH values, the degree of inhibition by 5×10^{-7} M bumetanide was significantly lower in mBSC1-F isoform, except when uptake was performed at 7.5, suggesting that lower or higher pH magnified the difference in bumetanide sensitivity among mBSC1 isoforms, making mBSC1-B and mBSC1-A more sensitive to the effect of loop diuretics than mBSC1-F.

Effect of Inhibitors and Mercury.—The electroneutral cation-coupled chloride cotransporters are defined in part by their sensitivity to several diuretics and inhibitors. For instance, thiazide-type diuretics are specific inhibitors of the Na⁺:Cl⁻ cotransporter (3), and the alkaloid compound DIOA has been proposed as a specific inhibitor of the K⁺:Cl⁻ cotransporter (27). In addition, other drugs such as the stilbene compounds exhibit inhibitory properties upon Cl⁻ transporters, including the Cl⁻:HCO₃⁻ exchanger (28), the K⁺:Cl⁻ cotransporter (29), and the thiazide-sensitive cotransporter (5). Thus, we assessed the effect of metolazone, DIOA, or DIDDS upon ⁸⁶Rb⁺ uptake in mBSC1-F-injected oocytes. As shown in Fig. 9, the thiazide diuretic metolazone, the alkaloid DIOA, and the stilbene DIDS

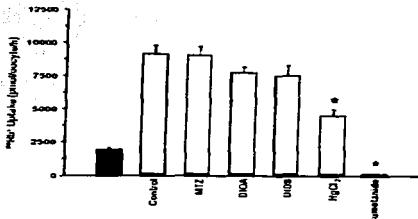


Fig. 9. ⁸⁶Rb⁺ uptake in mBSC1-F cRNA-injected *X. laevis* oocytes under control conditions or in the presence of 10^{-4} M metolazone (MZ), DIOA, DIDS, bumetanide, or $50 \mu\text{g HgCl}_2$, as stated. * indicates $p < 0.05$ versus control. Each point represents the mean \pm S.E. of 15 oocytes.

had no inhibitory properties upon the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter. As expected, a 10^{-4} M concentration of bumetanide resulted in complete inhibition of the cotransporter activity. In addition to the specific inhibitors, it is well known that many ion transporters are affected by exposure to HgCl₂. In the electroneutral cotransporter family, Mercado *et al.* (30) have shown that the *X. laevis* K⁺:Cl⁻ cotransporter in oocytes is activated by HgCl₂, whereas Jacoby *et al.* (31) found that the basolateral isoform of the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter is inhibited by HgCl₂, and we also have evidence that HgCl₂ reduces the function of the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter (32). As shown in Fig. 9, we also analyzed the effect of $50 \mu\text{M HgCl}_2$ upon the ⁸⁶Rb⁺ uptake induced by mBSC1-F. A significant inhibitory effect of HgCl₂ on the function of the apical Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter was observed. Then, to assess the effects of HgCl₂ on the three isoforms, *X. laevis* oocytes injected with mBSC1-A, mBSC1-B, or mBSC1-F cRNA, were exposed to increased concentrations of extracellular HgCl₂ from 1 to $75 \mu\text{M}$. Higher concentrations were not used because we have observed a dramatic increase in ⁸⁶Rb⁺ uptake in oocytes when HgCl₂ is used at $100 \mu\text{M}$ or above (30). As shown in Fig. 10, the transmembrane isoforms to HgCl₂ resulted in significant and dose-dependent inhibition of the cotransporter function. In addition, mBSC1-A and mBSC1-B exhibited a similar pattern of inhibition, whereas the percentage of reduction in the function of mBSC1-F was significantly lower than in the other isoforms.

DISCUSSION

The gene encoding for the apical Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter in mouse gives rise to six alternative isoforms that are expressed exclusively in the apical membrane of the TALH (9). On one hand, two isoforms are produced after truncation of the COOH-terminal domain. The longer isoform is made up of 1,095 amino acid residues, and the shorter isoform is made up of 792 residues. On the other hand, three isoforms are produced because of the existence of three 96-bp mutually exclusive cassette exons designated A, B, and F, which encode part of the transmembrane domain 2 and the connecting segment between transmembrane domains 2 and 3 (7). Because this splicing mechanism can be combined with the COOH-terminal domain splicing, then, six isoforms are produced: three with a long COOH-terminal domain and three with a short COOH-termi-

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

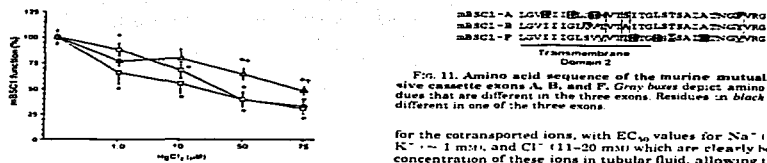


Fig. 10. Dose-dependent inhibition of mBSC1 isoforms by $HgCl_2$. *Cl*-sensitive oocytes injected with mBSC1-A (circles), mBSC1-B (squares), and mBSC1-F (triangles) cRNA were exposed to an increased concentration of extracellular $HgCl_2$ in the last 15 min before the uptake period. * indicates $p < 0.05$ versus the same point in mBSC1-A and mBSC1-B. Each point represents the mean \pm S.E. of 12 oocytes.

nal domain (1). We have shown that the three long COOH-terminal domain isoforms encode for the bumetanide-sensitive Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ cotransporter (11) and that the short isoforms exert a dominant-negative effect upon the Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ cotransporter which can be abrogated by cAMP (11). In addition, we have also demonstrated that the shorter isoforms work as hypotensionally activated, bumetanide-sensitive, K^+ -independent, Na^+ - Cl^- cotransporter, which is inhibited by activation of protein kinase A with cAMP (12).

In the present study we have established the major properties of the three long isoforms A, B, and F of the murine apical Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ cotransporter. The long isoforms mBSC1-A and mBSC1-B exhibit transport kinetic properties for Na^+ , K^+ , and Cl^- which are similar between each other but different from the transport kinetic properties observed in the long isoform mBSC1-F. Our data show that the last isoform possesses the lowest affinity for the cotransported ions. In addition, although surface expression of the three isoforms in the oocytes plasma membrane is similar (Fig. 2), $^{86}Rb^+$ uptake was significantly higher in mBSC1-A injected oocytes than in mBSC1-B oocytes, were pooled together (Fig. 1), suggesting that this isoform could have a higher transport capacity. Taking all of these data together, we propose that mBSC1-A is the high affinity, high capacity transporter, mBSC1-B is the high affinity, low capacity isoform, and mBSC1-F is the low affinity, low capacity isoform. These transport kinetics properties are in accordance with the localization of the isoforms along the TALH. It has been shown that mTALH possesses a higher capacity for Na^+ Cl $^-$ transport than cTALH, but cTALH possesses a higher capacity for ion dilution (13-15). At the beginning of the TALH, ion concentrations in the tubular fluid that comes from the inner medulla are very high; but as TALH reaches the cortex, the concentration of ions is reduced because of the combination of intense salt reabsorption and low water permeability. In fact, at the end of the cTALH the tubular fluid is more diluted than plasma. Accordingly, the mBSC1-A isoform, which exhibits the higher capacity of transport, is present in the inner TALH with higher expression levels in the outer medulla. In addition, mBSC1-F, the isoform with the lower affinity for the cotransported ions, has been localized only in the mTALH, with predominant expression at the inner stripe of the outer medulla where ion concentration is very high (7, 21). Thus, the higher capacity of transport in mTALH can be the result of the higher expression of the mBSC1-A cotransporter. In contrast, in cTALH mBSC1-B is the predominant isoform with lower expression of mBSC1-A. These two isoforms exhibit high affinity

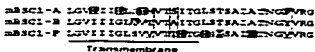


Fig. 11. Amino acid sequence of the murine mutually exclusive cassette exons A, B, and F. Grey boxes depict amino acid residues that are different in the three exons. Residues in black boxes are different in one of the three exons.

for the cotransported ions, with EC_{50} values for Na^+ (~3 mM), K^+ (~1 mM), and Cl^- (~11-20 mM) which are clearly below the concentration of these ions in tubular fluid, allowing the reabsorption of salt to take place, even when tubular fluid is more diluted than plasma. Thus the expression of the high affinity isoforms mBSC1-B and mBSC1-F is not the result of the reason behind the greater dilution power of cTALH compared with mTALH. Isenberg *et al.* (33-35) performed a series of chimeric clones and point mutations between the human and shark basolateral isoform of the Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ cotransporter, known as NKCC1 or BSC2, and concluded that the transmembrane domains important to define kinetic properties are domains 2 and 4 for Na^+ affinity; 2, 4, and 7 for K^+ affinity; and only 4 and 7 for Cl^- affinity. Here we show that mutually exclusive cassette exons A, B, and F in mBSC1 are critical for defining the affinity for the three cotransported ions. We cannot verify the role of other membrane spanning domains in ion affinities because, with exception of the exon cassettes, the rest of the mBSC1 isoforms are identical. However, the fact that the difference among mBSC1-A, mBSC1-B, and mBSC1-F is the exon cassette indicates that in the apical Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ cotransporter, this is the region that defines differences in affinities for Na^+ , K^+ , as well as for Cl^- .

We observed some correlation between the affinity for ions and for bumetanide. mBSC1-F exhibits the lower affinity for ions and also for bumetanide, whereas mBSC1-B behaves as bumetanide sensitive with higher affinity for bumetanide than anide. In this regard, Isenberg and Forbush 35 showed that affinity for Na^+ , K^+ , Cl^- and bumetanide of the human basolateral Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ cotransporter is higher than the shark ortholog made a similar observation for the rat bumetanide-sensitive Na^+ - Cl^- cotransporter; the rat cotransporter exhibits higher affinity for Na^+ , Cl^- , and also for thiazides, than the winter flounder urinary bladder ortholog (23, 37), indicating that oocytes of the electrogenic cotransporter family, the higher affinity for the cotransported ions is accompanied by higher affinity for inhibitors. These observations support the hypothesis that inhibition of the cotransporter activity by bumetanide probably involves competence between ions (particularly Cl^-) and the loop diuretic for the same site on the protein (38).

In the present study we observed a significant difference in the response to changes in cell volume by mBSC1 isoforms. When oocytes were exposed to variations in extracellular molarity, the change in mBSC1 function was different among the three isoforms. During cell swelling, the decrease in cotransporter function was 54% in mBSC1-F, 43% in mBSC1-B, and 24% in mBSC1-A. In contrast, during cell shrinkage, the increase in cotransporter activity was 24, 9, and 13%, respectively. Thus mBSC1-F is the isoform with the highest sensitivity to changes in cell volume. We also observed that endogenous Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ cotransporter activity was not sensitive to changes in cell volume because the function of this cotransporter was inhibited by 95% during cell swelling and activated by 44% in hypertonicity. The reduction in cotransporter activity in our experiments was observed by changing the normal osmolarity for oocytes from ~210 to 160 mOsm/kg, i.e. about 25% change.

Functional Characterization of mBSC1 Isoforms

This osmolality (160 mosmol/kg) is unlikely to be present in mammalian renal medulla. However, similar and even higher percentages of reduction in renal medulla osmolality can occur as a consequence of water loading. Under these conditions, the interstitial NaCl and urea concentrations drop rapidly and renal medulla tonicity is reduced; however, because of the high contents of osmolytes, such as betaine, inositol, or sorbitol within the mTALH cells, when extracellular osmolality is reduced, cells take up water and swell (9). Along the TALH, this phenomenon occurs with more intensity in the inner stripe of the outer medulla, where the mBSC1-F isoform is mainly expressed. Thus, our observation of mBSC1-F as the isoform with the higher sensitivity for changes in cell volume agrees with its proposed localization. The present study, however, does not elucidate the mechanisms by which hypotonicity reduces the function of the mBSC1 isoforms to a different extent.

During the first half of the 20th century, mercurials were used as the first potent diuretic agents (39); they were later discontinued because of their high toxicity and the tendency toward tachyphylaxis, in addition to the concomitant development of better diuretic agents such as loop diuretics and thiazides. The site of action in the nephron was localized at the thick ascending limb and distal nephron, where mercury inhibited net Cl⁻ reabsorption (40). However, the mechanism of action was never determined. We have observed recently that mercury reduces the function of both the rat and the fowling thiazide-sensitive Na⁺/Cl⁻ cotransporter (32). In addition, Jacoby et al. (31) have shown that the basolateral isoform of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter can also be inhibited by mercury. In the present study we show that exposure of *Xenopus* oocytes to HgCl₂ few minutes before the beginning of the uptake period resulted in a significant and dose-dependent reduction of mBSC1 activity. Thus, the diuretic effect of mercury could be caused by direct inhibition of both the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ and the Na⁺/Cl⁻ cotransporters located at the apical membrane of the TALH and the distal tubule, respectively.

Depicted in Fig. 11 are the amino acid sequences of the mutually exclusive cassette exons from mouse kidney (7, 9). Although the exons expand 31 amino acid residues, differences among isoforms are small. There are only three amino acid residues that are completely different: in the three isoforms. In addition to these three residues, some amino acids are different in one isoform compared with the other two. For instance, the leucine, isoleucine, methionine, and cysteine marked on mBSC1-F are different in mBSC1-A and mBSC1-B, but these residues are identical in isoforms A and B, suggesting that these four amino acid residues could be involved in functional differences between mBSC1-A and mBSC-B with mBSC1-F isoforms. Particularly interesting is the presence of one methionine and cysteine in mBSC1-F which could confer different tertiary structure to this isoform.

In summary, our data revealed significant kinetic, pharmacological, and regulatory differences among the isoforms A, B, and F of the mouse Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. Because the only structural variation among these three isoforms is the mutually exclusive cassette exon, some amino acid residues within these exons must be responsible for the observed differences in functional properties. Further studies will be neces-

sary to elucidate the role of each different amino acid residue of the exon cassettes upon the functional properties of mBSC1 isoforms shown in the present study.

Acknowledgments—We are grateful to members of the Molecular Physiology Unit for suggestions and assistance.

REFERENCES

- Gamba G (1999) *Kidney Int* 56:1604-1622
- Liou SH, Tsai H, Hsu H, Du P, Pao A, Sanjad S A, and Lifson R P (1994) *Nat Genet* 12:183-184
- Takahashi D, R Gomez R A, Igarashi F, C Gitelman H J, and Smitides G (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5424-5429
- Hofert S C (1992) in *Handbook of Physiology: Renal Physiology*, Windhager, P, ed. Oxford University Press, New York
- Gamba G, Nivarantha A, Lombardi A, Lytton J, Lee W S, Hediger M A, and Heerssen G S (1994) *Biol Biophys* 71:713-717
- Payne J A, and Forbush III B (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1341
- Igarashi F, Vander Heuvel G B, Payne J A, and Forbush III B (1995) *Am J Physiol Renal Physiol* 269:F406-F414
- Gamba G (2000) *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:526-540
- Mount D B, Backgaard A, Hall A E, Plata C, Xu J, Beerer D R, Gamba G, and Heerssen S C (1999) *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F347-F353
- Gamba G (2001) *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F781-F794
- Plata C, Mount D B, Rubio V, Hebert S C, and Gamba G (1999) *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F359-F366
- Plata C, Meade P, Hall A E, Walsh R C, Vazquez N, Hebert S C, and Gamba G (2001) *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F574-F582
- Burg M B (1982) *Kidney Int* 22:454-464
- Reich A A, and Ruckwaj P (1973) *J Clin Invest* 52: 612-623
- Rosava W B, Molony D A, and Androsch T E (1984) *Am J Physiol* 255: F1142-F1149
- Geyer R (1984) *Scand J Urol Nephrol Suppl* 14: 1-15
- Hochstadt A, and Sidel V (1969) *Physiol Arch* 407: 421-427
- Eveloff J, Bayreuther E, Silva P, and Kinne R (1981) *Physiol Arch* 388: 265
- Koenig S, Reapato S, and Kinne R (1983) *Physiol Arch* 390: 173-179
- Burman G, Karlson S J, and Jorgensen P L (1985) *Biochim Biophys Acta* 821: 491-495
- Yang T, Huang Y G, Singh T, Schermermann J, and Brugn J R (1996) *Am J Physiol* 271: F931-F939
- Dumont J N (1970) *J Morphol* 136: 153-160
- Gamba G, Lombardi A, Nivarantha M, Nivarantha A, Lytton J, Hediger M A, Brenner B M, and Heerssen S C (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 749-753
- Burchard E E, Kessler J, and Palfrey H C (1990) *Am J Physiol* 259: F300-F306
- Shelton R E, Schermermann B, Morrison A, and Kane R K H (1990) *Biochim Biophys Acta* 1023: 184-190
- Plata C, Meade P, Gamba G (2000) *Arch Med Res* 31: 21-27
- Garay R P, Nazzari C, Hannerer P, and Lee J J (1988) *Am J Physiol* 255: F300-F306
- Humphreys B D, Saez L, Chernova M N, and Alger S (1995) *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C200-C209
- Nivarantha A, Song L, Vaquer N, Hebert D B, and Gamba G (2000) *Biol Chem* 275: 30329-30331
- Nivarantha A, Hebert P, Vaquer N, Meade P, Mount D B, and Gamba G (2001) *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C570-C580
- Jacoby G, Muehler E, Camm L, Cheng H, and Hediger P (1999) *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C684-C692
- Vazquez N, Hebert S C, and Forbush III B (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 282, in press
- Hebert S C, Jacoby S C, and Forbush B III (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 282
- Hebert S P, Jacoby S C, Chang J, and Forbush B III (1996) *J Biol Chem* 271: 549-554
- Hebert S P, Jacoby S C, Payne J A, and Forbush B III (1998) *J Biol Chem* 273: 1817-1824
- Hebert S P, and Forbush B III (1997) *J Biol Chem* 272: 24556-24562
- Mount D B, Plata C, Meade P, and Gamba G (2000) *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F241-F249
- Hatai M, and McManus T J (1993) *Am J Physiol* 265: C235-C240
- Ekelund M (1997) in *Diuretic Agents: Clinical Physiology and Pharmacology*, Seliger D, and Giebisch C, eds pp 3-28, Academic Press, San Diego
- Kewell M (1997) in *Diuretic Agents: Clinical Physiology and Pharmacology*, Seliger D, and Giebisch C, eds pp 113-124, Academic Press, San Diego

TESIS CON
FAMILIA DE ORIGEN

Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of *Xenopus laevis* oocytes

ADRIANA MERCADO,¹ PAOLA DE LOS HEROS,¹ NORMA VÁZQUEZ,¹ PATRICIA MEADE,¹ DAVID B. MOUNT,² AND GERARDO GAMBA¹

¹Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalpala 14000, Mexico City, Mexico; and ²Division of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee 37232

Received 10 October 2000; accepted in final form 21 March 2001

Mercado, Adriana, Paola de los Heros, Norma Vázquez, Patricia Meade, David B. Mount, and Gerardo Gamba. Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C670-C680, 2001.—The K-Cl cotransporters (KCCs) have a broad range of physiological roles, in a number of cells and species. We report here that *Xenopus laevis* oocytes express a K-Cl cotransporter with significant functional and molecular similarity to mammalian KCCs. Under isotonic conditions, defoliated oocytes exhibit a Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake mechanism after activation by the cysteine-reactive compound *N*-ethylmaleimide (NEM) and mercuric chloride (HgCl₂). The activation of this K-Cl cotransporter by cell swelling is prevented by inhibition of protein phosphatase-1 with calyculin A; NEM activation of the transporter was not blocked by phosphatase inhibition. Kinetic characterization reveals apparent values for the Michaelis-Menten constant of 27.7 ± 3.0 and 15.4 ± 4.7 mM for Rb⁺ and Cl⁻, respectively, with an anion selectivity for K⁺ transport of Cl⁻ > PO₄³⁻ > Br⁻ > I⁻ > SCN⁻ > gluconate. The oocyte K-Cl cotransporter was sensitive to several inhibitors, including loop diuretics, with apparent half-maximal inhibition values of 200 and 600 μM for furosemide and bumetanide, respectively. A partial cDNA encoding the *Xenopus* K-Cl cotransporter was cloned from oocyte RNA; the corresponding transcript is widely expressed in *Xenopus* tissues. The predicted COOH-terminal protein fragment exhibited particular homology to the KCC1/KCC3 subgroup of the mammalian KCCs, and the functional characteristics are the most similar to those of KCC1 (Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB, and Gamba G. *J Biol Chem* 275: 30326-30334, 2000).

potassium-chloride cotransport; cell volume; cell swelling

THE ELECTRONEUTRAL COTransPORT OF K⁺ AND Cl⁻ is largely accomplished by parallel K⁺ and Cl⁻ channels or via the operation of K-Cl cotransporters. K-Cl cotransport was first defined in the red blood cell (10, 32), the tissue for which functional characterization is the most complete. Red blood cell K-Cl cotransport shares a number of functional properties with Na-K-2Cl cotransport, including electroneutral characteristics, a functional

dependence on the presence of each transported ion, and sensitivity to loop diuretics. However, these two transport mechanisms diverge significantly in several characteristics, in particular their response to cellular volume changes and to modulation of protein phosphorylation and dephosphorylation. The Na-K-2Cl cotransport is thus shrinkage activated and inhibited by protein phosphatases (45), whereas K-Cl cotransport is activated by cell swelling and completely abolished by inhibitors of serine/threonine protein phosphatases (10).

