



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN COTRANSPORTADOR DE
 K^+Cl^- DE *Hydra vulgaris* EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SÁNCHEZ HERNÁNDEZ MARIANA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ADRIANA PATRICIA MERCADO CABRERA

ADSCRIPCIÓN: INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ



ASESOR INTERNO:

DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

Ciudad de México, Mayo 2019.



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.

Gracias a:

Mis padres por el esfuerzo y apoyo que me han brindado.

A la Dra. Adriana por la oportunidad de estar en su laboratorio, por su gran paciencia y sobre todo por brindarme su confianza y amistad.

A la Dra. Paola por sus enseñanzas, la confianza y la amistad que me brindo.

Al Dr. Hugo por aceptar ser parte de este proyecto.

A Isabel por siempre animarme para continuar adelante.

A mi hermana, a Lucrecia y a Mercedes por cooperarme siempre.

A todos los amigos que pude conocer en este camino, especialmente a Alejandra†, Venus, Eduardo, Jessica Estefanía, Monse y a Hugo.

A todos los que forman parte del equipo de investigación del Dr. Gerardo Gamba en el INCMNSZ e INC.

Y sobre todo gracias a la Fes-Zaragoza, UNAM. Por ofrecerme la oportunidad de ser parte de ella.

INDICE	Pág.
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Transporte pasivo.....	2
Transporte activo.....	3
Uniporte.....	3
Cotransporte o simporte.....	4
Contratransporte o antiporte.....	4
Proteínas transmembrana.....	4
Cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloro (CCC).....	5
Regulación de la fosforilación de los KCC.....	7
CCC en organismos no vertebrados.....	8
Cotransportador de K^+Cl^- en <i>Hydra vulgaris</i>	8
Características de la clase Hydrozoa.....	9
Clasificación de <i>Hydra vulgaris</i>	9
Planteamiento del problema.....	11
Justificación.....	11
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	12
Metodología.....	13
Obtención de cDNA del cotransportador de K^+Cl^- de <i>Hydra vulgaris</i> (hvKCC).....	13
Generación de las clonas mutantes del hvKCC de <i>Hydra vulgaris</i> para mimetizar fosforilación/ defosforilación.....	13
PCR para comparar el cotransportador de <i>Hydra vulgaris</i> con los KCC de mamífero.....	15

Linearización del cDNA.....	17
Obtención del cRNA.....	17
Inyección del cRNA de hvKCC de <i>Hydra vulgaris</i> en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	17
Experimento funcional.....	19
Análisis de proteínas por Western blot.....	21
Análisis estadístico.....	21
Resultados y discusión.....	22
Conclusión.....	45
Referencias bibliográficas.....	46

RESUMEN

Introducción. El mantenimiento constante de las condiciones del entorno es fundamental para el desarrollo de la vida celular. De modo que los organismos han desarrollado la habilidad para regular y mantener las condiciones de su medio interno dentro de unos límites muy estrechos. Estos incluyen mecanismos que permiten regular finamente las condiciones del medio interno, manteniéndolas estables. Uno de ellos es el cotransporte de K^+Cl^- , del cual se han identificado cuatro isoformas en vertebrados denominadas KCC1-4 (cotransportadores electroneutros) y que a su vez son regulados por un sistema de fosforilación/desfosforilación. Existe poca información de este sistema de transporte en organismos no bilaterales y su importancia en la regulación del volumen celular y el transporte de iones. Recientemente se ha identificado la secuencia de un KCC endógeno en el cnidario dulceacuático *Hydra vulgaris* (hvKCC) con alta similitud a los KCCs de mamífero. En el presente trabajo se informa la caracterización funcional de este transportador.

Metodología. A partir de la clona silvestre de hvKCC, se generaron las clonas fosfomimética (T892D) y fosfoablativa (T892A), mediante mutagénesis dirigida con iniciadores específicos. Posteriormente, ovocitos defoliculados de *Xenopus laevis* fueron microinyectados con el cRNA de hvKCC silvestre o mutantes en incubados en medio isotónico durante 48 horas. La captación de $^{86}Rb^+$ se determinó en ausencia de sodio en condiciones isotónicas (~210 mOsm/kg) e hipotónicas (~110 mOsm/kg) y en presencia de agentes activadores e inhibidores conocidos del transporte de K^+Cl^- . La captación de cada ovocito se midió en un contador beta de centelleo líquido. A su vez, se realizó ensayos de Western blot a partir de ovocitos microinyectados con hvKCC usando los anticuerpos HA para identificar a la proteína total, así como el fosfoanticuerpo pT892 y β -actina como control de carga. Los extractos de proteína total se sometieron a inmunoblots en geles de poliacrilamida al 8% SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) y su presencia se detectó mediante quimioluminiscencia por autoradiografía (Image Studio Li-Cor).