In addition to red blood cells, K-Cl cotransport has been detected in a variety of different tissues and cells, including neurons (48), epithelia (3, 17), myocardium (59), skeletal muscle (58), and vascular smooth muscle (2). Four mammalian K-Cl cotransporter isoforms were recently cloned and designated KCC1 (16), KCC2 (44), KCC3 (20, 40), and KCC4 (40).¹ K-Cl cotransport activity has also been demonstrated in several nonmammalian cells, including teleost erythrocytes and hepatocytes (5, 8, 18, 26), amphibian red blood cells (19), lobster neurons (56), and malpighian tubules from both *Drosophila melanogaster* (34) and the forest ant *Formica polytoma* (33). The physiological roles of K-Cl cotransport remain poorly understood. However, activation by cell swelling suggests a prominent role for KCCs in the regulatory volume decrease of cells exposed to hypotonic conditions or swollen by cellular insults such as ischemia. There is also evolving evidence for the participation of K-Cl cotransport in trans-epithelial salt transport and intracellular ion homeostasis (3, 17, 48, 56).

¹ We initially referred to the KCC on human chromosome 15q14 as KCC4 and the KCC on chromosome 5p15 as KCC3 (40). However, in reference to the earlier publication of Hiki et al. (20), we reversed the numbering of our GenBank/EBI submissions to refer to the KCC on chromosome 15q14 as KCC3 and the KCC on chromosome 5p15 as KCC4 (see NOTE ADDED IN PROOF in Ref. 40).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Address for reprint requests and other correspondence: G. Gamba, Molecular Physiology Unit, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpala 14000, Mexico City, Mexico (E-mail: gamba@conacyt.mx).

CHARACTERIZATION OF THE KCC IN *XENOPUS* OOCYTES

During the course of the cloning and characterization of electroneutral cation-chloride cotransporters (13, 14, 38–40, 46), we initially observed that oocytes from the frog *Xenopus laevis* do not contain thiazide-sensitive Na-Cl cotransport (14, 39) but do express an endogenous bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter that can be activated by hypertonic conditions (15) and inhibited by activation of protein kinase C (47). Suvaitavart et al. (54) and Shetler et al. (53) have reported similar findings. More recently we and others have obtained preliminary evidence that *Xenopus* oocytes also contain an endogenous K-Cl cotransporter (38, 40, 53). During reproduction frogs place their oocytes in hypotonic pond water, resulting in a large cellular swelling in the absence of a compensatory response. Although swelling-activated K-Cl cotransport has not been reported in oocytes, these cells are known to possess hypotonically activated Cl⁻ channels (1). Once the oocytes become fertilized eggs, they are particularly resistant to cell swelling, potentially because of conformational changes of the cytoskeleton that reduce the capacity of the cell to swell (28). A physiological response to hypotonicity has also been demonstrated in *X. laevis* spermatozoa, which remain immobile until the osmolality of the semen is diluted in pond water (21).

To begin to study the role of K-Cl cotransport in *X. laevis*, we initiated a molecular and functional study of the oocyte transporter. In addition, since *Xenopus* oocytes are used for the characterization of other KCCs, functional characterization was necessary to understand the regulation of the endogenous transporter and to minimize the misinterpretation of heterologous expression. We report here that *Xenopus* oocytes exhibit an endogenous K-Cl cotransporter that can be activated by hypotonicity. We also describe the major kinetic parameters of the cotransporter, as well as its inhibitory and regulatory profile. *Xenopus* oocytes also express mRNA encoding a K-Cl cotransporter protein with significant homology to the mammalian KCCs. This constitutes the first reported animal characterization of K-Cl cotransport in a nonmammalian, nonerythroid cell.

METHODS

Preparation of *Xenopus laevis* oocytes. Adult female normal and albino *X. laevis* frogs were purchased from Carolina Biological Supply (Burlington, NC) and maintained at the institution animal facility under constant control of room temperature and humidity at 16°C and 65%, respectively. Frogs were fed with frog brittle dry food from Carolina Biological Supply, and water was changed twice a week. Oocytes were surgically collected from anesthetized animals under 0.17% tricaine and incubated for 1 h with vigorous shaking in ND96 (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4) and 2 mg/ml of gentamicin after which oocytes were washed four times in ND96 and manually defolliculated. Stage V–VI oocytes (11) were incubated for 2–4 days in ND96 (19°C) supplemented with 2 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin. The incubation medium was changed every 24 h. The day of the influx experiment, oocytes were switched to a Cl⁻-free ND96

(in mM: 96 Na⁺ isethionate, 2 K⁺-gluconate, 1.8 Ca²⁺-gluconate, 1 Mg²⁺-gluconate, 5 HEPES, 2.5 sodium pyruvate, and 5 mg gentamicin, pH 7.4) for 2 h before the assay.

Assessment of K-Cl cotransporter function. Functional analysis of the K-Cl cotransporter consisted of measuring tracer ⁸⁶Rb⁺ uptake (New England Nuclear) in groups of at least 15 oocytes. ⁸⁶Rb⁺ uptake was measured under both isotonic and hypotonic conditions with the following general protocol: a 30-min incubation period in a hypotonic K⁺ and Na⁺ medium (in mM: 10 NaCl, 10 KCl, 0.5 NMDG-gluconate, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4), with 1 mM ouabain, followed by a 60-min uptake period in a hypotonic Na⁺-free and KCl-containing medium with variable K⁺ and Cl⁻ concentrations (in mM: 0.5 NMDG-Cl, 0–50 KCl, 0–10 NMDG-gluconate, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4), supplemented with 1 mM ouabain, and 2.5 μCi of ⁸⁶Rb⁺. Experiments in isotonic conditions were performed using the same solutions but supplemented with sucrose as 0.5 g/100 ml to increase the osmolality of the solutions to the isosmolar conditions for oocytes (~210 mosmol/kgH₂O). Ouabain was added to prevent ⁸⁶Rb⁺ uptake via the Na⁺-K⁺-ATPase. The absence of extracellular Na⁺ and the hypotonicity of the uptake medium prevented ⁸⁶Rb⁺ uptake or ⁸⁶Rb⁺-K⁺ exchange by the endogenous Na-K-Cl cotransporter that is present in oocytes (13). All uptake assays were performed at room temperature. At the end of the uptake period, oocytes were washed five times in ice-cold uptake solution without isotope to remove extracellular tracer. Oocytes were dissolved in 10% sodium dodecyl sulfate, and tracer activity was determined for each oocyte by beta scintillation counting.

To determine the ion transport kinetics of the K-Cl cotransporter we performed experiments using varying concentrations of K⁺ and Cl⁻. To maintain osmolality and ionic strength, gluconate was used as a Cl⁻ substitute and NMDG as a K⁺ substitute. The sensitivity and kinetics for several inhibitors were assessed by exposing groups of oocytes to inhibitor concentrations varying from 10⁻⁶ to 10⁻⁴ M. In these experiments, the desired concentration of the inhibitor was present during both the incubation and uptake periods. We also tested the effect of several drugs on the activation of the K-Cl cotransporter by adding the drug during 15 min before the uptake period.

RT-PCR amplification of KCCs. A BLAST search of the National Biotechnology Information Service sequence tag (EST) database revealed a 549-bp coding sequence (EST/GenBank accession no. AW646505) from *X. laevis* oocytes with significant homology to the mammalian KCCs, and we amplified this 549-bp coding region of cDNA using the following RT-PCR. *Xenopus* KCC oligonucleotide primers were designed using the EST sequence. The sense primer 5'-ACAG-TACTTCTGGGAGATACC-3' and antisense primer 5'-GATGATCAAGAGAAAGC-3' amplified a fragment of 628 bp. The amplified band spans a region of the KCC protein that is encoded by three exons in a *Drosophila* homologue (see GenBank accession no. AF0034462) and all four KCCs (D, E, M, and N) (unpublished data). Given the level of genomic conservation between this region of the KCC genes in mammals and *Drosophila*, a similar genomic structure is likely for this KCC gene in *X. laevis*, and thus the PCR primers used for the initial RT-PCR reaction will amplify a larger DNA fragment from contaminating genomic DNA, if at all. However, reverse transcription control samples were specifically amplified using denaturing genomic DNA was not amplified in the RT-PCR samples. To increase the specificity of the PCR amplification, nested PCR of the amplified band was performed with two

internal primers that amplify a band of 359 bp; the sense primer for nested PCR was 5'-ACGAGACGACGACTAAACAC-3' and the antisense primer was 5'-GGAAGGGCAAGAGATAAGC-3'. A second overlapping EST (GenBank accession no. BE576764) was subsequently identified, obtained from Research Genetics, and sequenced in entirety using fluorescent dye termination chemistry (BigDye, Applied Biosystems).

Total RNA was extracted from defolliculated oocytes and other tissues using the RNeasy lysis reagent and RNeasy spin column method (49). PCR was performed with 1 μ g of reverse-transcribed RNA in 20- μ l reactions containing 1 \times PCR buffer (in mM: 10 Tris-HCl, 1.5 MgCl₂, 50 KCl, pH 8.3), 0.1 mM of each dNTP, 10 mM of each primer, and one unit of Taq DNA polymerase (Life Technologies). Thirty-five PCR cycles were performed with the following profile: 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, and 1 min at 72°C. The last cycle was followed by a final extension step of 5 min at 72°C.

The PCR product from oocytes was gel purified from a 1.5% agarose gel and sequenced by the dideoxy chain termination method (50) using the Sequenase DNA sequencing kit (USB). Once the nature of the single PCR band from oocytes was confirmed by DNA sequencing as a *Xenopus* homologue of the mammalian KCC cotransporters (see RESULTS), Southern blot of all tissue PCR products was performed under high-stringency conditions using the 528-bp fragment to generate a nonradioactive probe by using the PCR DIG probe synthesis kit (Boehringer Mannheim, Germany). Hybridization bands were detected by an immunoperoxidase reaction.

Statistical analysis. Statistical significance is defined as two-tailed $P < 0.05$, and the results are presented as means \pm SE. The significance of the differences between groups was tested by one-way ANOVA with multiple comparison using Bonferroni correction or by the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks with the Dunn's method for multiple comparison procedures, as needed.

RESULTS

Expression of an endogenous K⁺Cl⁻ cotransporter in *Xenopus* oocytes. Figure 1 shows a summary from

seven experiments in which ⁸⁶Rb⁺ uptake was assessed using an uptake solution containing 2 mM and 50 mM of extracellular K⁺ and Cl⁻, respectively. Uptakes were performed under both isotonic conditions (220 mosmol/kgH₂O for *Xenopus* oocytes) and hypotonic conditions (110 mosmol/kgH₂O). Under isotonic conditions, oocytes exhibited a Rb⁺ uptake of 10.1 \pm 1.4 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹ that was reduced to 6.3 \pm 1.3 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹ when oocytes were incubated in Cl⁻-free medium. However, the difference did not reach significance. Under hypotonic conditions, Rb⁺ uptake in the presence of extracellular Cl⁻ increased to 52.5 \pm 11.0 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹ ($P < 0.00001$); the increased Rb⁺ uptake was Cl⁻-dependent, since uptake under hypotonic Cl⁻-free conditions was 5.22 \pm 1.0 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹ ($P < 0.001$). Therefore, oocytes exhibit a Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake mechanism that is activated by cell swelling (hypotonic conditions). A similar observation was made using oocytes harvested from the albino type of *X. laevis* (data not shown). In addition, Fig. 1, inset, shows the result of a single experiment in which ³⁶Cl⁻ uptake was assessed in the presence of 10 mM and 50 mM of extracellular K⁺ and Cl⁻, respectively. In isotonicity, ³⁶Cl⁻ uptake was similar in the presence or absence of extracellular K⁺ [908 \pm 124 vs. 912 \pm 346 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, $P =$ nonsignificant (NS)]. In contrast, incubation in hypotonicity induced an increase in ³⁶Cl⁻ uptake to 2,960 \pm 455 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹ ($P < 0.01$) that was partially but not significantly K⁺-dependent (1,615 \pm 296 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹, $P < 0.01$). Thus oocytes also exhibit a K⁺-dependent ³⁶Cl⁻ uptake mechanism that is only apparent during cell swelling.

K⁺Cl⁻ cotransport in several cells is uniquely activated by the N-alkylating agent N-ethylmaleimide (NEM) (32), whereas Na⁺K⁺Cl⁻ cotransport is inhibited by this agent (55). We therefore analyzed the effect of

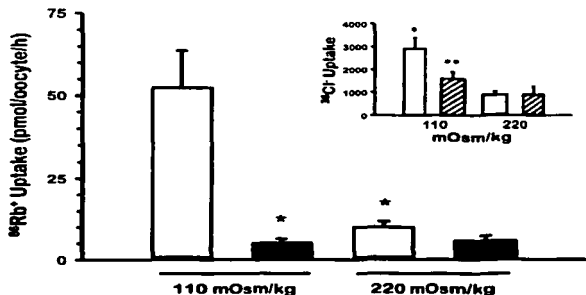


Fig. 1. K-Cl cotransporter activity in *Xenopus laevis* oocytes. ⁸⁶Rb⁺ uptakes were measured under hypotonic or isotonic conditions as indicated, in the presence of 2 mM K⁺ with (open bars) or without (filled bars) extracellular Cl⁻. Each bar represents mean \pm SE of 7 experiments from different frogs. *Significantly different from uptake in control group at 110 mosmol/kgH₂O ($P < 0.001$). Inset: A single experiment in which ³⁶Cl⁻ uptake was assessed in hypotonic or isotonic conditions, in the presence (open bars) or absence (filled bars) of 10 mM extracellular K⁺. For ³⁶Cl⁻ uptake experiment, oocytes were exposed to a 30-min repletion period in a hypotonic or isotonic K⁺ and Cl⁻-free medium, followed by 30-min uptake period in an isotonic or hypotonic Na⁺-free medium in the presence of 1 μ Ci/ml of H³⁶Cl⁻. * $P < 0.01$ vs. uptake in control group in 110 mosmol/kgH₂O. ** $P < 0.001$ vs. uptake in control group in 110 mosmol/kgH₂O.

CHARACTERIZATION OF THE KCC IN XENOPUS OOCYTES

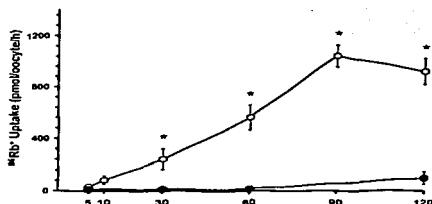
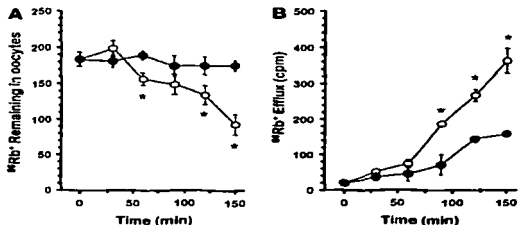


Fig. 2. Time course (in min) of $^{86}\text{Rb}^+$ influx in *X. laevis* oocytes. Oocytes were incubated for 30 min in K^+ and Cl^- -free hypotonic medium and then in a 50 mM K^+ -containing medium in the presence (○) or absence (●) of 50 mM Cl^- . Uptake periods are indicated. Each point represents mean \pm SE of 15 oocytes. * $P < 0.001$ vs. Cl^- -free group.

NEM upon $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in oocytes incubated in isotonic conditions. In the presence of 10 mM K^+ and 50 mM Cl^- , exposing oocytes to 1 mM NEM before the influx period increased the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake by ~ 2 -fold from 117 ± 6.3 pmol \cdot oocyte $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ in the control group to 227 ± 29 pmol \cdot oocyte $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ in the NEM-treated group ($P < 0.001$). The increased uptake induced by NEM was Cl^- dependent. In the absence of extracellular Cl^- , influx was similar between the control and NEM-treated oocytes (88 ± 7 vs. 60 ± 11 pmol \cdot oocyte $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$, $P = \text{NS}$). Therefore, under isotonic conditions, addition of NEM resulted in increased activity of the K-Cl cotransporter.

Figure 2 illustrates the time course of $^{86}\text{Rb}^+$ uptake when oocytes were exposed to a hypotonic uptake medium containing 10 mM of extracellular K^+ , in the presence or absence of 50 mM Cl^- . When Cl^- was present in the extracellular medium we observed increased $^{86}\text{Rb}^+$ uptake that was linear for 90 min. This uptake was due to the K-Cl cotransporter since no uptake was observed in the Cl^- -free uptake medium.



The K-Cl cotransporter is one of the efflux pathways that are activated by cell swelling, as part of the regulatory volume decrease (RVD) response. With this in mind, we also examined $^{86}\text{Rb}^+$ efflux when oocytes were exposed to hypotonicity (Fig. 3). Over a 150-min period we observed a progressive reduction in the amount of $^{86}\text{Rb}^+$ remaining in the cells, together with a gradual increase in the tracer Rb^+ in the extracellular medium. As shown in Fig. 3, A and B, the addition of the loop diuretic furosemide significantly reduced the efflux of $^{86}\text{Rb}^+$ from the cells, indicating the proportion of efflux that was through the K-Cl cotransporter.

Kinetics properties and anion dependence of the oocyte K-Cl cotransporter. Figure 4 shows the Rb^+ and Cl^- dependency of the K-Cl cotransporter in *Xenopus* oocytes. To assess the Rb^+ kinetics, uptakes were performed in extracellular media with fixed concentration of Cl^- at 50 mM, changing concentrations of Rb^+ from 0 to 50 mM. In contrast, to assess the Cl^- kinetics, uptakes were done with a fixed concentration of K^+ at 20 mM, changing the concentration of Cl^- from 0 to 50. As illustrated in Fig. 4, Rb^+ uptake showed Michaelis-Menten behavior. The calculated Michaelis-Menten constant (K_m) and maximal velocity (V_{max}) for extracellular Rb^+ concentration were 27.7 ± 3.0 mM and 1.531 ± 0.26 pmol \cdot oocyte $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$, respectively, and the apparent K_m and V_{max} values for extracellular Cl^- concentration were 15.4 ± 4.7 mM and 318 ± 39 pmol \cdot oocyte $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$, respectively. Consistent with electroneutrality of the transport process, the Hill coefficient for both ions remained close unity: 1.04 ± 0.17 and 1.07 ± 0.14 for K^+ and Cl^- , respectively.

It has been shown that some extracellular anions other than Cl^- can support ion translocation through the K-Cl cotransporter of sheep and human erythrocytes (43). It was thus of interest to study the anion series for the oocyte K-Cl cotransporter, assessed as the relative amount of $^{86}\text{Rb}^+$ influx in the presence of anions other than Cl^- . We observed no significant difference in tracer $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in the presence of Cl^- (129 ± 18 pmol \cdot oocyte $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$), PO_4^{3-} (130 ± 21

Fig. 3. $^{86}\text{Rb}^+$ efflux in *X. laevis* oocytes. A: single experiment showing time course of tracer Rb^+ remaining in oocytes (pmol/oocyte). B: mean of 3 experiments showing time course for appearance of $^{86}\text{Rb}^+$ in the extracellular medium (counts per min (cpm)). For these experiments, oocytes were incubated for 1 h in regular isotonic ND96 containing 5.0 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of $^{86}\text{Rb}^+$. At the end of this loading period, oocytes were washed 5 times and transferred to a hypotonic solution containing 10 mM 4 β -Vinylpyridine, 10 mM sucrose, 2 KCl, 1.8 CaCl $_2$, 1 MgCl $_2$, 6.0 HEPES, and 1 ouabain, without extracellular $^{86}\text{Rb}^+$, in the absence (○) or presence (●) of 2 mM extracellular furosemide. * $P < 0.01$ vs. same time point in presence of furosemide. In A each point represents mean \pm SE of 15 oocytes. In B each point represents mean \pm SE of 3 experiments.

CHARACTERIZATION OF THE KCC IN XENOPUS OOCYTES

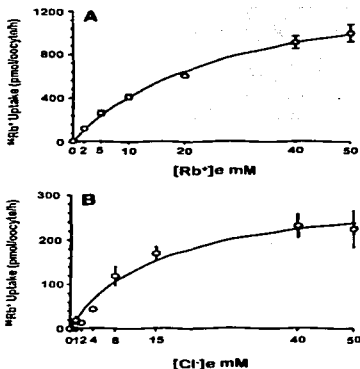


Fig. 4. Kinetic analysis of Rb⁺ uptake in *Xenopus* oocytes. **A:** Rb⁺ dependency of Rb⁺ uptake. Uptakes were performed over a 60-min period in 110 mosmol/kg H₂O with a fixed concentration of Cl⁻ at 50 mM, changing extracellular concentration of Rb⁺ (Rb⁺)_o from 0 to 50 mM. **B:** Cl⁻ dependency of Rb⁺ uptake. Uptakes were performed over a 60-min period in 110 mosmol/kg H₂O with a fixed concentration of Rb⁺ at 20 mM and changing extracellular concentration of Cl⁻ ([Cl⁻]_e) from 0 to 50 mM. For data on **A**, uptakes were also measured in groups of oocytes in the absence of Cl⁻ (data not shown), and the mean values for these groups were subtracted in corresponding RbCl-containing groups to analyze only the Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake. For data on **B**, the uptake observed in a solution containing 20 mM K⁺ and 0 mM Cl⁻ was subtracted from uptakes in all other groups. Lines were fit using the Michaelis-Menten equation. The Hill coefficients for K⁺ and Cl⁻ were close to unity: 1.04 ± 0.16 and 1.07 ± 0.14 for K⁺ and Cl⁻, respectively. Each point represents the mean ± SE of 15 oocytes.

pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹), or Br⁻ (101 ± 16 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹), whereas a significant reduction ($P < 0.001$) was observed in the presence of I⁻ (67 ± 15 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹), SCN⁻ (44 ± 12 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹), and gluconate (25 ± 5 pmol-oocyte⁻¹·h⁻¹). The function profile in the presence of different anions of the oocyte transporter was thus Cl⁻ = PO₄³⁻ = Br⁻ > I⁻ > SCN⁻ > gluconate.

Sensitivity to inhibitors. Figure 5 illustrates the effect of a 100 μM concentration of several inhibitors of cation-chloride cotransporters on the oocyte K-Cl cotransporter. At a 100 μM concentration, DIDS had no effect on ⁸⁶Rb⁺ uptake, whereas the mammalian KCCs are sensitive to DIDS at this concentration (32, 33, 42). The addition of a 100 μM concentration of the loop diuretic furosemide or bumetanide to the uptake medium resulted in a 22 and 20% reduction in the Cl⁻-dependent tracer Rb⁺ uptake, respectively, compared

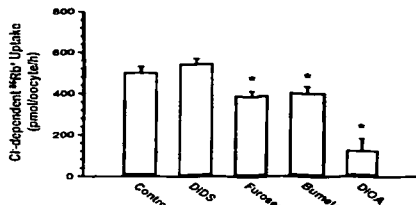


Fig. 5. Effect of transport inhibitors on Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake. Uptakes were assessed in 10 mM K⁺ and 50 mM Cl⁻-hypotonic medium. In the Cl⁻-free group gluconate was used as substitute. The concentration of all inhibitors was 100 μM. * $P < 0.05$ vs. uptake in control conditions (1st bar). Each bar represents mean ± SE of 15 oocytes.

with uptake observed in control group. The reduction was statistically significant ($P < 0.001$). In contrast, a 100 μM concentration of (dihydroindendyl)oxylalkanoic acid (DIOA) reduced the uptake by 76% ($P < 0.000001$). Thus the oocyte K-Cl cotransporter is more sensitive to DIOA than to loop diuretics, as is the case for the mammalian isoforms (38). Figure 6 shows the concentration-dependent inhibition of the oocyte K-Cl cotransporter by loop diuretics. The IC₅₀ values for furosemide and bumetanide were calculated at 200 and 500 μM, respectively. Although the four mammalian KCCs differ in relative sensitivity to the two loop

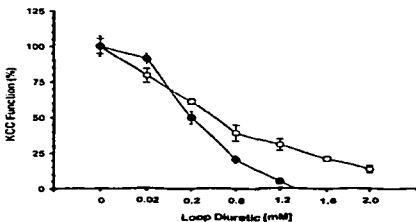


Fig. 6. Kinetic analyses of K-Cl cotransporter (KCC) inhibition by loop diuretics. Uptakes were assessed in hypotonic medium. Groups of 10 *Xenopus* oocytes were exposed to increasing concentrations of furosemide (●) or bumetanide (○) in the preincubation and uptake medium, from 20 to 2,000 μM. Data were normalized as the percentage of uptake, taking 100% as the value in the absence of loop diuretics. The calculated IC₅₀ was 200 μM and 500 μM for furosemide and bumetanide, respectively. Each point represents the mean ± SE of 15 oocytes.

diuretics, bumetanide is always less effective than furosemide, as is the case for the oocyte K-Cl cotransporter.

Regulation of the oocyte K-Cl cotransporter. In red blood cells of several species, swelling-induced activation of K-Cl cotransport appears to involve a protein dephosphorylation step, presumably of the transporter protein itself (10). With this in mind, we assessed the functional effect of inhibiting the protein phosphatases. To discriminate between phosphatases, we used 100 nM of calyculin A, which inhibits the function of both protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A), 1 nM of okadaic acid, a concentration that inhibits only PP2A (4), and 100 pM cypermethrin, which inhibits the function of protein phosphatase 2B (PP2B) (12). As Fig. 7 shows, the increased $^{86}\text{Rb}^+$ uptake induced by hypotonicity was completely abrogated by calyculin A. In contrast, no effect was observed with okadaic acid and cypermethrin.

Many ion transporters are dramatically affected by exposure to Hg^{2+} (22, 36, 57). For example, orthologues of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl cotransporter exhibit variable inhibition by mercury (22), whereas other proteins such as aquaporin-6 are activated by Hg^{2+} (60). We thus analyzed the effect of Hg^{2+} on the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake of *Xenopus* oocytes. As Fig. 8 shows, oocyte incubation in the presence of 150 μM HgCl_2 under isotonic conditions for the 15 min period to the influx period resulted in a dramatic increase in $^{86}\text{Rb}^+$ uptake. We used this HgCl_2 concentration since this was the dose at which maximal response was observed. This increase was completely prevented by pretreatment of oocytes with 10 mM of the reducing agent dithiothreitol (DTT) (22). The incubation of oocytes with and without extracellular Cl^- during uptake

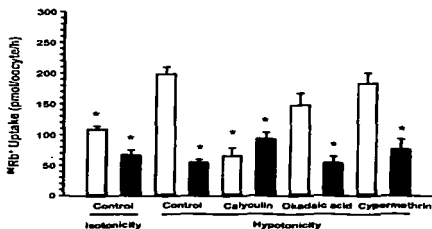


Fig. 7. Effect of protein phosphatase inhibition upon the hypotonicity-induced activation of the K-Cl cotransporter in *Xenopus* oocytes. Influxes were performed under isotonic or hypotonic conditions, exposing oocytes to calyculin A, okadaic acid, or cypermethrin during preincubation and uptake periods as stated. Uptakes were assessed in 10 mM K^+ -containing medium in the presence (open bars) and absence (filled bars) of extracellular Cl^- . * $P < 0.001$ vs. uptake in control conditions in hypotonicity.

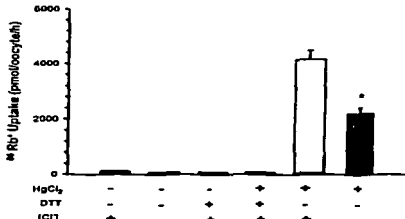


Fig. 8. Effect of 150 μM HgCl_2 and 10 mM dithiothreitol (DTT) on $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in *Xenopus* oocytes. Cells were incubated in isotonic conditions during the uptake. Before the uptake period, oocytes were exposed to 30 min of DTT alone, 15 min of HgCl_2 alone, or 30 min of DTT plus HgCl_2 in the last 15 min; HgCl_2 or DTT was not present during the uptake period. As indicated, uptakes were performed in the presence or absence of extracellular Cl^- . Each point represents the mean \pm SE of 30 oocytes. * $P < 0.001$ vs. HgCl_2 control group.

revealed that HgCl_2 -induced increase in $^{86}\text{Rb}^+$ uptake is composed of at least two distinct pathways, each accounting for ~50% of the total uptake. One pathway is Cl^- dependent, consistent with K-Cl cotransport, whereas the other is Cl^- independent, suggesting the opening of a cation channel.

Xenopus oocytes express a homologue of the mammalian KCCs. A BLAST search of EST databases revealed the existence of one *X. laevis* EST (accession no. AW646505) from oocytes that was homologous to KCC sequences, exhibiting 76% identity to the rat KCC1 sequence. On the basis of this *Xenopus* EST, we designed a primer pair to amplify a fragment of 528 bp (see Materials). A single band of the expected size was amplified whereas no band was observed in the absence of reverse transcription (data not shown). A second primer pair was used for nested PCR-amplifying of 349 bp using the first band as a template. In addition, the 528-bp PCR band was gel purified and the DNA sequence was confirmed. A second overlapping EST was subsequently identified, obtained from Research Genetics, and sequenced in entirety; the composite cDNA (accession no. AF235505) encodes the COOH-terminal 358 amino acids of the *Xenopus* KCC and the entire 3'-untranslated region. Figure 9 shows the alignment of the deduced amino acid sequence of each of the mammalian KCC cDNAs with the partial sequence of the *Xenopus* KCC; this COOH-terminal fragment exhibits 68% identity with rat KCC1 (accession no. U55815), 56% with rat KCC2 (accession no. U55816), 76% with human KCC3 (accession no. AF105366), and 62% with mouse KCC4 (accession no. AF087436). We also performed RT-PCR and Southern blot analysis of RT-PCR products obtained from several tissues, using the 528-bp product from oocytes as a nonradioactive probe. Figure 10A shows the amplifica-

CHARACTERIZATION OF THE KCC IN XENOPUS OOCYTES

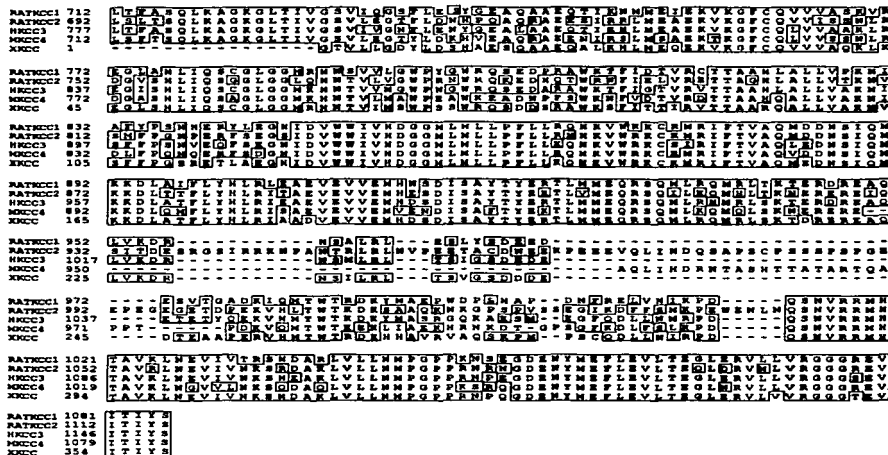


Fig. 9. Protein alignments of the mammalian K-Cl cotransporters KCC1 to KCC4, with the deduced amino acid sequence of the *Xenopus* oocyte K-Cl cotransporter (XKCC). The fragment corresponds to a part of the extracytoplasmic terminus, which is predicted to be cytoplasmic. Identical segments are boxed. HKCC3, human KCC3; MKCC4, mouse KCC4.

tion of a ~528-bp product from all tested tissues. Control PCR reactions in the absence of reverse transcriptase were negative for all tissues (data not shown, except for oocytes mRNA in last lane of Fig. 10A), indicating that the amplified product was not due to contamination with genomic DNA. In addition, Fig. 10B shows that the PCR product obtained from all tissues was able to hybridize with the KCC-specific probe on a Southern blot of an agarose gel.

DISCUSSION

In the present study we have defined the principal functional, pharmacological, and regulatory properties of the K-Cl cotransport pathway that is expressed in *X. laevis* oocytes. Under isotonic conditions, some individual experiments (e.g., Fig. 7) showed a small but significant Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake. This is potentially due to weak volume-independent activation of the K-Cl cotransporter; however, experimental variability at this low level of transport may also play a role. In addition, this is theoretically due to activity of

the oocyte Na-K-2Cl cotransporter, since Lytle et al. (35) have proposed that in the absence of external Na, as was the case in our experiments, the Na-K-2Cl cotransporter can potentially catalyze Cl⁻-dependent K/Rb exchange. Regardless, when data from multiple experiments are analyzed (Fig. 1), the difference between isotonic Rb⁺ uptake in the presence and absence of Cl⁻ does not reach statistical significance. Under hypotonic conditions, oocytes exhibited a very significant Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake. In these circumstances that are particularly unlikely that ⁸⁶Rb⁺ transport activity in the absence of Na⁺ was due to the Na-K-2Cl cotransporter, because this cotransporter in oocytes is inhibited by hypotonicity (13). In addition, oocytes exhibit a K⁺-dependent ³⁶Cl⁻ uptake pathway that is activated by hypotonicity. The Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake in oocytes exhibited the following characteristics: J) transport can be activated by cell swelling and to a lesser extent by NEM, which are the classic activators of K-Cl cotransport in several cell types and species (32); 2) the transport of K⁺ and Cl⁻ exhibits

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

77-35

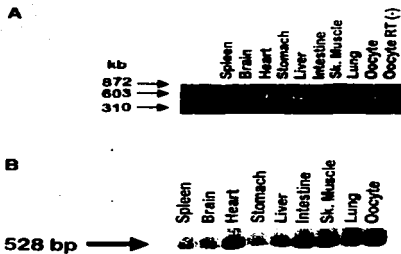


Fig. 10. A: an acrylamide gel of RT-PCR products from several *Xenopus* tissues, using a KCC-specific primer (our team) to amplify a 528-bp fragment. The last lane shows the control PCR from oocyte RNA in the absence of reverse transcriptase (RT-). B: Southern blot analysis of RT-PCR products obtained from total RNA extracted from several *X. laevis* tissues. Membranes were probed under high-stringency conditions with a probe constructed from the 528-bp fragment of the *Xenopus* K-Cl cotransporter.

interdependency and electroneutrality, with Hill coefficients of 1, 3) the K-Cl cotransporter is sensitive to loop diuretics, with higher affinity for furosemide over bumetanide, a common feature of the K-Cl cotransporters (16, 44); 4) it is also sensitive to the specific K-Cl inhibitor DIOA (15); and 5) activation by hypotonicity can be prevented by the protein phosphatase inhibitor calyculin A. At the molecular level, we have identified a partial cDNA clone that encodes a protein with a high degree of identity (>75%) with mammalian KCC sequences. Although we show no direct evidence that this gene is responsible for the Cl⁻-dependent ⁸⁶Rb⁺ uptake observed in this study, our data clearly indicate that *Xenopus* oocytes express a K-Cl cotransporter that shares functional and molecular properties with the mammalian KCCs.

To be fertilized, the *Xenopus* female lays the oocytes into pond water of very low osmolality. Because of still not very well understood mechanisms that include conformational changes of the cytoskeleton, when oocytes become fertilized eggs they develop a complete resistance to cell swelling. Kelly et al. (28) showed that frog fertilized eggs transported to dilute buffer with osmolality of 10 mosmol/kgH₂O for several hours developed no changes in cell volume, whereas oocytes exhibit a slow increase in cell volume over time and eventually burst. Since it was shown in the same study that oocytes do not develop a clear RVD response, the authors suggested that in oocytes exposed to dilute buffer osmolyte efflux occurs and limits swelling. Thus oocytes clearly possess the transport mechanisms to release intracellular ions to reduce cell swelling while

they become fertilized eggs, since they express a swelling-activated K-Cl cotransporter that is capable of K-Cl efflux (Fig. 3).

Kinetic analysis of the ⁸⁶Rb⁺ uptake in swollen oocytes showed that both K⁺ and Cl⁻ are required. The Hill coefficients for both ions were close to unity, indicating an electroneutral transport process with a stoichiometry of 1:1. The affinity for extracellular ions revealed an apparent K_m for extracellular K⁺ of ~22 mM and for extracellular Cl⁻ of ~15 mM. These values are similar to those of the mammalian KCC1 isoform (38). Whereas all of the KCC isoforms studied thus far exhibit similar affinity for extracellular Cl⁻ (14 to 17 mM), they differ dramatically in the affinity for extracellular K⁺. The isoform with the highest K⁺ affinity is rat KCC2, with a K_m for extracellular K⁺ of ~5 mM (42), followed by KCC4 (K_m of ~17 mM) (38), KCC1 (K_m of ~25 mM) (38), and KCC3 (K_m of ~61 mM) (37). Although the direction of transport is ultimately dictated by gradients for the transported ions, it has been proposed that KCCs with a higher cation affinity (KCC2 and KCC4) can transport K⁺ in both directions at higher rates. This has been verified experimentally in neurons, which predominantly express KCC2 (23). In contrast, isoforms with lower K⁺ affinity (KCC1 and KCC3) are more suited to function as extrusion mechanisms, where the gradient for K⁺ will favor efflux (42).