Resultados. Los análisis funcionales revelaron que, en condiciones hipotónicas, ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el cRNA (ARN complementario) del hvKCC muestran un mecanismo de captación de $^{86}Rb^+$ dependiente de Cl^- significativamente mayor que en condiciones isotónicas (~4 veces). La activación de hvKCC mediante hinchamiento celular se previene mediante la inhibición de la proteína fosfatasa 1 con calculina A (Cal A) y su coexpresión con la proteína cinasa WNK1. En isotonicidad, el cotransportador endógeno de *Hydra vulgaris* muestran un mecanismo de captación de $^{86}Rb^+$ después de su activación por el agente alquilante de grupos tiol, N-etilmaleimida (NEM) y el inhibidor de proteínas cinasas WNK (WNK463). El Western blot reveló una banda de ~115 kDa, correspondiente al hvKCC total que se defosforila en hipotonicidad y en presencia de WNK463, mientras que aumenta la fosforilación cuando hvKCC es tratado con Cal A o coinyectado con la cinasa WNK1. Por su parte en los ovocitos hvKCC expuestos a isotonicidad y tratados con NEM hay una disminución en los niveles de fosforilación. En coinyección con WNK1, aumenta la fosforilación de hvKCC que se reduce significativamente al ser tratado con WNK463.

Conclusiones. El cotransportador endógeno de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* es activado por hipotonicidad y NEM, es sensible a inhibidores de proteínas fosfatasas y cinasas del tipo WNKs, sugiriendo que el mecanismo de cotransporte de iones está establecido en el genoma desde eucariontes tempranos para regular el transporte iónico y volumen celular a través de un complejo que involucra la presencia de cinasas y fosfatasas.

INTRODUCCIÓN

El contenido de una célula está rodeado por una membrana plasmática que marca el límite con el medio externo. La membrana plasmática es una película continua formada por moléculas de lípidos, proteínas e hidratos de carbono que actúa como barrera semipermeable y selectiva regulando la composición química de la célula (Curtis H, *et al.*, 2008).

Las células requieren nutrientes del exterior y deben eliminar sustancias de desecho procedentes del metabolismo para mantener su medio interno estable. La membrana presenta una permeabilidad selectiva, ya que permite el paso de pequeñas moléculas. La mayor parte de los iones y moléculas solubles en agua son incapaces de cruzar de forma espontánea esta barrera, y precisan de proteínas transportadoras especiales o de canales proteicos. De este modo, la célula mantiene concentraciones de iones y moléculas pequeñas distintas a las del medio externo (Raisman, 2000).

El paso a través de la membrana ocurre mediante dos procesos generales:

Transporte pasivo: Se produce con liberación de energía y a favor de un gradiente electroquímico. El movimiento se da desde un potencial electroquímico mayor hacia donde el potencial es menor. La energía final es menor que la energía inicial. Los mecanismos de transporte pasivo son:

Difusión simple, difusión facilitada y ósmosis.

Difusión Simple. Este tipo de transporte lo presentan sustancias sin carga y su diferencia de concentración es el principal responsable del flujo. Una sustancia pasa por difusión simple cuando atraviesa una membrana desde un sitio donde el potencial químico (concentración) es mayor hacia un sitio donde el potencial químico es menor, sin requerir ninguna ayuda para el paso. Por lo tanto, la difusión simple es el pasaje a través de una membrana a favor de su gradiente de concentración, sin requerir la presencia de mecanismos moleculares de membrana o transportadores (Raisman, 2000).

Difusión Facilitada. Es el movimiento de solutos a través de proteínas de transporte en la membrana plasmática. A pesar de que la difusión facilitada implica proteínas de transporte, es considerada como transporte pasivo porque el soluto se está moviendo hacia abajo del gradiente de concentración (Raisman, 2000).