Despite the lack of variation in Cl⁻ affinity, K-Cl cotransporters differ in the anion series of rubidium transport, i.e., the relative activity in the presence of anions other than Cl⁻ (37). The *Xenopus* transporter is similar in this respect, in that anions other than Cl⁻ could also support K⁺ translocation. In fact, the anion series of the endogenous oocyte K-Cl cotransporter is very similar to the anion series observed in KCC1-injected oocytes (38).

As shown for K-Cl cotransport in other species, the *Xenopus* transporter is sensitive to loop diuretics and other inhibitors of anion transport (16, 20, 42). In addition, ⁸⁶Rb⁺ uptake was also sensitive to DIOA, which appears to be a specific inhibitor of K-Cl cotransport (15); this compound has no effect on the oocyte Na-K-2Cl cotransporter (data not shown).

Inhibition of protein phosphatases prevents the swelling- and NEM-induced activation of the K-Cl cotransporter in several cells (6, 25, 27, 29, 52) and it is widely accepted that dephosphorylation is required for activation of the cotransporter. Consistent with the data from other cells, we observed in the present study that the protein phosphatase inhibitor calyculin A abolishes hypotonic activation of the oocyte cotransporter. Calyculin inhibits two types of phosphatase, both PP1 and PP2A (9). To determine which phosphatase involved, we tested the effect of okadaic acid, which is a specific PP2A inhibitor at the 1 nM concentration used, and the specific PP2B inhibitor cycpermethrin (4, 12); neither inhibitor affected the action of the cotransporter by hypotonicity. Therefore, it is likely that in *Xenopus* oocytes, PP1 is the

phosphatase involved in activation of the K-Cl cotransporter during cell swelling (6, 25).

Several cotransporters are known to be affected by exposure to mercury (Hg^{2+}). For example, transport by the NaSi cotransporter (36) and the NaPi-3 cotransporters in *Xenopus* oocytes is significantly reduced when oocytes are exposed to Hg^{2+} (57). Similarly, heterologous expression of the basolateral isoform of the Na-K-Cl cotransporter in HEK-293 cells is sensitive to Hg^{2+} (22). In contrast, when expressed in *Xenopus* oocytes, aquaporin-6 is activated by this heavy metal (60). It is known that Hg^{2+} affects the function of channels and transporters by interacting with sulfhydryl groups (-SH) on cysteine residues (7, 60), and in some cases this has been proven by mutagenesis studies (30, 41). In the present study we observed that exposing *Xenopus* oocytes to 150 μM $HgCl_2$ resulted in increased $^{86}Rb^+$ uptake by activation of at least two pathways: one that is Cl^- dependent and another that is Cl^- independent. Because uptakes were performed in the absence of extracellular Na^+ , it is unlikely that the opening of this Cl^- -dependent $^{86}Rb^+$ influx pathway represents activity of the Na-K-2Cl cotransporter. In addition, Jacoby et al. (22) have shown that Na-K-2Cl cotransporter is inhibited by Hg^{2+} . Therefore, the Cl^- -dependent fraction of the Hg^{2+} -induced increase in $^{86}Rb^+$ uptake is due to activation of K-Cl cotransport. The mechanism by which Hg^{2+} affects the function of membrane proteins is not clear, but it is known that Hg^{2+} interacts with cysteinyl sulfhydryls (-SH) (25) in observation that the effect of Hg^{2+} on $^{86}Rb^+$ influx in oocytes was completely prevented by the reducing agent DTT suggests that, indeed, interaction of Hg^{2+} with SH groups is necessary for the stimulatory effect. Of interest, although it has been suggested that NEM also affects the K-Cl cotransporter function by interaction with SH groups, the stimulatory effect of NEM upon the K-Cl cotransporter observed in this study (Fig. 2) was significantly smaller than the effect of Hg^{2+} . It is still unclear, however, if the activating effect of NEM on the cotransporter is related to NEM-induced dephosphorylation or direct modification of SH groups. There are reports supporting both possibilities (24, 31).

Finally, we have confirmed the expression of a KCC isoform in *Xenopus* oocytes and multiple other tissues. Sequence data from a cDNA clone related to NEM1 was a partial cDNA by RT-PCR, which overlapped with another fully sequenced EST cDNA. The predicted protein sequence of this partial cDNA was more homologous to the KCC1-KCC3 subfamily than to the KCC2-KCC4 subfamily of the K-Cl cotransporters. Cloning of the full-length cDNA will be pursued, since this will provide the means for structure-function studies of this KCC and for characterization of the physiological role(s) of this transporter in *Xenopus* tissues.

In summary, we have shown that *X. laevis* oocytes express a K-Cl cotransporter in the plasma membrane that is activated by cell swelling, NEM, and $HgCl_2$ and inhibited by loop diuretics and DIOA. The functional

properties resemble those of mammalian KCC1, and the sequence of the COOH Terminus is closest to KCC3, indicating that this *Xenopus* KCC is the amphibian orthologue of one or both of these low-affinity K-Cl cotransporters.

We are grateful to J. Lopes for help with frog care and to members of the Molecular Physiology Unit for suggestions and stimulating discussion.

This work was supported by Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) Research Grant 97629M and Howard Hughes Medical Institute Research Grant 75197-553601 to G. Gamba. National Institutes of Health Grant DK-57708 to D. B. Mount, A. Merendo and P. Meade were supported by scholarship grants from the Dirección General del Personal Académico of the University of Monterrey. We thank Dr. D. B. Mount. D. B. Mount is supported by an Advanced Research Career Development Award from the Department of Veterans Affairs, G. Gamba is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

1. Ackerman MJ, Wickham KD, and Clapham DE. Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103: 153-179, 1994.
2. Adragna NC, White HF, Orlov SN, and Lauf PK. K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C291-C296, 2000.
3. Amlal H, Paillard M, and Bichara M. Cl^- -dependent Na^+ transport mechanisms in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C1607-C1615, 1994.
4. Histojan C and Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetic properties. *J Exp Biol* 137: 209-218, 1988.
5. Bianchini L, Fossati B, Forthé-Nibelle J, Ellory JC, and Lakhoo B. Effects of hypotonic shock on ion fluxes in isolated trout erythrocytes. *J Exp Biol* 137: 303-318, 1988.
6. Bize L, Munoz P, Canessa M, and Dunham PB. Stimulation of membrane serine-threonine phosphatase in erythrocytes by hydrogen peroxide and staurosporine. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C440-C446, 1998.
7. Brooks HL, Heggen JW, and Yool AJ. Inhibition of aquaporin water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region. *Mol Pharmacol* 57: 1021-1026, 2000.
8. Barsell JD and Kirk K. Swelling-activated K^+ transport via two functionally distinct pathways in oel erythrocytes. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 270: R61-R70, 1996.
9. Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453-508, 1989.
10. Coombs AR and Gibson JS. Voltage-sensitive transport system and volume homeostasis in vertebrate red blood cells. *J Exp Biol* 200: 343-352, 1997.
11. Dumasouille H. Osmoregulation in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-180, 1970.
12. Egan R and N. Laumaur, P. Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochem Pharmacol* 43: 1777-1784, 1992.
13. Dumasouille H, Yoshinohata A, Lombardi M, Lyttton J, Lee WS, Hediger MA, and Hebert SC. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electro-neutral sodium-potassium-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 268: 17713-17722, 1994.
14. Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyasohata A, Lyttton J, Hediger MA, Brenner BM, and Hebert SC. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electro-neutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2749-2753, 1993.

15. Gary RP, Nazarek C, Hannerer PA, and Grigoriou EJ Jr. Demonstration of a $IK^{+}Cl^{-}$ cotransporter system in human red cells by its sensitivity to [10]hydroxydeoxyfluranylalanine acids: regulation of cell swelling and distinction from the bumetanide-sensitive $Na^{+}/K^{+}/Cl^{-}$ cotransporter system. *Mol Pharmacol* 53: 695-701, 1998.
16. Gilen CM, Brill S, Payne JA, and Forbush II H. Molecular cloning and functional expression of the K^{+}/Cl^{-} cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271: 16237-16244, 1996.
17. Greger R and Schlögl A. Properties of the basolateral membrane on the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Physiol Rev* 59: 301-319, 1979.
18. Gulzouarn H, Harvey BJ, Borgese F, Gabillat N, Garcia-Houmou F, and Metais R. Volume-activated Cl^{-} -independent and Cl^{-} -dependent Ca^{2+} release in trout red blood cells. *J Physiol (Lond)* 462: 609-626, 1993.
19. Gusev GP, Agalakova N, and Lapin AV. Potassium transport in red blood cells of *Rana temporaria*: demonstration of a K^{+}/Cl^{-} cotransport. *J Comp Physiol (B)* 165: 230-237, 1995.
20. Hilli K, D'Andrea RP, Fuzze J, Crawford J, Woollett E, Sutherland GR, Vadasi MA, and Gamble JH. Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K^{+}/Cl^{-} cotransporter. *J Biol Chem* 274: 10661-10667, 1999.
21. Inoue T and Morikawa M. Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 88: 529-542, 1987.
22. Jacoby SC, Guggino EC, Caron L, Chang J, and Isenberg P. Inhibition of $Na^{+}/K^{+}/2Cl^{-}$ cotransport by mercury. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C684-C692, 1999.
23. Jarellimek W, Lewson A, and Minsfeld U. A furosemide-sensitive K^{+}/Cl^{-} cotransporter counteracts intracellular Cl^{-} accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons. *J Neurosci* 19: 4695-4704, 1999.
24. Jennings ML. Volume-sensitive K^{+}/Cl^{-} cotransport in rabbit erythrocytes. Analysis of the rate-limiting activation and inactivation events. *J Gen Physiol* 114: 743-758, 1999.
25. Jennings ML and Schulz RK. Okadaic acid inhibition of K^{+}/Cl^{-} cotransport. Evidence that protein dephosphorylation is necessary for activation of transport of the cell swelling or N -ethylmaleimide. *J Gen Physiol* 97: 799-817, 1991.
26. Jensen F. Regulatory volume decrease in carp red blood cells: mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated and anionic acid transport. *J Exp Biol* 198: 155-162, 1985.
27. Kaji DM and Tsukitani Y. Role of protein phosphatase in activation of K^{+}/Cl^{-} cotransport in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 260: C176-C180, 1991.
28. Kelly SM, Butler JP, and Macklem FT. Control of cell volume in oocytes and eggs from *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 111: 681-691, 1995.
29. Kravup T and Dunham PB. Reconstitution of calcium-inhibited K^{+}/Cl^{-} cotransport. *Mol Erythrocytology*, in: *Membrane IP-1*. *Am J Physiol Cell Physiol* 270: C898-C902, 1996.
30. Kuwahara M, Gu Y, Ishibashi K, Marumo F, and Saasaki S. Mercury-sensitive renal acid transport site in $AGF2$ water channel. *Biochemistry* 36: 13973-13978, 1997.
31. Lauf PK and Adragna NG. Temperature-induced functional deseculation of thylakoids from sheep erythrocytes. K^{+}/Cl^{-} cotransport. *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C1167-C1175, 1995.
32. Lauf PK, Bauer J, Adragna NG, Fujise H, Zadee-Oppen AMM, Ryan RH, and DeLuca E. Erythrocyte K^{+}/Cl^{-} cotransporter: properties and regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 263: C917-C932, 1992.
33. Leyssen A, Dijkstra S, Van Kerkhove E, and Steels P. Mechanisms of K^{+} uptake across the basal membrane of malpighian tubules of *Formica polyctena*: the effect of ions and inhibitors. *J Exp Biol* 199: 191-200, 1999.
34. Linton SM and O'Donnell MJ. Contributions of K^{+}/Cl^{-} cotransport and $Na^{+}/K^{+}/ATPase$ to basolateral ion transport in malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 202: 1561-1570, 1999.
35. Lytle C, McManus TJ, and Haas M. A model of $Na^{+}/K^{+}/2Cl^{-}$ cotransport in order to maintain anion and glide symmetry. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C209-C209, 1998.
36. Markovlev D and Knight D. Renal Na^{+}/K^{+} cotransporter Na^{+} channel by heavy metals. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F283-F289, 1998.
37. Mercado A, Mount DB, Vazquez N, Song L, and Gamba G. Functional characteristics of renal $KCCs$. *FASEB J* 14: A341, 2000.
38. Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB, and Gamba G. Functional comparison of the K^{+}/Cl^{-} cotransporters $KCC1$ and $KCC2$. *J Biol Chem* 275: 30199-30204, 2000.
39. Monroy A, Plata C, Hebert SC, and Gamba G. Characterization of the thiazide-sensitive Na^{+}/Cl^{-} cotransporter: a new model for ionic and diuretic interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F161-F169, 2000.
40. Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AJ, Jr., Delplie E, and Gamba G. Cloning and characterization of $KCC3$ and $KCC4$, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16355-16362, 1999.
41. Mulders SM, Rijla JPL, Hartog A, Bindels RJM, Van Os CH, and Deen DF. Importance of the mercuro-sensitive cysteine on function and routing of $AQP1$ and $AQP2$ in oocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F451-F456, 1997.
42. Payne JA. Functional characterization of the neuronal-specific K^{+}/Cl^{-} cotransporter: implications for IK^{+} regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C1516-C1525, 1997.
43. Payne JA, Lytle C, and McManus TJ. Foreign anion substitution for chloride in human red blood cells: effect on ionic and osmotic equilibria. *Am J Physiol Cell Physiol* 259: C819-C827, 1990.
44. Payne JA, Stevenson TJ, and Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K^{+}/Cl^{-} cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271: 16245-16252, 1996.
45. Pevsitt RH, Hedger RS, Haas M, and Falvey HC. The regulation of $Na^{+}/K^{+}/Cl^{-}$ cotransport and bumetanide binding in avian erythrocytes by protein phosphorylation and dephosphorylation. Effects of kinase inhibitors and okadaic acid. *J Biol Chem* 265: 20747-20756, 1990.
46. Plata C, Mount DB, Rubio V, Hebert SC, and Gamba G. Isoforms of the $Na^{+}/K^{+}/Cl^{-}$ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F359-F366, 1999.
47. Plata C, Rubio V, and McManus T. Protein kinase C activation reduces the function of the $Na^{+}/K^{+}/2Cl^{-}$ cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Arch Med Res* 31: 21-27, 2000.
48. Hylers K, Wäpkin J, Payne JA, Haavavuo E, Lahtinen H, Lamsa K, Hirvonen U, Saarni P, and Kaila K. The K^{+}/Cl^{-} cotransporter $KCC2$ renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397: 251-255, 1999.
49. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, edited by Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, p. 7.3-7.6.
50. Singer F, Nickless S, and Coulson AT. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977.
51. Shelton RE, Scholermann JL, Morrison AJ, and Kinne RKH. Characterization of the $Na^{+}/K^{+}/2Cl^{-}$ cotransport system in oocytes from *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 1023: 164-190, 1990.
52. Stankovic LC and Jennings ML. K^{+}/Cl^{-} cotransport in rabbit red cells: further evidence for regulation by protein phosphatase type 1. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: C118-C124, 1993.
53. Strömke K, Singer TD, Morrison JE, and Delplie E. Dependence of K^{+}/Cl^{-} cotransport activity on biotinylated tyrosine phosphorylation by tyrosine kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C860-C867, 2000.
54. Strömke K, Falvey HC, Haas M, Dunham PB, Kalmay F, and Rao MC. Characterization of the endogenous $Na^{+}/K^{+}/Cl^{-}$

CHARACTERIZATION OF THE KCC IN *XENOPUS* OOCYTES

- 2Cl^- cotransporter in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 266: C284-C292, 1994.
55. Tanimura A, Kurihara K, Reshkin SJ, and Turner HJ. Involvement of direct phosphorylation in the regulation of the rat parotid $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter. *J Biol Chem* 270: 25252-25258, 1995.
56. Theander S, Edman A, Fahræus C, Akoev GN, and Grampp W. Cl^- transport in the lobster stretch receptor neuron. *Acta Physiol Scand* 167: 285-298, 1999.
57. Wagner CA, Waldegger S, Oswald H, Riber J, Murer H, Busch AE, and Lang F. Heavy metals inhibit P-induced currents through human brush-border $\text{Na}^+/\text{3Cl}^-$ cotransporter in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 271: F926-F930, 1996.
58. Well-Maslunsky E, Gutman Y, and Sasson S. Insulin activates furosemide-sensitive K^+ and Cl^- uptake system in BCCl1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C932-C939, 1994.
59. Yan GX, Chen J, Yamada KA, Kleber AG, and Corr PB. Contribution of shrinkage of extracellular space to extracellular K^+ accumulation in myocardial ischaemia of the rabbit. *J Physiol (Lond)* 490: 215-228, 1996.
60. Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, and Agre P. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402: 184-187, 1999.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



RINCÓN DEL RESIDENTE

Fisiopatología molecular del síndrome de Bartter

Patricia Meade, Ernesto Sabath, Gerardo Gamba

Unidad de Fisiología Molecular, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Molecular pathophysiology of Bartter's syndrome

ABSTRACT

Bartter's syndrome is an autosomic recessive disease characterized by hypokalemic metabolic alkalosis accompanied with hypercalciuria, polyuria and hypotension due to volume depletion. The pathophysiology of this hereditary disease was largely unknown until the last few years in which inactivating mutations in up to five different genes have been shown to produce or be associated with the development of this syndrome. All the involved proteins are expressed either in the apical or basolateral membrane of the thick ascending limb of Henle's loop. These clinical and molecular findings have increased our understanding of the Bartter's disease and also of the thick ascending limb physiology.

Key words. Bartter. Hypokalemic. Alkalosis. Loop of Henle.

RESUMEN

El síndrome de Bartter es un padecimiento hereditario, autosómico recesivo, caracterizado por poliuria, alcalosis metabólica, hipocalcemia e hipercalciuria. Hasta hace poco tiempo se desconocía la fisiopatología molecular de esta enfermedad. Sin embargo, en los últimos años se han descrito mutaciones en cinco genes que codifican para proteínas de membrana que se localizan en la porción gruesa del asa ascendente de Henle. Estos hallazgos clínico-moleculares han aumentado nuestro entendimiento de este padecimiento y de la fisiología del asa de Henle.

Palabras clave. Bartter. Alcalosis. Hipocalémica. Asa de Henle.

El Síndrome de Bartter (SB) es un padecimiento hereditario, que se transmite en forma autosómica recesiva y se caracteriza por ser una nefropatía perdedora de sal, con trastornos en el metabolismo del potasio, del calcio y ácido base. El SB fue descrito originalmente por Bartter y colaboradores en Maryland en 1962,¹ en un paciente con poliuria, alcalosis metabólica hipocalémica e hipertrofia del aparato yuxtaglomerular. En los últimos cinco años, el descubrimiento de varios genes involucrados en la producción de esta enfermedad nos ha mostrado que se trata de una enfermedad monogénica, pero con heterogeneidad genética y nos ha permitido entender con cierto grado de precisión la fisiopatología de este síndrome, así como correlacionar las alteraciones genómicas con las características clínicas de pacientes con SB. Aunado a esto y gracias al estudio de las ba-

ses moleculares del SB se tiene una mejor comprensión de la fisiología del asa ascendente de Henle.

El objetivo del presente trabajo es presentar una descripción de las características moleculares, fisiopatológicas y clínicas de este síndrome, con especial énfasis en las alteraciones del transporte tubular de iones.

FISILOGÍA DE LA REABSORCIÓN DE IONES EN EL ASA ASCENDENTE DE HENLE

La semejanza entre la presentación clínica del SB y la toxicidad de los diuréticos de asa permitió suponer que el defecto en este síndrome estaba localizado en el asa ascendente de Henle. Esta idea ha sido corroborada, ya que, hasta el momento, se han descrito mutaciones en cinco genes que codifican para pro-

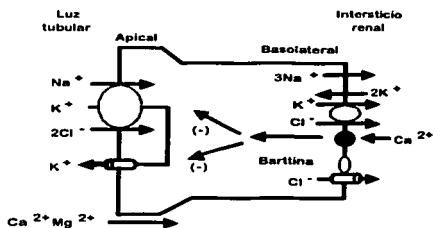


Figura 1. Fisiología molecular de la reabsorción de sal en el asa ascendente de Henle.

teínas que intervienen en el transporte de iones en esta región de la nefrona.

En el asa de Henle se reabsorbe aproximadamente 20% del filtrado glomerular. Esta porción de la nefrona tiene la capacidad de reabsorber grandes cantidades de sal, pero es impermeable al agua. Su función es crítica para diluir o concentrar la orina, ya que la reabsorción de sal en la porción ascendente gruesa del asa de Henle es la responsable de mantener la hipertonicidad de la médula renal, gracias a la cual, en presencia de hormona antidiurética se puede reabsorber agua en el túbulo colector.

La figura 1 muestra la fisiología de reabsorción de iones en el asa ascendente gruesa de Henle.² El transporte de NaCl en la membrana apical se lleva a cabo mediante un proceso de cotransporte activo secundario (cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$), que funciona mediante el gradiente químico de concentración de Na^+ entre el fluido tubular y el citoplasma celular, generado por la bomba de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$ que se localiza exclusivamente en la membrana basolateral, por lo que el gradiente generado permite el transporte vectorial, desde la luz del túbulo hacia el intersticio renal.

El cotransportador $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (CSB1 o NKCC2) se localiza en la membrana apical, transporta Na^+ , K^+ y Cl^- al interior de la célula y su función es inhibida por los diuréticos de asa (furosemida, bumetanida, pirtanida, ácido etacrínico, etc.).³ De ahí que estos diuréticos sean agrupados bajo el nombre de diuréticos de asa, porque es en el asa ascendente de Henle en donde ejercen su acción diurética. El transporte de Cl^- al intersticio renal se lleva a cabo por los canales de Cl^- denominados ClC-Kb, localizados en la mem-

brana basolateral.⁴ Como muestra la figura 1, el potasio que ingresa a través del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en la membrana apical es reciclado hacia la luz tubular a través de los canales de potasio conocidos como ROMK, que pertenecen a la superfamilia de los canales rectificadores entrantes.⁵ El reciclaje de potasio hacia la luz es un evento que fisiológicamente es necesario para mantener la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y para la reabsorción de cationes divalentes. La explicación es la siguiente: En el primer caso, debido a la mayor concentración de Na^+ (145 mEq/L) y Cl^- (110 mEq/L) en el plasma, en comparación con el K^+ (4 mEq/L), la cantidad filtrada de sal es mucho mayor que la de potasio y, por lo tanto, la cantidad de Na^+ y Cl^- disponible para transportarse en la luz del asa ascendente de Henle es mucho mayor que la de K^+ . Por este motivo, si el K^+ no reciclara hacia la luz del asa, llegaría un momento en que el transportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ no podría seguir funcionando por ausencia de K^+ en el medio. Con el reciclaje de potasio a través de los canales ROMK se asegura que la concentración de K^+ en la luz se mantenga constante, a pesar de la gran actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. En el segundo caso, el reciclaje de K^+ hacia la luz genera voltaje positivo dentro de la luz, ya que el Na^+ que entra a la célula por la membrana apical es expulsado hacia el intersticio por la bomba de Na^+ y K^+ y los dos cloros son expulsados por los canales de cloro ClC-Kb. En consecuencia, se concentran dos aniones y un catión en el intersticio y el otro catión, que es el K^+ , se queda en la luz del asa de Henle. Como muestra la figura 1, el voltaje positivo que se genera es responsable del transporte de cationes por vía paracelular. Dada la concentración de cationes en el líquido tubular, los que con mayor probabilidad pueden transportarse por este mecanismo son el Na^+ y los cationes divalentes como el Ca^{2+} y Mg^{2+} . Este mecanismo es el fundamento del manejo de la hipercalcemia con cargas de solución salina y diuréticos de asa, ya que al inducir diuresis por la solución salina, y con el transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ bloqueado, se aumenta la producción de orina, al mismo tiempo que se reduce la reabsorción renal de calcio. De hecho, la figura 1 también muestra el mecanismo por el cual el calcio extracelular regula la función del asa de Henle. El calcio en el intersticio renal interactúa con una proteína de membrana conocida como sensor de calcio.⁶ Se trata de una proteína de membrana que funciona como receptor del calcio. A mayor calcio en el intersticio mayor será la producción de fosfolipasa A por parte del receptor y esto trae como consecuencia la producción de compuestos derivados del ácido araquidónico como el

20-HETE, que a su vez inhibe la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ y del canal de K^+ ROMK. De esta forma, si aumenta el calcio en el intersticio, se reduce la reabsorción de sal en el asa de Henle, se bloquea el reciclaje de K^+ hacia la luz y por lo tanto, disminuye la reabsorción de calcio.⁷ Éste es el mecanismo por el cual se produce poliuria en estados de hipercalemia.

BASES MOLECULARES DEL SÍNDROME DE BARTTER

Las características fisiológicas de los pacientes con SB sugirieron que el defecto se localizaba en la porción gruesa del asa de Henle. Además, el hecho de que varias de sus manifestaciones clínicas fueran parecidas al efecto de la administración de diuréticos de asa y que algunos pacientes no presentaran respuesta a la furosemida llevó a considerar al CSB1 como el primer candidato para este trastorno. Con la explosiva identificación molecular de los diversos genes que codifican para las proteínas de transporte en la nefrona, ha sido posible estudiar la relación de éstos con diversas enfermedades hereditarias y hoy en día, la demostración de que cinco genes diferentes causan el SB en humanos, resalta la importancia de la interrelación que existe entre estas proteínas en la función del asa de Henle, lo que ha servido para corroborar el esquema de reabsorción de sal mostrado en la figura 1. Los genes en los cuales se han detectado mutaciones como causa del SB son el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ CSB1; el canal de potasio ROMK; el canal de cloro CIC-Kb, una proteína recientemente descrita, denominada barttina y que interviene en el transporte basolateral de Cl^- y el sensor de calcio.

Mutaciones en el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ (CSB1)

Después de la clonación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ del riñón de rata⁸ fue posible clonar el

gen homólogo en el humano y estudiarlo en enfermos con síndrome de Bartter. Así, el CSB1 fue el primer gen en el que se demostró asociación con el SB. Simon, *et al.*⁹ clonaron el gen homólogo humano para CSB1, el cual fue localizado en el cromosoma 15 y estudiaron a seis familias con SB neonatal. Valiéndose de la existencia de marcadores genéticos polimórficos en este locus, localizados dentro y cerca de la secuencia de CSB1, genotipificaron a los miembros de las familias afectadas y compararon la segregación de los marcadores con la presencia de la enfermedad, lo que se conoce como análisis de ligamiento. Todos los individuos afectados fueron homocigotos para los alelos en el locus de CSB1, dando evidencia clara de ligamiento entre el SB y el locus de CSB1. Se identificaron seis diferentes mutaciones en CSB1 que segregan con la enfermedad. Entre estas mutaciones se encontraron cambios en el marco de lectura y codones de paro prematuros que interrumpen la síntesis de la proteína, así como sustituciones no conservadas de aminoácidos en residuos altamente conservados entre las especies en las que se ha clonado el CSB1. Con esta evidencia fue posible comprobar que mutaciones en el gen que codifica para CSB1 causan SB.

El cuadro 1 muestra los tipos de mutaciones en CSB1 que han sido reportados y el porcentaje de cada tipo de mutación en relación con el total.⁹⁻¹³ Para entender los sitios en la proteína en donde se han observado mutaciones, la figura 2 muestra un esquema con la topología propuesta para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$; la cual consiste en una región central hidrofóbica con 12 regiones transmembrana, flanqueadas por una región aminoterminal corta y otra carboxiterminal más larga, de localización intracelular. Las flechas indican ejemplos de algunas mutaciones. Como muestra el cuadro 1, de las mutaciones encontradas en CSB1 en pacientes con SB, el 61% son mutaciones no conservadas; es decir, en las que cambia un aminoácido por otro que no pertenece al mismo grupo. Por ejemplo, la mutación en donde el aminoácido fenilalanina en la posición

Cuadro 1. Mutaciones reportadas en el síndrome de Bartter.

	Total de mutaciones reportadas	Sustitución no conservada	Delección o inserción	Proteína truncada	Pérdida codón de inicio	Pérdida sitio empalme	Referencias
CSB1	23	61% (14)	4% (1)	31% (7)	0% (0)	4% (1)	9, 11, 13, 39
ROMK	24	71% (17)	4% (1)	25% (6)	0% (0)	0% (0)	16, 17, 18, 20, 22
CIC-Kb	30	43% (13)	36% (11)	13% (4)	0% (0)	7% (2)	28, 30
Barttina	7	43% (3)	14% (1)	0% (0)	29% (2)	14% (1)	33

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

77-42

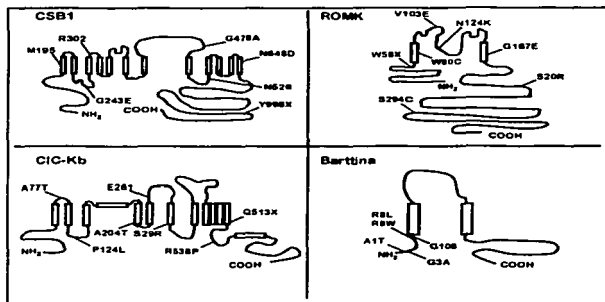


Figura 2. Topología de las proteínas en que se han descrito mutaciones en el SB, algunas de las cuales están indicadas por flechas.

272 cambia a valina lo describimos como F272V. Así, las mutaciones no conservadas reportadas hasta el momento son G193R, R199G, G224D, G243E, A257S, F272V, R302Q, G319R, C436S, G478A, A508T, A512D y A555T. El 4% de las mutaciones en CSB1 son deleciones o inserciones en las que se pierde o se agrega un codón completo, por lo que se pierde o se gana un aminoácido, lo que resulta en una proteína no funcional. De este tipo sólo hay un caso de delección reportado y corresponde al residuo N526. El 31% son mutaciones que resultan en proteínas truncadas, ya sea porque introducen un nuevo codón de paro, o porque cambian el marco de lectura, lo que resulta en un nuevo codón de paro unas cuantas bases después de la mutación. De este tipo se han encontrado mutaciones en M195, R302, W625, Q823, e Y998. Finalmente, un caso (4%) de los reportados de SB por mutación en CSB1 se debe a una mutación puntual en la que además de cambiar un aminoácido se pierde el sitio de empalme, por lo que es posible que el RNA no pueda madurar por completo.

La pérdida en la función de CSB1 explica la fisiopatología del SB. La reducción en la reabsorción de NaCl en el asa ascendente de Henle origina pérdida de sal y de agua, lo que explica el desarrollo de hipotensión arterial. La hipovolemia consecuente activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona y de ahí la hipertrofia del aparato yuxtamedular. El aumento en la carga de Na^+ que llega al túbulo colector, como consecuencia de la reducción en la reabsorción

de iones en el asa de Henle, aumenta la reabsorción de sodio por el canal de Na^+ sensible a amilorida. En esta región de la nefrona la secreción de potasio depende de la reabsorción de sodio, ya que el sodio que ingresa a la célula en la membrana apical es expulsado en la membrana basolateral por la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$ en intercambio por potasio, el cual después de ingresar a la célula es secretado hacia la luz tubular por canales conductivos. Por lo tanto, el incremento en la reabsorción de Na^+ en el túbulo colector tiene como consecuencia el aumento en la secreción de potasio y de ahí la hipocalcemia. Al haber más potasio en la luz del túbulo se estimula también el intercambio de K^+ con H^+ por la $\text{K}^+:\text{H}^+:\text{ATPasa}$ de la membrana apical de las células intercaladas y de ahí la alcalosis metabólica. La exagerada secreción de aldosterona estimula aún más la secreción de potasio y de hidrogeniones, lo que contribuye al desarrollo de hipocalcemia y alcalosis metabólica. Finalmente, los mecanismos por los cuales se produce hipercalcemia son dos: a) la falta del potencial positivo en el lumen por la pérdida de la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ disminuye la reabsorción neta de calcio aumentando su concentración en orina y b) el incremento compensatorio en la reabsorción de NaCl en túbulo distal, inhibe la reabsorción de calcio en este segmento.

La aparición de SB por mutaciones en CSB1 ha sido corroborada por las observaciones realizadas por Takahashi, *et al.*¹⁴ en el modelo murino de disrupción del gen del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$.

Los ratones homocigotos CSB1 -/- presentan semejanzas con los pacientes con SB. Desde el primer día de nacidos, los ratones muestran signos de depleción de volumen y retraso en el crecimiento, en el día 7 tienen deshidratación grave, insuficiencia renal, hipercalemia, acidosis metabólica, hidronefrosis, niveles elevados de renina en plasma y la mortalidad es del 100%. El tratamiento con indometacina desde el nacimiento previno el retraso en el crecimiento y el 10% de los ratones tratados sobrevivió, aunque ya adultos presentaron poliuria, hidronefrosis, hipocalcemia, alcalosis metabólica, proteinuria e hipercalemia.

Mutaciones en el canal de K⁺ (ROMK)

Los canales de potasio conocidos como ROMK se localizan en la membrana apical de las células del asa ascendente de Henle y son los encargados del reciclaje de potasio del interior de la célula al líquido tubular (Figura 1). Los agentes antagonistas de los ROMK tienen efecto inhibitorio sobre la función del CSB1, lo cual demuestra el papel clave de estos canales en la regulación de la actividad del cotransportador. Por este motivo se consideró a este gen como candidato para el SB. Simon, *et al.*⁹ al estudiar pacientes con SB observaron que no todas las familias tenían análisis de ligamiento positivo con el gen de CSB1, por lo que se dieron a la tarea de buscar otros genes que explicaran la presencia de la enfermedad en estos pacientes. Gracias a la identificación molecular del gen ROMK a partir de riñón de rata a principios de los 90's,¹⁵ Simon, *et al.*¹⁶ pudieron clonar ROMK de humano, localizado en el cromosoma 11, y analizaron nueve familias con SB neonatal, sin mutaciones en el gen CSB1, pero que tenían características clínicas y bioquímicas indistinguibles de los pacientes con mutaciones en CSB1. Los sujetos afectados con la enfermedad en estas familias fueron homocigotos para mutaciones de ROMK2 que cosegregaban con la enfermedad y que no son comunes en el resto de la población.

En la figura 2 se muestra la topología de los canales ROMK que consiste en dos regiones transmembrana flanqueadas por una región aminoterminal hidrofílica, corta y una carboxiterminal larga. Las flechas indican los sitios en donde se han observado algunas mutaciones y en el cuadro 1 se muestran los tipos de mutaciones.^{16,17-22} De las mutaciones encontradas en pacientes con SB por defecto en ROMK, el 71% son mutaciones no conservadas en los aminoácidos S200R, A195V, M338T, A156V-L220F, V53E, P91L, W80C, V103E, A179T, G167E, D108H, D74Y,

V296G, N124K, S294C, R311Q-F325C y R311Q-L220F. Las mutaciones por delección sólo se han reportado en un caso (4 %) en el cual se ha perdido gran parte de la secuencia que incluye los exones uno y dos. El 25% son mutaciones que cambian el marco de lectura, generando un nuevo codón de paro delante de la mutación y por lo tanto, una proteína truncada. Estas mutaciones están localizadas en Y60, F13-14, W58, T913-K314, 1557 (delección AAA/G) y R338. Estudios *in vitro*^{20,27} han demostrado que ciertas mutaciones afectan la llegada de la proteína a la membrana plasmática, pero no su función. Es decir, la proteína sí funciona, pero llega muy poca a la membrana apical del asa de Henle. Otras mutaciones se han localizado en regiones reguladoras como sitios específicos para fosforilación o para regulación por pH. Finalmente, existen algunas mutaciones en las que se conserva parte de la función del canal.²²

Todas estas observaciones han demostrado que mutaciones en ROMK son causa del SB. Siguiendo lo expuesto en la figura 1, la pérdida de función de ROMK tiene como consecuencia la imposibilidad para reciclar potasio hacia la luz tubular. Por lo tanto, la concentración de potasio en la luz del túbulo disminuye de forma tal que se bloquea la actividad de CSB1 y con esto la reabsorción de sal en el asa ascendente de Henle.

Mutaciones en el canal de Cl⁻ (ClC-Kb)

No todas las familias con SB son explicadas por mutaciones en CSB1 y en ROMK, motivo por el que Simon, *et al.*,²⁸ con la ventaja de la reciente clonación del DNAC que codifica para canales de cloro epiteliales,²⁹ continuaron con la búsqueda y estudiaron al canal de Cl⁻ conocido como ClC-Kb, como un tercer gen candidato. Este gen se localiza en el cromosoma 1p36 y es 80% idéntico al canal de Cl⁻ ClC-Ka que se expresa en la membrana basolateral del asa ascendente delgado. Las 17 familias estudiadas inicialmente mostraron evidencia de que ClC-Kb es otro gen causante de SB.²⁸ Se identificaron mutaciones que incluyen codones de término prematuros, grandes delecciones y sustituciones no conservadas, que resultan en pérdida de la función normal del gen (Cuadro 1). Estos resultados sugieren la ausencia de vías alternas para la salida de cloro que pudieran compensar la deficiencia en el canal ClC-Kb. En la figura 2 se muestra la estructura secundaria propuesta para ClC-Kb que consiste en 12 regiones transmembrana con múltiples conexiones hidrofílicas. Con flechas están indicadas algunas de las mu-

taciones observadas y en el cuadro 1 se muestran los tipos de mutaciones encontradas. Además de Simon, *et al.*,²⁸ y otros autores han reportado mutaciones en el canal de Cl⁻ CIC-Kb en pacientes con SB.³⁰ El 43% de las mutaciones son no conservadas en los aminoácidos P124L, A204T, R438C, A349D, Y432H, H357Q, S297R, L139P, K560M, S337F, R538P, S573Y y A77T; el 36% son deleciones de grandes segmentos de DNA donde se pierden varios exones o inclusive la secuencia completa. Algunas de estas mutaciones son producto del entrecruzamiento desigual entre los genes CLCNKb y CLCNKa. El 13% son mutaciones que cambian el marco de lectura e insertan un codón de paro, generando una proteína truncada, de este tipo se han encontrado mutaciones en Q513, 463 y 518. Finalmente, el 7% son mutaciones que generan pérdida del sitio de empalme S323 y R438C.