Las pequeñas moléculas no polares pueden difundirse fácilmente a través de la membrana celular. Sin embargo, debido a la naturaleza hidrófoba de los lípidos que la componen, las moléculas polares (agua) y los iones no pueden hacerlo. En su lugar, se difunden a través de la membrana por medio de las proteínas de transporte. Estas proteínas se extienden por toda la membrana y permiten que ciertas moléculas o iones se difundan a través de ella. Las proteínas de canal, las proteínas de canal con compuerta y las proteínas transportadoras son tres tipos de

proteínas de transporte que están involucradas en la difusión facilitada (Cherak, *et al.*, 2016).

Ósmosis. Es la difusión de moléculas de agua a través de una membrana selectivamente permeable de un área de mayor concentración a un área de menor concentración. El agua se mueve dentro y fuera de las células por medio de la ósmosis. Si una célula está en una solución hipertónica, la solución tiene una concentración de agua más baja que el citosol de la célula y el agua se mueve hacia fuera de la célula hasta que ambas soluciones son isotónicas. Las células colocadas en una solución hipotónica absorberán agua del otro lado de la membrana hasta que la solución externa y el citosol sean isotónicos (Curtis, *et al.*, 2008).

Transporte activo: Se produce en contra de un gradiente electroquímico y consume energía. El movimiento se da desde un potencial electroquímico menor hacia donde el potencial electroquímico es mayor. La energía final es mayor a la energía inicial. El transporte activo se puede dividir en primario y secundario.

Transporte activo primario. En el transporte activo primario la energía procede directamente de la escisión del trifosfato de adenosina (ATP) o de algún otro compuesto de fosfato de alta energía. Entre las sustancias que se transportan mediante transporte activo primario están Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , H^+ y Cl^- y algunos otros iones. El mecanismo de transporte activo que se ha estudiado con mayor detalle es la bomba de sodio-potasio (Na^+/K^+ -ATPasa), que es el proceso de transporte que bombea iones de Na^+ hacia fuera a través de la membrana celular de todas las células y al mismo tiempo iones K^+ desde el exterior hacia el interior. Esta bomba es responsable de mantener las diferencias de concentración de Na^+ y K^+ a través de la membrana celular, así como de establecer un voltaje eléctrico negativo en el interior de las células (Cherak, *et al.*, 2016).

Transporte activo secundario. En este tipo de transporte, la fuerza de conducción se obtiene de la energía almacenada en forma de las diferencias de concentración iónica entre ambos lados de la membrana, que se originaron del transporte activo primario (Guyton y Hall, 2002).

Los transportadores activos secundarios son: uniporte, cotransporte o simporte, contratransporte o antiporte.

Uniporte: Este tipo de transporte de proteínas facilita el modo de difusión al proporcionar un transporte de solutos mediado por acarreadores a través del gradiente de concentración, acelerando una reacción que ya está favorecida termodinámicamente. La proteína acarreadora uniporte permite el transporte del soluto no difusible a través de la barrera de membrana a una velocidad que es mucho más alta que la difusión pasiva en la que la molécula de soluto nunca está en contacto con el núcleo hidrofóbico de la membrana. Un ejemplo es el transportador de glucosa GLUT1, que se encuentra dentro de la membrana plasmática de varias células. Es una proteína de membrana de 12 hélices alfa que

permite el movimiento de una molécula de glucosa por ciclo en el citosol de la célula para ser metabolizada y utilizada como energía en procesos celulares (Cherak, *et al.*, 2016).

Cotransporte o simporte: En este tipo de transporte una sustancia pasa en contra de su gradiente electroquímico, recibiendo la energía que libera otra sustancia que pasa a favor de su gradiente electroquímico. Ambas sustancias se mueven en el mismo sentido. Son específicos, saturables, pueden sufrir inhibición, predominantemente metabólica. Ciertas sustancias que impidan la formación de ATP, ya sea a nivel oxidativo o de sustrato, inhibirán este transporte. Si bien no se usa directamente el ATP, sí es necesario para producir un gradiente electroquímico de la sustancia que pasa a favor de gradiente.