Las mutaciones en el canal de Cl⁻ CIC-Kb resultan en SB por un mecanismo similar a lo que observamos en los dos casos anteriores. El aumento en el cloro intracelular inhibe la reabsorción de sodio por el cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻, lo que desencadena la pérdida de la función del asa ascendente gruesa de Henle. De esta manera, la existencia de pacientes con SB en los que el defecto genético puede ser en el cotransportador apical de Na⁺:K⁺:2Cl⁻, en el canal apical de K⁺ o en el canal basolateral de Cl⁻, demuestra la importante interrelación de estas tres proteínas.

Mutaciones en Barttina (BSND)

Brennan, *et al.*,³¹ y Vollmer, *et al.*³² demostraron la existencia de una nueva variante del SB, al estudiar a pacientes de familias beduinas con sordera neurosensorial y SB neonatal. Demostraron en estas familias ligamiento del síndrome con el cromosoma 1p31 y, posteriormente, Birkenhäger, *et al.*³³ mapearon en el cromosoma 1p un locus para el gen responsable de la enfermedad. A este gen lo denominaron BSND y a su producto lo llamaron barttina y corresponde, por lo tanto, a una cuarta variante del SB neonatal. En estos casos además, el trastorno funcional renal se asocia con sordera neurosensorial e insuficiencia renal. Como muestra la figura 2, este gen codifica para una proteína que tiene dos potenciales α -hélices transmembranales. Por medio de análisis de hibridación in situ detectaron la expresión de BSND en el riñón humano y en células del oído interno (células marginales del stria vascularis).³³ En el análisis de diez familias afectadas con este síndrome se han detectado siete diferentes muta-

ciones en el gen BSND, que probablemente resultan en pérdida de la función de esta proteína, y que están indicadas en la figura 2 y en el cuadro 1. De las mutaciones observadas en el gen BSND, en cuatro familias se han encontrado mutaciones no conservadas en los aminoácidos R5W (una familia), R5L (una familia) y G10S (dos familias). En otra familia el defecto en BSND consiste en deleción de los exones 3 y 4, mientras que en seis familias se pierde el codón de inicio, cinco de ellas por cambio de una adenina por timina en el codón de inicio ATG y en uno por cambio de guanina por adenina en este mismo codón. Finalmente, existe el reporte de una familia en donde la BSND está truncada debido a mutaciones que generan pérdida del sitio de empalme.

En los casos de Bartter causados por defectos en los genes CSB1, ROMK y CIC-Kb se estudió la posible implicación de estos genes candidatos, porque se conocía la función de estas proteínas y por eso se supuso que podrían ser las causantes de la enfermedad. En contraste, el gen BSND se identificó por análisis de clonamiento posicional, sin conocer su función. Se propuso que el producto del gen BSND podría ser entonces una proteína reguladora de los transportadores de iones involucrados en SB y recientemente se demostró que éste es el caso. Según resultados publicados por Estevez, *et al.*,³⁴ barttina es una subunidad del canal de cloro CIC-Kb. Al no funcionar esta proteína, se bloquea la adecuada función del canal CIC-Kb y con esto se produce el SB. Es interesante mencionar la diferencia entre el SB resultado de mutaciones en el canal CIC-Kb que no se acompaña de sordera y el síndrome de Bartter con sordera neurosensorial por mutaciones en BSND.

Existen más genes que causan síndrome de Bartter

A pesar de que se han identificado cuatro genes cuyas mutaciones causan SB, no todos los pacientes con esta enfermedad tienen afectado alguno de estos genes. Esto indica que debe existir cuando menos un quinto gen, si no es que más, asociado con la producción de este síndrome. En este sentido, Vargas-Pousou, *et al.*³⁵ recientemente reportaron el caso de un niño con hipocalcemia autosómica dominante debido a una mutación del tipo "ganancia en la función" en el sensor de calcio. Este paciente se presentó a la clínica con manifestaciones claras de SB que incluían hipocalcemia y alcalosis metabólica. La mutación encontrada (L125F) hace al sensor de calcio mucho más sensible al calcio, por lo que esta proteína permanece activa, aun a bajas concentraciones de calcio. Como

vimos anteriormente, resultados de múltiples trabajos han sugerido que el calcio sérico regula la función del asa de Henle a través de su efecto sobre el sensor de calcio en la membrana basolateral.⁷ Dos casos similares fueron reportados recientemente por Watanabe, *et al.*³⁶ Estos hallazgos demuestran que en el humano, un aumento en la función constitutiva del sensor de calcio resulta en inhibición tal de la función del asa ascendente gruesa de Henle, que los sujetos afectados desarrollan SB.

CORRELACIÓN CLÍNICO-MOLECULAR

El SB es una enfermedad con un patrón de herencia autosómico recesivo, cuya incidencia es de 1.8 por 100 mil nacidos vivos, la mayoría de los cuales se presentan en familias consanguíneas.³⁷ Los datos característicos del SB son la alcalosis metabólica hipocalémica, la hiper calciuria y la pérdida de los mecanismos de concentración urinaria. Los pacientes clínicamente presentan poliuria, hipotensión arterial y nefrocalcinosis.³⁸ En el síndrome que se presenta desde la etapa prenatal, el desarrollo de polihidramnios es frecuente. Además, el fenotipo es también muy característico: son niños delgados, con frento y pabellones auriculares prominentes, ojos grandes, facies triangular, poca masa muscular y prácticamente todos presentan cierto grado de retraso en el crecimiento. El 50% de los pacientes tienen estrabismo.³⁹ En algunos casos la fiebre de origen desconocido, el vómito y la diarrea, llegan a ser los síntomas predominantes de la enfermedad y son consecuencia del aumento en los niveles séricos de PGE₂. Las infecciones de vías urinarias pueden presentarse en forma recurrente.

Antes de que se desarrollaran técnicas que permitieran el análisis molecular del SB, éste se dividió para su estudio -dependiendo sobre todo de la edad de presentación- en SB clásico y SB neonatal. Esta clasificación

se ha modificado ahora que conocemos varios de los genes que pueden producir SB. Como muestra el cuadro 2, se describen cuatro tipos de SB dependiendo de la proteína afectada (los dos reportes de SB por mutaciones en el sensor de calcio no se incluyen en esta clasificación). Existen además familias con SB en los cuales no se ha podido encontrar aún el gen afectado, lo que indica que existe cuando menos, un gen más implicado en la fisiopatología de esta enfermedad. Los cuatro tipos hasta el momento descritos se encuentran asociados a mutaciones en los siguientes genes: Tipo I al CSB1, tipo II a ROMK, tipo III al CIC-Kb y el tipo IV al BSND (Cuadro 2). Las mutaciones en CSB1, ROMK y BSND se encuentran asociadas con mayor frecuencia a la forma neonatal, mientras que cuando el gen afectado es el canal de cloro CIC-Kb se presenta la forma clásica, de inicio tardío.^{38,40}

Tanto el polihidramnios en el periodo neonatal, como la poliuria posterior al nacimiento están asociados a pérdida en los mecanismos renales de concentración urinaria. Es probable que por eso esta manifestación sea poco frecuente en los pacientes con SB tipo III, en los cuales se conserva razonablemente la capacidad de concentración urinaria. En cambio, en pacientes con SB tipo IV, estas manifestaciones son de mayor gravedad y el parto es con frecuencia anterior a la semana 31.⁴¹ La razón probablemente se deba a que BSND es una subunidad no solamente del CIC-Kb, propio del asa ascendente gruesa de Henle, sino también del CIC-Ka, que es el responsable del transporte de Cl⁻ en la asa ascendente delgada. De hecho, los ratones knockout para el gen CIC-Ka desarrollan diabetes insípida.⁴²

La pérdida o disminución de los mecanismos de concentración urinaria y de la reabsorción de sal en el asa ascendente gruesa de Henle tiene como consecuencia disminución del volumen extracelular y por consiguiente, el desarrollo de hipotensión arterial. En respuesta a la pérdida de volumen, los pacientes

Cuadro 2. Características clínicas de los pacientes con síndrome de Barter.

	I	II	III	IV
Gen afectado	CSB1	ROMK	CIC-Kb	BSND
Síntomas en periodo neonatal	100%	95%	55%	100%
Potasio sérico (mEq/L)	2.6 ± 0.3	2.9 ± 0.5	2.4 ± 0.4	
Poliuria	50%	65%	30%	100%
Nefrocalcinosis	SI	SI	No	SI
Polihidramnios	100%	95%	25%	100%
Hipoacusia central	< 10%	< 10%	0	100%
IRCT*	No	No	No	SI

IRCT* = Insuficiencia renal crónica terminal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

77-46

con SB tienen importante activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona. De hecho, la hipertrofia del aparato yuxtaglomerular es una de las características morfológicas de los riñones de pacientes con SB. Además de la hipovolemia crónica, otros factores que se han implicado como causantes de la hipotensión arterial son los niveles elevados de prostaglandinas,⁴³ alteraciones en la secreción de óxido nítrico y de vías de señalización intracelular que implican a las proteínas G.⁴³

La hipocalcemia es universal en esta enfermedad. Es de mayor gravedad en pacientes con Bartter tipos I y IV. Los pacientes con mutaciones en el canal de K^+ (tipo II) pueden llegar a presentar hipercalemia en el periodo postnatal inmediato. Sin embargo, la mayoría desarrolla hipocalcemia en el transcurso de la enfermedad, aunque ésta es de menor gravedad que la desarrollada por los pacientes con SB tipos I, III y IV. La razón probable es que el canal de potasio ROMK no sólo es responsable de la secreción de K^+ en el asa ascendente gruesa de Henle, sino también en el túbulo distal y en el túbulo colector.⁹ Por lo tanto, aunque exista incremento en la llegada de sal a la nefrona distal, la secreción de potasio no aumenta a tal magnitud. De hecho, los ratones knockout para ROMK no desarrollan hipocalcemia.^{44,45} Se desconoce la vía alternativa por la cual los pacientes con SB tipo II secretan potasio en los túbulos distales. Sin embargo, recientemente se ha postulado que cuando se incrementa la carga de fluido tubular en la región distal de la nefrona, los maxilares de potasio localizados en las células principales e interciliares aumentan su actividad, incrementando la secreción de K^+ .⁴⁶

No todos los pacientes con SB cursan con hipercalemia y nefrocalcinosis, ya que en enfermos con mutaciones en CIC-Kb (tipo III) la nefrocalcinosis es infrecuente e incluso en algunos casos se ha reportado la presencia de hipocalcemia.³⁹ Estos datos son interesantes ya que pacientes con mutaciones en el gen que codifica para canales de cloro en la nefrona (CIC-5; síndrome de Dent),⁴⁷ desarrollan nefrocalcinosis desde edades tempranas. Por el momento es difícil conjeturar sobre el papel que pudieran tener los canales de Cl^- en el manejo renal del calcio.⁴⁸

La excreción urinaria de magnesio es normal, excepto en el SB tipo III, ya que hasta un 30% de pacientes con mutaciones en CIC-Kb tienen aumento en la excreción urinaria de magnesio, desconociéndose hasta el momento los factores involucrados.⁴⁹

El mecanismo por el cual se presenta hipocalcemia neurosensorial es diferente en cada tipo de SB. En pacientes con mutaciones en CSB1 y ROMK es probable que la hipocalcemia sea secundaria a la prematu-

rez, ya que incluso en niños sanos prematuros la incidencia de hipocalcemia es mayor que en la población normal. En pacientes con mutación en BSND, se debe a que disminuye considerablemente la secreción de endolinfina. La proteína bartantina funciona como subunidad de los canales de cloro CIC-Ka y CIC-Kb.^{34,41} Ambos canales se expresan en la *stria vascularis* del oído interno en donde su función es necesaria para mantener la producción de endolinfina. De esta manera, la ausencia de bartantina afecta la función de ambos canales y bloquea con esto la producción de endolinfina.

El diagnóstico diferencial del SB son los estados de intoxicación crónica por diuréticos, pérdida intestinal de cloro y el síndrome de Gitelman. Este último es también una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por alcalosis metabólica hipocalcémica.⁵⁰ El síndrome de Gitelman es ocasionado por mutaciones en el cotransportador Na^+Cl^- sensible a tiazidas⁵¹ y se puede diferenciar del SB por la edad de presentación (usualmente en mayores de 15 años) y por algunas alteraciones metabólicas que las distinguen.^{39,40} En el SB, al disminuir la reabsorción de sal en el asa ascendente de Henle, se reduce también la reabsorción de calcio y, por lo tanto, los pacientes con SB tienen hipercalemia. En cambio, en el síndrome de Gitelman, la disminución de reabsorción de sal en el túbulo distal se acompaña de aumento en la reabsorción de calcio, por lo que los pacientes tienen hipocalcemia. La otra clave está en el magnesio sérico. Es interesante, sin embargo, que un reporte muy reciente de Zelokovic, *et al.*⁵² describen qué mutaciones en el CIC-Kb pueden asociarse a fenotipo de síndrome de Bartter o Gitelman.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda y comentarios de los miembros de la Unidad de Fisiología Molecular durante la realización de este manuscrito. Patricia Meade es estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM gracias a becas otorgadas por CONACYT y por la Dirección General del Personal Académico de la UNAM. Ernesto Sabath es residente de tercer año de la especialidad de Nefrología.

REFERENCIAS

1. Bartter FC, Pronove P, Gill JK, Jr, MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. 1962. *J Am Soc Nephrol* 1992; 9:516-28.
2. Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 1985; 65: 760-97.

3. Gamba G. Electroneutral chloride-coupled co-transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 535-40.
4. Reeves WB, Winters CJ, Andreoli TE. Chloride channels in the loop of Henle. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 631-45.
5. Giebisch G. Physiological roles of renal potassium channels. *Semin Nephrol* 1999; 19: 458-71.
6. Brown EM, Gamba G, Ricciardi D, Lombardi M, Butters R, Kiro O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 573-80.
7. Ricciardi D, Gamba G. The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease. *Arch Med Res* 1999; 30: 436-48.
8. Gamba G, Miyanooshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hedges MA, et al. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-potassium-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 1994; 269: 17713-21.
9. Simon DB, Karet FE, Hamdan J M, Di Pietro A, Sanjad S, A Litton R. B. Bartter's syndrome, hypokalemic alkalosis with hypercalcaemia, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics* 1996; 13: 183-8.
10. Kurtz CL, Karolyi L, Seyberth HW, Koch MC, Vargas R, Feldmann D, et al. A common NKCC2 mutation in Costa Rican Bartter's syndrome patients: evidence for a founder effect. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1706-11.
11. Vargas-Poussou R, Feldman D, Vollmer M, Konrad M, Kelly L, Van der Heuvel LPWJ, et al. Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for antenatal Bartter syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1332-40.
12. Abdel A, Badawi AH, Yacoub SA, Habib YQ, al Khufash FA, al Ghanem MM, et al. Bartter's syndrome in Arabic children: review of 13 cases. *Pediatr Int* 1999; 41: 299-303.
13. Bettinelli L, Ciaramatori S, Cesario L, Tedeschi S, Ruffa G, Apiani AC, et al. Phenotypic variability in Bartter syndrome type II. *Pediatr Nephrol* 2001; 44: 940-5.
14. Takahashi N, Chernavvsky DR, Gomez RA, Igarashi P, Gitelman HJ, Smithies O. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5434-39.
15. Ho K, Nichols C G, Lederer J, Lytton J, Vassilev P M, Kanazirskva MV, et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; 362: 31-8.
16. Simon DB, Karet FE, Rodriguez Soriano J, Hamdan JI, DiPietro A, Trachtman H, et al. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nature Genetics* 1996; 15: 52-6.
17. Karolyi L, Konrad M, Kockertling A, Ziegler A, Zimmermann D, Roh B, et al. Mutations in the gene encoding the inwardly rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: genetic heterogeneity. International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 17-26.
18. Vollmer M, Koehler M, Topaloglu R, Strahm B, Omran H, Hildebrandt F. Two novel mutations of the gene for Kir 1.1 (ROMK) in neonatal Bartter syndrome. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 69-71.
19. Feldmann D, Alessandri JL, Deschenes G. Large deletion of the 5' end of the ROMK1 gene in antenatal Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2357-9.
20. Derst C, Wischmeyer E, Preisig-Muller R, Spauschus A, Konrad M, Hensen P, et al. A hyperprostaglandin E synthase mutation in Kir1.1 (renal outward potassium) channels reveals a crucial residue for channel function in Kir1.3 channels. *J Biol Chem* 1998; 273: 23884-91.
21. Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, et al. pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15298-303.
22. Schulte U, Derst C, Kemp AM, Koster NM, van Den Heuvel JL, Bindels RJM. Functional implications of mutations in the human renal outer medullary potassium channel (ROMK2) identified in Bartter syndrome. *Pflügers Arch* 2002; 443: 466-71.
23. Xu Z-C, Yang Y, Hebert SC. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K⁺ channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 9313-19.
24. Derst C, Konrad M, Kockertling A, Karolyi L, Deuschens G, Daut J, et al. Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired K⁺ channel function. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 641-5.
25. Schulte U, Bianchi L, Aceti EA, Brown AM. Functional consequences of ROMK mutants linked to antenatal Bartter's syndrome and implications for treatment. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 975-80.
26. Filipp TP, van M, Merot J, Welling PA. A mutation linked with Bartter's syndrome locks Kir 1.1a (ROMK1) channels in a closed state. *J Gen Physiol* 1999; 114: 685-700.
27. Kunzelmann K, Hubner M, Vollmer M, Ruf R, Hildebrandt F, Greger R, et al. A Bartter's syndrome mutation of ROMK1 exerts dominant negative effects on K(+) conductance. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10: 117-24.
28. Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics* 1997; 17: 171-8.
29. Adachi S, Uchiyama S, Ito H, Hata M, Hirose M, Marumo F, et al. Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J Biol Chem* 1994; 269: 17677-83.
30. Konrad M, Vollmer M, Lemmink III, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, et al. Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1449-59.
31. Brennan TM, Landau D, Shalev H, Lamb F, Schutte BC, Walder RY, et al. Linkage of infant Bartter syndrome with sensorineural deafness to chromosome 1p. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 355-61.
32. Vollmer M, Jeck N, Lemmink III, Vargas R, Feldmann D, Konrad M, et al. Antenatal Bartter syndrome with sensorineural deafness: refinement of the locus on chromosome 1p31. *Nephrol Dial Transpl* 2000; 15: 970-4.
33. Bittiger R, Dito E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Meier-Lauter J, et al. Mutation of BSN2 causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001; 29: 310-4.
34. Hegerl R, Dostger T, Stein V, Birkenhager R, Otto E, Hildebrandt F et al. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* 2001; 414: 558-61.
35. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulín P, Houillier P, Jeunenmaitre X, Paillard M, et al. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcaemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 226-66.
36. Watanabe S, Fukumoto S, Chang H, Takeuchi Y, Hasegawa Y, Okazaki R, et al. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet* 2002; 360: 593-4.
37. Konrad M, Leonhardt A, Hensen P, Seyberth HW, Kockertling A. Prenatal and postnatal management of hyperprostaglandin E syndrome after genetic diagnosis from amniocentes. *Pediatrics* 1999; 103: 678-83.

38. Shaer AJ. Inherited primary renal tubular hypokalaemic alkalosis: a review of Gitelman and Bartter syndromes. *Am J Med Sci* 2001; 322: 316-32.
39. Peters SL, Jeck N, Reinatter S, Leonhardt A, Tomshoff H, Klaus GG, et al. Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalaemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med* 2002; 112: 183-90.
40. Kurtz I. Molecular pathogenesis of Bartter's and Gitelman's syndromes. *Kidney Int* 1998; 54: 1396-1410.
41. Jeck N, Reinatter SC, Henne T, Marg W, Matlmann R, Pavel K, et al. Hypokalaemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics* 2001; 108: E5.
42. Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SH, Hayama A, et al. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the Cl⁻/K⁺ chloride channel. *Nat Genet* 1999; 21: 93-8.
43. Calò L, Ceolotto G, Milani M, Pagnin E, van den Heuvel LP, Sartori M, et al. Abnormalities of Gq-mediated cell signaling in Bartter and Gitelman syndromes. *Kidney Int* 2001; 60: 882-9.
44. Lu M, Wang T, Yan Q, Yang X, Dong K, Knepper MA, et al. Absence of small conductance K⁺ channel (SK) activity in apical membranes of thick ascending limb and cortical collecting duct in ROMK (Bartter's) knockout mice. *J Biol Chem* 2002; 277: 37881-7.
45. Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Dotschman T, et al. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem* 2002; 277: 37871-80.
46. Weda CB, Bragin A, Kleyman TR, Saitlin LM. Flow-dependent K⁺ secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F786-F793.
47. Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone disease. *Nature* 1996; 379: 445-9.
48. Uchida S. In vivo role of ClC chloride channels in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F802-8.
49. Filson DM. Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F616-25.
50. Gitelman H J, Graham JH, Welt LG. A new family disorder characterized by hypokalaemia and hypomagnesaemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1966; 79: 221-35.
51. Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson-Bla M, Ellison D, Karet FE, Money-Molton A, et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 1996; 12: 24-30.
52. Zeljkovic I, Szargel R, Hawash A, Labay V, Hatib I, Cohen N, et al. A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB1, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes. *Kidney Int* 2003; 63: 24-32.

Reimpresas:

Patricia Meade
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
 Salvador Zubirán
 Vasco de Quiroga No. 15
 Tlalpan 14000, México, D.F.
 Tel.: 5573-1200 Ext. 2511
 Fax: 5655-0382
 Correo electrónico: patymeade@hotmail.com

Recibido el 15 de noviembre de 2002.
 Aceptado el 9 de enero de 2003.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

1. **Abdel A, Badawi MH, Yaesh SA, Habib YQ, al Khuffash FA, al Ghanim MM and al Najidi AK.** Bartter's syndrome in Arabic children: review of 13 cases. *Pediatr Int* 41: 299-303, 1999.
2. **Amlial H, Legoff C, Vernimmen C, Paillard M and Bichara M.** Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 271: C455-C463, 1996.
3. **Ammar A, Schmidt A, Semmekrot B, Roseau S and Butlen D.** Receptors for neurohypophyseal hormones along the rat nephron: ¹²⁵I- labelled d(CH₂)₅[Tyr(Me)₂, Thr⁴, Orn⁸, Tyr-NH(2)⁹] vasotocin binding in microdissected tubules. *Pflügers Arch* 418: 220-227, 1991.
4. **Attmane-Elakeb A, Mount DB, Sibella V, Vernimmen C, Hebert SC and Bichara M.** Stimulation by *in vivo* and *in vitro* metabolic acidosis of expression of rBSC-1, the Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter of the rat medullary thick ascending limb. *J Biol Chem* 273: 33681-33691, 1998.
5. **Attmane-Elakeb A, Amlial H and Bichara M.** Ammonium carriers in medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F1-F9, 2001.
6. **Attmane-Elakeb A, Sibella V, Vernimmen C, Belenfant X, Hebert SC and Bichara M.** Regulation by glucocorticoids of expression and activity of rBSC1, the Na-K(NH₄)-2Cl cotransporter of medullary thick ascending limb. *J Biol Chem* 275: 33548-33553, 2000.
7. **Bach I and Yaniv M.** More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J* 12: 4229-4242, 1993.
8. **Bailly C.** Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int* 53 (Suppl. 65): S-29-S-35, 1998.
9. **Bartter FC, Pronove P, Gill JR Jr. and MacCardle RC.** Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. 1962. *J Am Soc Nephrol* 9: 516-528, 1998.
10. **Baum M.** Evidence that parallel Na-H and Cl-HCO₃(OH) antiporters transport NaCl in the proximal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 252: F338-F345, 1987.

11. **Beach RE and Good DW.** Effect of adenosine on ion transport in rat medullary thick ascending limb. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 263: F482-F487, 1992.
12. **Behrends S, Harteneck C, Schultz G and Koesling D.** A variant of the α_2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclase and function as a dominant negative protein. *J Biol Chem* 270: 21109-21113, 1995.
13. **Berry CA and Rector FC.** Mechanism of proximal NaCl reabsorption in the proximal tubule of the mammalian kidney. *Sem Nephrol* 11: 86-97, 1991.
14. **Berry CA and Rector FC.** Renal transport of glucose, aminoacids, sodium, chloride and water. In: The kidney, edited by Brenner B M and Rector F J. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1991, p. 245-282.
15. **Bettinelli A, Ciarmatori S, Cesareo L, Tedeschi S, Ruffa G, Appiani AC, Rosini A, Grumieri G, Mercuri B, Sacco M, Leozappa G, Binda S, Ceconi M, Navone C, Curcio C, Syren ML and Casari G.** Phenotypic variability in Bartter syndrome type I. *Pediatr Nephrol* 14: 940-945, 2000.
16. **Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz J, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jack N, Konrad M, Landau D, Knoers NV, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A and Hildebrandt F.** Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 29: 310-314, 2001.
17. **Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M and Houillier P.** Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 59: 2206-2215, 2001.
18. **Brennan TM, Landau D, Shalev H, Lamb F, Schutte BC, Walder RY, Mark AL, Carmi R and Sheffield VC.** Linkage of infantile Bartter syndrome with sensorineural deafness to chromosome 1p. *Am J Hum Genet* 62: 355-361, 1998.
19. **Brenner BM, Troy JL, Daugharty TM and Macinnes RM.** Quantitative importance of changes in postglomerular colloid osmotic pressure in mediating glomerulotubular balance in the rat. *J Clin invest* 52: 190-197, 1973.
20. **Breyer MD, Davis L, Jacobson HR and Breyer RM.** Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *Am J Physiol* 270: F912-F918, 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

21. **Breyer MD, Jacobson HR, Davis LS and Breyer RM.** In situ hybridization and localization of mRNA for the rabbit prostaglandin EP3 receptor. *Kidney Int* 44: 1372-1378, 1993.
22. **Breyer MD, Zhang Y, Guan YF, Hao CM, Hebert RL and Breyer RM.** Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney Int Suppl* 67: S88-S94, 1998.
23. **Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hedliger MA, Lytton J and Hebert SC.** Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575-580, 1993.
24. **Burg MB.** Thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int* 22: 454-464, 1982.
25. **Burg MB and Green N.** Function of the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 224: 659-668, 1973.
26. **Burg MB.** Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 268: F983-F996, 1995.
27. **Caron L, Rousseau F, Gagnon E and Isenring P.** Cloning and functional characterization of a cation C1-cotransporter interacting protein. *J Biol Chem* 275: 32027-32036, 2000.
28. **Chan KW, Sui JL, Vivaudou M and Logothetis DE.** Specific regions of heteromeric subunits involved in enhancement of G protein-gated K^{+} channel activity. *J Biol Chem* 272: 6548-6555, 1997.
29. **Chapell R, Bueno OF, Alvarez-Hernandez X, Robinson LC and Leidenheimer NJ.** Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 273: 32595-32601, 1998.
30. **Cormack BP, Valdivia RH and Falkow S.** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38, 1996.
31. **Culpepper RM and Andreoli TE.** PGE2, forskolin, and cholera toxin interactions in modulating NaCl transport in mouse mTALH. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 247: F784-F792, 1984.
32. **de Wardener HE.** The control of sodium excretion. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 235: F163-F173, 1978.

33. **de Wardener HE, Mills IH, Clapham WF and Hayter CJ.** Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the intravenous administration of saline in the dog. *Clin Sci* 21: 249-258, 1961.

34. **Delpire E, Rauchman MI, Beler DR, Hebert SC and Gullans SR.** Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (miMCD-3) cells. *J Biol Chem* 269: 25677-25683, 1994.

35. **Demolombe S, Baró I, Péron Y, Bilek J, Mohammad-Panah R, Pollard H, Morid S, Mannens M, Wilde A, Barhanin J, Charpentier F and Escande D.** A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J Biol Chem* 273: 6837-6843, 1998.

36. **Derst C, Wischmeyer E, Preisig-Muller R, Spauschus A, Konrad M, Hensen P, Jeck N, Seyberth HW, Daut J and Karschin A.** A hyperprostaglandin E syndrome mutation in Kir1.1 (renal outer medullary potassium) channels reveals a crucial residue for channel function in Kir1.3 channels. *J Biol Chem* 273: 23884-23891, 1998.

37. **Di Stefano A, Wittner M, Nitschke R, Braitsch R, Greger R, Bailly C, Amiel C, Elalouf J M, Roinel N and de Rouffignac C.** Effects of glucagon on Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} transports in cortical and medullary thick ascending limb of mouse kidney. *Pflugers Arch* 414: 640-646, 1989.

38. **Di Stefano A, Wittner M, Nitschke R, Braitsch R, Greger R, Bailly C, Amiel C, Roinel N and de Rouffignac C.** Effects of parathyroid hormone and calcitonin on Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse kidney. *Pflugers Arch* 417: 161-167, 1990.

39. **DiBona GF and Sawin LL.** Effect of renal nerve stimulation on NaCl and H_2O transport in Henle's loop of the rat. *Am J Physiol* 243: F576-F580, 1982.

40. **Ecelbarger CA, Terris J, Hoyer JR, Nielsen A, Wade JB and Knepper MA.** Localization and regulation of the rat renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter, BSC1. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 271: F619-F628, 1996.

41. **Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB and Knepper MA.** Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol* 171: 227-234, 2001.

42. **Edwards A, DeLong MJ and Pallone TL.** Interstitial water and solute recovery by inner medullary vasa recta. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F257-F269, 2000.

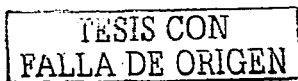
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

43. **Escalante B, Eriij D, Falck JR and McGiff JC.** Effect of cytochrome P450 arachidonate metabolites on ion transport in rabbit kidney loop of Henle. *Science* 251: 799-802, 1991.
44. **Escalante B, Eriij D, Falk JR and McGiff JC.** Cytochrome P-450 arachidonate metabolites affect ion fluxes in rabbit medullary thick ascending limb. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 266: C1775-C1782, 1994.
45. **Escalante B, Ferreri NR, Dunn CE and McGiff JC.** Cytokines affect ion transport in primary cultured thick ascending limb of Henle's loop cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 266: C1568-C1576, 1994.
46. **Eveloff J and Calamia J.** Effect of osmolarity on cation fluxes in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 250: F176-F180, 1986.
47. **Eveloff J and Kinne R.** Sodium-chloride transport in the medullary thick ascending limb of Henle's loop: evidence for a sodium-chloride cotransport system in plasma membrane vesicles. *J Membr Biol* 72: 173-181, 1983.
48. **Fambrough M, Wolitzky BA, Tamkun MM and Takeyasu K.** Regulation of the sodium pump in excitable cells. *Kidney Int* 32 (suppl 23): S97-S112, 1987.
49. **Feldmann D, Alessandri JL and Deschenes G.** Large deletion of the 5' end of the ROMK1 gene causes antenatal Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9: 2357-2359, 1998.
50. **Firsov D, Mandon B, Morel A, Merot J, Le Maout S, Bellanger AC, de Rouffignac C, Elalouf JM and Buhler JM.** Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor. *Plflugers Arch* 429: 79-89, 1994.
51. **Flagg TP, Tate M, Merot J and Welling PA.** A mutation linked with Bartter's syndrome locks Kir 1.1a (ROMK1) channels in a closed state. *J Gen Physiol* 114: 685-700, 1999.
52. **Forbush III B and Palfrey HC.** [³H]Bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system. *J Biol Chem* 258: 11787-11792, 1983.
53. **Friedman PA and Andreoli TE.** CO₂-stimulated NaCl absorption in the mouse renal cortical thick ascending limb of Henle. Evidence for synchronous Na/H and Cl/HCO₃ exchange in apical plasma membranes. *J Gen Physiol* 683-711, 1982.

54. **Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F and Sasaki S.** Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361: 549-552, 1993.
55. **Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA and Hebert SC.** Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 296: 17713-17722, 1994.
56. **Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM and Hebert SC.** Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2749-2753, 1993.
57. **Gamba G.** Alternative splicing and diversity of renal transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F781-F794, 2001.
58. **Garcia-Perez A and Burg MB.** Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 71: 1081-1115, 1991.
59. **Geck P and Heinz E.** Secondary active transport: Introductory remarks. *Kidney Int* 36: 334-341, 1989.
60. **Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt BC, Pfeiffer B and Heinz E.** Electrically silent cotransport of Na^+ , K^+ and Cl^- in ehrlich cells. *Biochim Biophys Acta* 600: 432-447, 1980.
61. **Giebisch G.** Physiological roles of renal potassium channels. *Semin Nephrol* 19: 458-471, 1999.
62. **Giesen-Crouse E, Fandeleur P, Schmidt M, Schwartz J and Imbs JL.** Loop diuretics bind to distinct receptors in renal medulla and cortex. *J Hypertens Suppl* 3 Suppl 3: S211-S213, 1985.
63. **Giesen-Crouse EM, Welsch C, Imbs JL, Schmidt M and Schwartz J.** Characterization of a high affinity piretanide receptor on kidney membranes. *Eur J Pharmacol* 114: 23-31, 1985.
64. **Gillen CM, Brill S, Payne JA and Forbush III B.** Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271: 16237-16244, 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

65. **Good DW, Knepper MA and Burg MB.** Ammonia absorption by the thick ascending limb of Henle's loop. *Contrib Nephrol* 47: 110-115, 1985.
66. **Gottschalk CW and Mylle M.** Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. 1959. *J Am Soc Nephrol* 8: 153-164, 1997.
67. **Grantham JJ and Burg MB.** Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. *Am J Physiol* 211: 255-259, 1966.
68. **Greger R.** Chloride reabsorption in the rabbit cortical thick ascending limb of the loop of Henle. A sodium dependent process. *Pflügers Arch* 390: 38-43, 1981.
69. **Greger R and Schlatter E.** Presence of luminal K^+ , a prerequisite for active NaCl transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch* 392: 92-94, 1981.
70. **Greger R and Schlatter E.** Properties of the basolateral membrane on the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflügers Arch* 396: 325-334, 1983.
71. **Greger R and Schlatter E.** Properties of the lumen membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch* 396: 315-324, 1983.
72. **Greger R, Schlatter E and Lang F.** Evidence for electroneutral sodium chloride cotransport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch* 396: 308-314, 1983.
73. **Greger R.** Coupled transport of Na^+ and Cl^- in the thick ascending limb of Henle's loop of rabbit nephron. *Scand Audiol Suppl* 14 Suppl: 1-15, 1981.
74. **Greger R.** Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 65: 760-797, 1985.
75. **Greger R.** Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 65: 760-797, 1985.
76. **Grossman EB and Hebert SC.** Modulation of Na-K-ATPase activity in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. Effect of mineralocorticoids and sodium. *J Clin Invest* 81: 885-892, 1988.
77. **Guggino WB, Oberleithner H and Gleibisch G.** The amphibian diluting segment. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 254: F615-F627, 1988.



78. **Haas M, Dunham PB and Forbush III B.** [³H]Bumetanide binding to mouse kidney membranes: Identification of corresponding membrane proteins. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 260: C791-C804, 1991.
79. **Haas M and Forbush III B.** Photolabeling of a 150-kDa (Na-K-Cl) cotransport protein from dog kidney with a bumetanide analogue. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 253: C243-C250, 1987.
80. **Hall DA and Varney DM.** Effect of vasopressin on electrical potential difference and chloride transport in mouse medullary thick ascending limb of Henle's loop. *J Clin Invest* 66: 792-802, 1980.
81. **Harling H, Czaja I, Schell J and Walden R.** A plant cation-chloride co-transporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO J* 16: 5855-5866, 1997.
82. **Hebert SC and Andreoli TE.** Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 246: F745-F756, 1984.
83. **Hebert SC and Andreoli TE.** Effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle: II. Determinants of the ADH-mediated increases in transepithelial voltage and in net Cl⁻ absorption. *J Membrane Biol* 80: 221-233, 1984.
84. **Hebert SC, Brown EM and Harris HW.** Role of the Ca²⁺-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J Exp Biol* 200: 295-302, 1997.
85. **Hebert SC, Culpepper RM and Andreoli TE.** NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 241: F412-F431, 1981.
86. **Hebert SC, Culpepper RM and Andreoli TE.** NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 241: F432-F442, 1981.
87. **Hebert SC, Culpepper RM and Andreoli TE.** NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. III. Modulation of ADH effect by peritubular osmolality. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 241: F443-F451, 1981.
88. **Hebert SC, Friedman PA and Andreoli TE.** Effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle: I. ADH increases transcellular conductance pathways. *J Membrane Biol* 80: 201-219, 1984.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

89. **Hebert SC, Reeves WB, Molony DA and Andreoli TE.** The medullary thick limb: Function and modulation of the single-effect multiplier. *Kidney Int* 31: 580-588, 1987.

90. **Hebert SC and Andreoli TE.** Ionic conductance pathways in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. The paracellular pathway and electrogenic Cl- absorption. *J Gen Physiol* 87(4):567-590, 1986.

91. **Hebert SC, Culpepper RM and Andreoli TE.** NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *Am J Physiol* 241: F432-F442, 1981.

92. **Hoover RS, Poch E, Monroy A, Vazquez N, Nishio T, Gamba G and Hebert SC.** N-glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *J Am Soc Nephrol* 14: 271-282, 2003.

93. **Ichikawa I and Brenner BM.** Mechanism of inhibition of proximal tubule fluid reabsorption after exposure of the rat kidney to the physical effects of expansion of extracellular fluid volume. *J Clin Invest* 64: 1466, 1979.

94. **Igarashi P, Vanden Heuvel GB, Payne JA and Forbush III B.** Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 269: F406-F418, 1995.

95. **Igarashi P, Whyte DA, Kuhl and Nagami GT.** Cloning and kidney cell-specific activity of the promoter of the murine renal Na-K-Cl cotransporter gene. *J Biol Chem* 271: 9666-9674, 1996.

96. **Imai M and Kokko JP.** Mechanism of sodium and chloride transport in the thin ascending limb of Henle. *J Clin Invest* 58: 1054-1060, 1976.

97. **Imbert M, Chabardes D, Montegut M, Clique A and Morel F.** Vasopressin dependent adenylate cyclase in single segments of rabbit kidney tubule. *Pflugers Arch* 357: 173-186, 1975.

98. **Imbert-Teboul M, Chabardes D, Montegut M, Clique A and Morel F.** Vasopressin-dependent adenylate cyclase activities in the rat kidney medulla: evidence for two separate sites of action. *Endocrinology* 102: 1254-1261, 1978.