Contratransporte o antiporte: Este proceso es similar al cotransporte; la diferencia radica en que, en éste, ambas sustancias pasan en sentidos contrarios. En muchas células existe una proteína transportadora que introduce Na^+ en la célula a favor del gradiente de concentración y extrae Ca^{+2} en contra, esta se denomina intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. Dado que en el medio extracelular la concentración de Na^+ es alta, este catión tiende a ingresar a la célula, y debido a que la concentración de Ca^{+2} en el interior celular es menor respecto al exterior, el Ca^{+2} requiere acoplarse al Na^+ para poder ser transportado (Rigalli, 2017).

Proteínas transmembrana

Las proteínas de membrana pueden ser extrínsecas o intrínsecas. Las extrínsecas se encuentran enteramente fuera de la membrana, pero unidas a ella por uniones tipo puente H^+ , van der Waals o iónicas. Las intrínsecas están embebidas en la membrana. Muchas se extienden desde una cara a la otra de la membrana y se conocen como proteínas transmembrana (Raisman, 2000). En general, estas proteínas poseen tres tipos de dominios: dos hidrofílicos y uno hidrofóbico. Los dominios hidrofílicos, localizados en los extremos amino y carboxilo-terminales pueden proyectarse al medio externo o hacia el citoplasma y flanquean un dominio central hidrofóbico que puede estar formado desde uno a varios segmentos que atraviesan la membrana plasmática. Las funciones son muy variadas, pero destacan el intercambio de iones, entre ellos, Ca^{+2} , Na^+ o K^+ , en ambos lados de la membrana semejante a lo que hacen las bombas de iones y los canales iónicos, los cuales permiten gradientes que hacen posible la síntesis de ATP, lo cual permiten el cruce de moléculas, por ejemplo, la glucosa. Algunas participan en la comunicación celular y actúan como receptores de señales los que reconocen los factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas y otros (Zhao, *et al.*, 2014).

Cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a Cl⁻ (CCC/SLC12A)

La familia SLC12A (Solute Carrier Family 12) de cotransportadores electroneutros acoplados a cloro (CCC), son transportadores de iones activos secundarios debido a que utilizan el gradiente generado por el transporte activo primario a través de la Na⁺/K⁺-ATPasa. Esta familia se divide en dos ramas. La primera incluye aquellas proteínas que transportan Na⁺ acoplado a Cl⁻ dentro de la célula: dos cotransportadores de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ (SLC12A1/NKCC2 y SLC12A2/NKCC1) y el cotransportador de Na⁺:Cl⁻ (SLC12A3/NCC). La segunda rama incluye a los cotransportadores de K⁺:Cl⁻ (SLC12A4-7/KCC1-4) que transportan potasio acoplado a cloro fuera de la célula y están ampliamente expresados en el organismo, Figura 1 (Mercado, et al., 2004; Mercado y Melo Z, 2014).

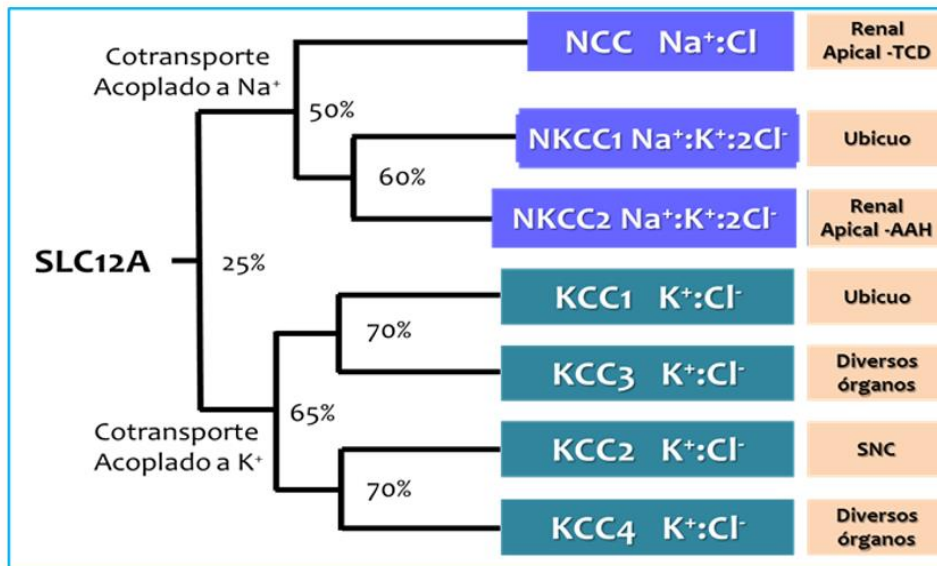


Figura 1: Árbol filogenético de la familia SLC12A. Se subdivide en dos ramas, la primera compuesta de tres miembros que codifican para cotransportadores que utilizan Na⁺ como catión para acoplarse al transporte de Cl⁻ (NCC, NKCC1 y NKCC2). La otra rama está compuesta por cuatro miembros que codifican para cotransportadores que solamente emplean K⁺ como catión acoplado al Cl⁻ (KCC1 a KCC4). Modificado de Mercado y Melo. 2014

El Na⁺ que entra a la célula a través de los NKCC es expulsado por la Na⁺/K⁺-ATPasa, mientras que el K⁺ que sale a través de los KCC es regresado a la célula por la misma bomba. Por lo tanto, el resultado neto de la función de los cotransportadores es la concentración o dilución del Cl⁻ intracelular (de los Heros, *et al.*, 2006).

Las células conservan un volumen constante a base de mantener el equilibrio osmolar con el medio exterior. Cuando suceden cambios en la osmolaridad de alguno de los compartimentos, se produce un movimiento de agua a favor de su gradiente, con lo que el volumen celular aumenta o disminuye. La disminución de la osmolaridad extracelular se acompaña de un aumento en el tamaño de la célula, mientras que a mayor osmolaridad extracelular la célula se encoge. Debido a la intensa actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en la mayoría de las células los cambios en la osmolaridad y, por ende, en el volumen celular, se asocian con cambios en la concentración de cloro intracelular y es aquí en donde los cotransportadores juegan un papel importante. Se ha demostrado claramente que los NKCC se activan durante el encogimiento celular, con el fin de aumentar la osmolaridad intracelular para recuperar el volumen original (de los Heros, et al., 2014). Por otra parte, los KCC son transportadores que se activan durante el hinchamiento celular, con el objeto de disminuir la osmolaridad intracelular y así, recuperar el volumen original (Gamba, 2005; Joiner, et al., 2007).

Por su habilidad para cambiar la concentración intracelular de Cl^- , otra de las funciones importantes de tipo célula-tejido específico en la que está involucrada esta familia de cotransportadores, es en determinar el tipo de respuesta a ciertos neurotransmisores que se unen a receptores acoplados a canales de Cl^- (Delpire, 2000; Lang, et al., 1998). Por ejemplo, en el período prenatal, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) se comporta como un neurotransmisor excitador ya que las neuronas en esta etapa de la vida poseen una concentración intraneuronal de cloro elevada. Esto es debido a la intensa actividad del cotransportador NKCC1 y a la casi nula función del cotransportador KCC2, en las neuronas GABAérgicas. Este neurotransmisor actúa al unirse a un receptor acoplado a un canal de Cl^- . Al abrirse el canal y debido a que el potencial de este anión es mayor dentro de la neurona, el Cl^- sale a favor de su gradiente, despolarizando a la neurona y generando un potencial de acción. En cambio, después del nacimiento, GABA se vuelve inhibidor debido a que la actividad de los cotransportadores se invierte. Es decir, disminuye la actividad del NKCC1 y aumenta la de KCC2, el cual se encarga de sacar Cl^- de la célula, con lo que convierte el potencial de este ion en negativo (de los Heros, et al., 2014).

Se ha sugerido que la actividad de los miembros de la familia SLC12A, se encuentra regulada por procesos de fosforilación/desfosforilación. La desfosforilación activa a los cotransportadores de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ e inhibe a los de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$, mientras que la fosforilación inactiva a los KCC y activa a los NKCC. Es por ello que se ha propuesto que los cotransportadores electroneutros comparten una vía de señalización común, ya que los estímulos que activan a una rama de la familia inhiben a la otra y viceversa (Lang, et al., 1998).

Regulación de la fosforilación de los KCC

Como se mencionó previamente, la actividad de los cotransportadores electroneutros acoplados a cloro está coordinada y regulada recíprocamente. La fosforilación activa los NKCC e inhibe a los KCC, mientras que la desfosforilación tiene efectos opuestos. La modulación de la concentración de Cl^- en respuesta al desafío osmótico es rápida, y se produce en minutos (Joiner, *et al.*, 2007; Lang, *et al.*, 1998). La activación de los KCC seguida de estrés hipotónico es suprimida por el inhibidor de proteínas fosfatasas, caliculina A, lo que sugiere un papel esencial de la fosforilación del cotransportador para su funcionamiento (Adragna, *et al.*, 2004). Este mecanismo homeostático se conserva ampliamente en especies que van desde *Caenorhabditis elegans* hasta humanos (Adragna, *et al.*, 2004; Hass, *et al.*, 2000; Strange, *et al.*, 2006).

En 2009, Rinehart. *et al.*, identificaron dos sitios de fosforilación en KCC3 que regulan su actividad. El alto grado de fosforilación en las treoninas 991 y 1048 (T991, T1048) inhiben la actividad de KCC3 en la membrana plasmática y las mutaciones que evitan la fosforilación en estos sitios dan como resultado una activación constitutiva. La relevancia fisiológica de la fosforilación regulada en estos sitios en respuesta aguda al estrés hipotónico parece clara ya que, tanto en cultivo de células renales como en eritrocitos humanos tienen una alta fosforilación en condiciones isotónicas en las que la actividad de KCC es baja, y estos sitios se desfosforilan rápidamente, en paralelo a la inducción de la actividad de transporte.

Así pues, el aumento del volumen celular, las concentraciones intracelulares altas de Cl^- y la presencia de proteínas fosfatasas, estimulan el transporte a través de los KCC, mientras que la disminución del volumen celular, las concentraciones bajas de Cl^- intracelular y la presencia de inhibidores de las proteínas fosfatasas que promueven la fosforilación, producen el efecto contrario. En esta vía de señalización, se ha demostrado que el aumento del volumen celular y/o los cambios en la concentración de Cl^- intracelular, regulan la función de una familia de cinasas WNK intracelulares que a su vez regulan la función de los cotransportadores electroneutros (de los Heros, *et al.*, 2006).

Las cinasas WNK constituyen una familia de cinasas de serina/treonina identificadas en el año 2000 (Xu, *et al.*, 2000). Fueron llamadas WNK (With No lysine=K) debido a que en el sitio catalítico del dominio cinasa presentan la sustitución de un residuo de lisina por una cisteína. Es decir, no tienen la lisina clásica en el sitio catalítico, conservada en el resto de las cinasas de serina/treonina. Existen cuatro miembros identificados: WNK1-WNK4. Todas comparten una estructura común, la cual se compone de un extremo amino, un dominio cinasa altamente conservado, un dominio autoinhibitorio, dominios coiled-coil y un dominio ácido localizado en el extremo carboxilo (McCormick y Ellison 2011). Muchos son los reportes que demuestran que estas cinasas regulan y coordinan la función de los CCC. La cinasa WNK4 además de expresarse en el riñón, se expresa

ampliamente en diferentes epitelios involucrados en el manejo de Cl^- , lo cual sugiere que esta cinasa podría estar regulando la actividad de un diverso grupo de proteínas involucradas en la regulación del transporte de Cl^- en estos epitelios. En 2004, Kahle. *et al.*, demostraron que WNK4 regula la actividad de NKCC1; uno de los principales reguladores del transporte de Cl^- en la membrana basolateral de las células epiteliales. La entrada de Cl^- a través del NKCC1 es parte integral para la secreción de éste ion en epitelios como los de los conductos pancreáticos, el colon, los conductos sudoríparos, el epidídimo y el tracto respiratorio (Haas y Forbush, 2000). El efecto de WNK4 sobre el NKCC1 se analizó en ovocitos de *X. laevis*, en donde, al co-expresarlos, la cinasa redujo en más de un 95% la actividad del cotransportador. De manera similar al NCC, la inhibición del NKCC1 por WNK4, ocurre por una reducción en la expresión del cotransportador en la membrana. Lo anterior demuestra que WNK4 juega un papel en la regulación y flujo de los electrolitos en diversos epitelios extra-renales.

CCC en organismos no vertebrados

Aunque la mayor parte de los estudios funcionales sobre las propiedades de los CCC se han realizado en vertebrados, la generalidad de sus funciones se ha verificado en algunos organismos no vertebrados: *Drosophila melanogaster* (Hekmat-Safe, *et al.*, 2006) y *Caenorhabditis elegans* (Tanis, *et al.*, 2009). La aparición de funciones como la transmisión sináptica inhibitoria o el transporte de iones transepitelial y la necesidad de regular el volumen celular, refleja la importancia fisiológica fundamental dado que los CCC se han establecido en el genoma de los organismos desde tiempos muy remotos.

Análisis fisiológicos en el antozoario *Aiptasia diaphana*, indican que los KCC podrían estar implicados en la regulación del volumen celular, así como en modular la regulación de volumen inducida hiposmóticamente de estructuras especializadas urticantes usadas para depredación y agresión llamadas nematocistos. En estos, el presunto KCC mediaría el eflujo K^+ dependiente de Cl^- que es importante para la regulación del volumen celular (Marino, *et al.*, 2010).

Cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ en *Hydra vulgaris*

Poco se sabe sobre las propiedades de los CCC en especies no bilaterales. Recientemente, el análisis del genoma del cnidario *Hydra vulgaris* reveló que codifica para varias isoformas CCC, entre ellas un cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ (hvKCC). El análisis de hidrofobicidad reveló que este hvKCC, al igual que sus ortólogos en mamíferos, consiste en una proteína de entre 10 a 12 segmentos transmembrana (STM) con un asa extracelular entre los segmentos 5 y 6 que está flanqueada por extremos amino y carboxilo terminales intracelulares. A nivel genómico hvKCC está compuesto de 24 exones y codifica para una proteína de

1032 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 115 kilodaltones (kDa). El análisis filogenético indica que hvKCC comparte la mayor identidad en secuencia de aminoácidos con la isoforma KCC1 de humano, con un 48% (Hartmann, *et al.*, 2017). Por lo tanto, este transportador representa una oportunidad para identificar aminoácidos que son necesarios para aumentar la actividad de transporte de KCC durante la evolución.

Características de la clase Hydrozoa

Los hidrozorios (Hydrozoa, del griego hydra, serpiente acuática, y zoon, animal) son una clase del filo Cnidaria que presenta especies marinas y dulceacuícolas (Figura 2). La mayoría muestra alternancia de generaciones, con pólipos bentónicos asexuales y medusas planctónicas sexuales (Ruppert y Barnes 1996).

Clasificación de *Hydra vulgaris*

Clasificación Pallas, 1766

Reino: Animalia
Phyllum: Cnidaria
Clase: Hydrozoa
Orden: Anthoathecata
Familia: Hydridae
Género: Hydra
Especie: *H. vulgaris*

(Schuchert, et al., 2011)



Figura 2. Imagen de *Hydra vulgaris*.

Tomada por: Gullen Antoni, 2015
www.biodiversidadvirtual.org

La forma más representativa de los hidrozorios es un pólipo solitario y es uno de los pocos cnidarios encontrados en agua dulce. Su hábitat normal es la parte inferior de las hojas acuáticas que ocupan charcos y arroyos de agua dulce limpia y fresca. El cuerpo de una hidra puede extenderse hasta una longitud de 25 a 30 mm, o contraerse hasta quedar como una pequeña masa gelatinosa. Es un tubo cilíndrico con el extremo inferior (aboral) que se continúa en un delgado pedúnculo, terminado en un disco pedio basal adherente. Este disco pedio está provisto de células glandulares capaces de adherir a la hidra al sustrato, y también de secretar una burbuja de gas para la flotación. En el centro del disco puede haber un poro excretor. La boca, se situada en una elevación cónica denominada hipostoma la cual está rodeada de seis a diez tentáculos huecos y pueden extenderse al igual que el cuerpo cuando el animal está hambriento (Hickman, 1998).

La boca se abre en una cavidad gastrovascular, que comunica con las cavidades de los tentáculos. En algunos individuos pueden encontrarse yemas que hacen salientes con una boca y tentáculos similares a los del individuo que las originó. Los testículos y los ovarios se localizan en proyecciones redondeadas de la superficie del cuerpo. La pared del cuerpo que rodea la cavidad gastrovascular consta de una epidermis externa (ectodérmica) y una gastrodermis interna (endodérmica) con una mesoglea entre ambas (Figura 3).

La epidermis consta de células cubicas pequeñas y está cubierta de una delicada cutícula. Esta capa contiene varios tipos de células: epitelio musculares, intersticiales, glandulares, cnidocitos y células sensoriales y nerviosas.

En la hidra, se encuentran tres tipos funcionales de nematocitos: los que penetran en la presa e inyectan el veneno (