99. **Ito O, Kondo Y, Takahashi N, Kudo K, Igarashi Y, Omata K, Imai Y and Abe K.** Insulin stimulates NaCl transport in isolated perfused MTAL of Henle's loop of rabbit kidney. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 267: F265-F270, 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

100. **Ito O, Kondo Y, Takahashi N, Omata K and Abe K.** Role of calcium in insulin-stimulated NaCl transport in medullary thick ascending limb. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 269: F236-F241, 1995.

101. **Jamison RL and Lacy FB.** Evidence for urinary dilution by the collecting tubule. *Am J Physiol* 223: 898-902, 1972.

102. **Janecki AJ, Janecki M, Akhter S and Donowitz M.** Basic fibroblast growth factor stimulates surface expression and activity of Na/H exchanger NHE3 via mechanism involving phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275: 8133-8142, 2000.

103. **Janecki AJ, Janecki M, Akhter S and Donowitz M.** Quantitation of plasma membrane expression of a fusion protein of Na/H exchanger NHE3 and green fluorescence protein (GFP) in living PS120 fibroblasts. *J Histochem Cytochem* 48: 1479-1492, 2000.

104. **Ji HL, Chalfant ML, Jovov B, Lockhart JP, Parker SB, Fuller CM, Stanton BA and Benos DJ.** The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 275: 27947-27956, 2000.

105. **Jorgensen PL.** Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. *Physiol Rev* 60: 864-908, 1980.

106. **Jorgensen PL.** Structure, function and regulation of Na-K-ATPase in the kidney. *Kidney Int* 29: 10-20, 1986.

107. **Kaji DM, Chase Jr HS, Eng JP and Diaz J.** Prostaglandin E2 inhibits Na-K-2Cl cotransport in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 271: C354-C361, 1996.

108. **Kaplan MR, Mount DB, Delpire E, Gamba G and Hebert SC.** Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu Rev Physiol* 58: 649-668, 1996.

109. **Kaplan MR, Plotkin MD, Brown D, Hebert SC and Delpire E.** Expression of the mouse Na-K-2Cl cotransporter, mBSC2, in the terminal inner medullary collecting duct, the glomerular and extraglomerular mesangium, and the glomerular afferent arteriole. *J Clin Invest* 98: 723-730, 1996.

110. **Karolyi L, Conrad M, Köckerling A, Ziegler A, Zimmermann D, Roth B, Wieg C, Grzeschik K, Koch M, Seyberth H, Vargas R, Forestier L, Jean G, Deschaux N, Rizzoni GF, Naudet P, Antignac C, Feldmann D, Lorridon F, Cougoureux E,**

Laroze F, Alessandri JL, David L, Saunier P, Deschenes G, Hildebrandt F, Vollmer M, Proessmans W, Brandes M, van Den Heuvel LJ, Lemmink HH, Nillesen W, Monnens L, Knoers NVAM, Guay-Woodford LM, Wright CJ, Madrigal G and Hebert SC. Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes. *Hum Mol Genet* 6: 17-26, 1997.

111. Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C, Packer RK, Wade JB and Knepper MA. Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 276: F96-F103, 1999.

112. Kinne R, Koenig B, Hannafin J, Kinne-Saffran E, Scott DM and Zierold K. The use of membrane vesicles to study the NaCl/KCl cotransporter involved in active transepithelial chloride transport. *Pflügers Arch* 405 Suppl 1: S101-S105, 1985.

113. Kirchner KA. Insulin increases loop segment chloride reabsorption in the euglycemic rat. *Am J Physiol* 255: F1206-F1213, 1988.

114. Knepper MA. Molecular Physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channel by vasopressin. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 272: F3-F12, 1997.

115. Knepper MA, Nielsen S, Chou CL and DiGiovanni SR. Mechanism of vasopressin action in the renal collecting duct. *Semin Nephrol* 14: 302-321, 1994.

116. Knepper MA and Roch-Ramel F. Pathways of urea transport in the mammalian kidney. *Kidney Int* 31: 629-633, 1987.

117. Knepper MA and Star RA. The vasopressin-regulated urea transporter in renal inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 259: F393-F401, 1990.

118. Koenig B, Ricapito S and Kinne R. Chloride transport in the thick ascending limb of Henle's loop: potassium dependence and stoichiometry of the NaCl cotransport system in plasma membrane vesicles. *Pflügers Arch* 399: 173-179, 1983.

119. Kokko JP. Sodium chloride and water transport in the descending limb of Henle. *J Clin Invest* 49: 1838-1846, 1970.

120. Kokko JP. The role of the collecting duct in urinary concentration. *Kidney Int* 31: 606-610, 1987.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

121. **Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschenes G, Antignac C, Guay-Woodford L, Knoers NV, Seyberth HW, Feldmann D and Hildebrandt F.** Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 11: 1449-1459, 2000.
122. **Kurtz CL, Karolyi L, Seyberth HW, Koch MC, Vargas R, Feldmann D, Vollmer M, Knoers NV, Madrigal G and Guay-Woodford LM.** A common NKCC2 mutation in Costa Rican Bartter's syndrome patients: evidence for a founder effect. *J Am Soc Nephrol* 8: 1706-1711, 1997.
123. **Lytle C and Forbush B, III.** Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl. *Am J Physiol* 270: C437-C448, 1996.
124. **Mandon B, Siga E, Chabardes D, Firsov D, Rolnel N and de Rouffignac C.** Insulin stimulates Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, and Mg²⁺ transports in TAL of mouse nephron: cross-potentialiation with AVP. *Am J Physiol* 265: F361-F369, 1993.
125. **Marples D, Knepper M A, Christensen E I and Nielsen S.** Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 269: C655-C664, 1995.
126. **Mastrolanni N, DeFusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A and Casari G.** Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 35: 486-493, 1996.
127. **Meade P, Sabath E and Gamba G.** Fisiopatologia molecular del síndrome de Bartter. *Rev Invest Clin* 55: 74-83, 2003.
128. **Meade P, Hoover RS, Piata C, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G and Hebert SC.** cAMP-dependent activation of the renal-specific Na-K-2Cl cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1145-F1154, 2003.
129. **Mohammad-Panah R, Demolombe S, Neyroud N, Guicheney P, Kyndt F, van den HM, Baro I and Escande D.** Mutations in a dominant-negative isoform correlate with phenotype in inherited cardiac arrhythmias. *Am J Hum Genet* 64: 1015-1023, 1999.
130. **Molony DA, Reeves WB and Andreoli TE.** Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransport and the thick ascending limb. *Kidney Int* 36: 418-426, 1989.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

131. **Molony DA, Reeves WB, Hebert SC and Andreoli TE.** ADH increases apical $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 252: F177-F187, 1987.

132. **Moral Z, Dong K, Wei Y, Sterling H, Deng H, Ali S, Gu R, Huang XY, Hebert SC, Gleibisch G and Wang WH.** Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and -tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 276: 7156-7163, 2001.

133. **Morales MM, Nascimento DS, Capella MA, Lopes AG and Guggino WB.** Arginine vasopressin regulates CFTR and CIC-2 mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *Plugers Arch* 443: 202-211, 2001.

134. **Mount DB, Baekgard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DR, Gamba G and Hebert SC.** Isoforms of the Na-K-2Cl transporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 276: F347-F358, 1999.

135. **Mount DB, Delpire E, Gamba G, Hall AE, Poch E, Hoover Jr RS and Hebert SC.** The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J Exp Biol* 201: 2091-2102, 1998.

136. **Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, Geroge Jr AL, Delpire E and Gamba G.** Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16355-16362, 1999.

137. **Nakamura R, Emmanouel DS and Katz AI.** Insulin binding sites in various segments of the rabbit nephron. *J Clin Invest* 72: 388-392, 1983.

138. **Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK and Knepper MA.** Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channel to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1013-1017, 1995.

139. **Nielsen S, Pallone T, Smith BL, Christensen EI, Agre P and Maunsbach AB.** Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin and in descending vasa recta of rat kidney. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 268: F1023-F1037, 1995.

140. **Nielsen S, Terris J, Smith CP, Hediger MA, Ecelbarger CA and Knepper M A.** Cellular and subcellular localization of the vasopressin-regulated urea transporter in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5495-5500, 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

141. **Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA and Knepper MA.** Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol* 275: F885-F893, 1998.
142. **Nonoguchi H, Owada A, Kobayashi N, Takayama M, Terada Y, Koike J, Ujile K, Marumo F, Sakai T and Tomita K.** Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in terminal inner medullary collecting ducts. *J Clin Invest* 96: 1768-1778, 1995.
143. **Nonoguchi H, Tomita K and Marumo F.** Effects of atrial natriuretic peptide and vasopressin on chloride transport in. *J Clin Invest* 90: 349-357, 1992.
144. **Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM and Cidlowski JA.** The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274: 27857-27866, 1999.
145. **Ostrowski NL, Lolait SJ, Bradley DJ, O'Carroll AM, Brownstein MJ and Young WS, III.** Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology* 131: 533-535, 1992.
146. **Ott CE, Haas JA and Cucho JL.** Effect of increased peritubule protein concentration on proximal tubule reabsorption in the presence and absence of extracellular volume depletion. *J Clin invest* 55: 612, 1975.
147. **Payne JA and Forbush III B.** Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4544-4548, 1994.
148. **Payne JA, Stevenson TJ and Donaldson LF.** Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271: 16245-16252, 1996.
149. **Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D and Forbush III B.** Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. *J Biol Chem* 270: 17977-17985, 1995.
150. **Petrecca K, Atanasiu R, Akhavan A and Shrier A.** N-linked glycosylation sites determine HERG channel surface membrane expression. *J Physiol* 515 (Pt 1): 41-48, 1999.
151. **Plata C, Meade P, Hall A E, Welch RC, Vazquez N, Hebert SC and Gamba G.** Alternatively spliced isoform of the apical Na-K-Cl cotransporter gene encodes a

furosemide sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F574-F582, 2001.

152. **Plata C, Mount DB, Rubio V, Hebert SC and Gamba G.** Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL. II. Functional characterization and activation by cAMP. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 276: F359-F366, 1999.

153. **Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC and Gamba G.** Functional properties of the apical Na-K-2Cl cotransporter isoforms. *J Biol Chem* 277: 11004-11012, 2002.

154. **Preisig PA and Rector FC Jr.** Role of Na-H antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 255: F461-F465, 1988.

155. **Rector FC.** Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by proximal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 244: F461-F471, 1983.

156. **Reeves WB, McDonald GA, Mehta P and Andreoli TE.** Activation of K⁺ channels in renal medullary vesicles by cAMP-dependent protein kinase. *J Membrane Biol* 109: 65-72, 1989.

157. **Reeves WB and Molony DA.** The physiology of loop diuretic action. *Semin Nephrol* 8: 225-233, 1988.

158. **Reeves WB, Molony DA and Andreoli TE.** Diluting power of thick limbs of Henle. III. Modulation of in vitro diluting power. *Am J Physiol* 255: F1145-F1154, 1988.

159. **Reeves WB, Winters CJ and Andreoli TE.** Chloride channels in the loop of Henle. *Annu Rev Physiol* 63: 631-645, 2001.

160. **Reeves WB, Winters CJ, Zimniak L and Andreoli TE.** Properties and regulation of medullary thick limb basolateral Cl⁻ channels. *Kidney Int Suppl* 65: S24-S28, 1998.

161. **Renfro JL.** Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. *Am J Physiol* 228: 52-61, 1975.

162. **Renfro JL.** Interdependence of active Na⁺ and Cl⁻ transport by the isolated urinary bladder of the teleost, *Pseudopleuronectes americanus*. *J Exp Zool* 199: 383-390, 1978.

163. **Riccardi D and Gamba G.** The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease. *Arch Med Res* 30: 436-448, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

164. **Rocha AS and Kokko JP.** Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest* 52: 612-623, 1973.

165. **Rocha AS and Kudo LH.** Water, urea, sodium, chloride, and potassium transport in the in vitro isolated perfused papillary collecting duct. *Kidney Int* 22: 485-491, 1982.

166. **Rose BD.** Diuretics. *Kidney Int* 39: 336-352, 1991.

167. **Rose BD.** Function of the distal nephron. In: *Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders.*, edited by Rose B D. New York: McGraw Hill, 1994, p. 132-149.

168. **Sands JM.** Regulation of renal urea transporters. *J Am Soc Nephrol* 10: 635-646, 1999.

169. **Sasaki S and Imai M.** Effects of vasopressin on water and NaCl transport across the in vitro perfused medullary thick ascending limb of mouse, rat, and rabbit kidneys. *Pflugers Arch* 383: 215-221, 1980.

170. **Schafer JA.** Mechanism coupling the absorption of solutes and water in the proximal tubule. *Kidney Int* 25: 708-716, 1984.

171. **Schlatter E and Greger R.** cAMP increases the basolateral Cl⁻ conductance in the isolated perfused medullary thick ascending limb of Henle's loop of the mouse. *Pflugers Arch* 405: 367-376, 1985.

172. **Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppertsberg JP, Fakler B and Ludwig J.** pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15298-15303, 1999.

173. **Shayakul C, Steel A and Hediger MA.** Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. *J Clin Invest* 98: 2580-2587, 1996.

174. **Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y.** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea J Cell Comp Physiol* 59: 223-227, 1962.

175. **Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williamns C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales J M, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA,**

John E and Lifton RP. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics* 17: 171-178, 1997.

176. **Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, Di Pietro A, Sanjad SA and Lifton RP.** Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics* 13: 183-188, 1996.

177. **Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA and Lifton RP.** Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nature Genetics* 14: 152-156, 1996.

178. **Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet FE, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ and Lifton RP.** Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 12: 24-30, 1996.

179. **Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S and Lifton RP.** Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285: 103-106, 1999.

180. **Starremans PF, Der Kemp AM, Knoers NM, van Den Heuvel LJ and Bindels RM.** Functional implications of mutations in the human renal outer medullary potassium channel (ROMK2) identified in Bartter syndrome. *Pflügers Arch* 443: 466-472, 2002.

181. **Stokes JB.** Sodium and potassium transport by collecting duct. *Kidney Int* 38: 679-686, 1990.

182. **Stokes JB, Lee I and D'Amico M.** Sodium Chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system. *J Clin invest* 74: 7-16, 1984.

183. **Sun A, Grossman EB, Lombardi M and Hebert SC.** Vasopressin alters the mechanism of apical Cl⁻ entry from Na⁺:Cl⁻ to Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransport in mouse medullary thick ascending limb. *J Membrane Biol* 120: 83-94, 1991.

184. **Suvitayavat W, Palfrey HC, Haas M, Dunham PB, Kalmar F and Rao MC.** Characterization of the endogenous Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 266: C284-C292, 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

185. **Takaichi K and Kurokawa K.** Inhibitory guanosine triphosphate-binding protein-mediated regulation of vasopressin action in isolated single medullary tubules of mouse kidney. *J Clin Invest* 82: 1437-1444, 1988.
186. **Takeuchi K, Takahashi N, Abe T and Abe K.** Two isoforms of the rat kidney EP3 receptor derived by alternative RNA splicing: intrarenal expression co-localization. *Biochem Biophys Res Commun* 834-840, 1994.
187. **Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, Shibata Y, Yazaki Y and Hirai H.** An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J* 14: 341-350, 1995.
188. **Taniguchi S, Watanabe T, Nakao A, Seki G, Uwatoko S and Kurokawa K.** Detection and quantitation of EP3 prostaglandin E2 receptor mRNA along mouse nephron segments by RT-PCR. *Am J Physiol* 266: C1453-C1458, 1994.
189. **Tanimura A, Kurihara K, Reshkin S J and Turner R J.** Involvement of direct phosphorylation in the regulation of the rat parotid Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 270: 25252-25258, 1995.
190. **Tatsumi S, Miyamoto K, Kouda T, Motonaga K, Katali K, Ohkido I, Morita K, Segawa H, Tani Y, Yamamoto H, Taketani Y and Takeda E.** Identification of three isoforms for the Na⁺-dependent phosphate cotransporter (NaPi-2) in rat kidney. *J Biol Chem* 273: 28568-28575, 1998.
191. **Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Yang T and Marumo F.** Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 92: 2339-2345, 1993.
192. **Torikai S and Kurokawa K.** Effect of PGE2 on vasopressin-dependent cell cAMP in isolated single nephron segments. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 245: F58-F66, 1983.
193. **Torikai S, Wang MS, Klein KL and Kurokawa K.** Adenylate cyclase and cell cyclic AMP of rat cortical thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 20: 649-654, 1981.
194. **Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Tokui T, Brown D and Hediger MA.** Cloning and characterization of the urea transporter UT3: localization in rat kidney and testis. *J Clin Invest* 99: 1506-1515, 1997.

195. Vargas-Poussou R, Feldman D, Vollmer M, Konrad M, Kelly L, Van der Heuvel LPWJ, Tebouri L, Brandis M, Karolyi L, Hebert SC, Lemmink HH, Deschènes G, Hildebrandt F, Seyberth HW, Guay-Woodford LM, Knoers NVAM and Antignac C. Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for antenatal Bartter syndrome. *Am J Hum Genet* 62: 1332-1340, 1998.

196. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaitre X, Pailhard M, Plianelles G, Dechaux M, Miller RT and Antignac C. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13: 2259-2266, 2002.

197. Velazquez H and Wright FS. Effects of diuretic drugs on Na, Cl and K transport by rat renal distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 250: F1013-F1023, 1986.

198. Vollmer M, Jeck N, Lemmink HH, Vargas R, Feldmann D, Konrad M, Beekmann F, van den Heuvel LP, Deschenes G, Guay-Woodford LM, Antignac C, Seyberth HW, Hildebrandt F and Knoers NV. Antenatal Bartter syndrome with sensorineural deafness: refinement of the locus on chromosome 1p31. *Nephrol Dial Transplant* 15: 970-974, 2000.

199. Vollmer M, Koehrer M, Topaloglu R, Strahm B, Omran H and Hildebrandt F. Two novel mutations of the gene for Kir 1.1 (ROMK) in neonatal Bartter syndrome. *Pediatr Nephrol* 12: 69-71, 1998.

200. Winters CJ, Reeves WB and Andreoli TE. A survey of transport properties of the thick ascending limb. *Sem Nephrol* 11: 236-247, 1991.

201. Wirz H. Der osmotische druck des blutes in der nierenpapille. *Helv Physiol Acta* 11: 20-29, 1953.

202. Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz Jr E and Forbush III B. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2201-2205, 1994.

203. Xu ZC, Yang Y and Hebert SC. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K⁺ channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 271: 9313-9319, 1996.

204. Yang T, Huang YG, Singh I, Schnermann J and Briggs JP. Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 271: F931-F939, 1996.

205. **Yang B and Verkman AS.** Urea transporter UT3 functions as an efficient water channel. Direct evidence for a common water/urea pathway. *J Biol Chem* 273: 9369-9372, 1998.
206. **Yerby TR, Vibat CRT, Sun D, Payne JA and O'Donnell ME.** Molecular characterization of the Na-K-Cl cotransporter of bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 273: C188-C197, 1997.
207. **You G, Smith CP, Kanai Y, Lee WS, Stelzner M and Hediger MA.** Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. *Nature* 365: 844-847, 1993.
208. **Zhang C, Sands JM and Klein JD.** Vasopressin rapidly increases phosphorylation of UT-A1 urea transporter in rat IMCDs through PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F85-F90, 2002.
209. **Zimmer M.** Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 102: 759-781, 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN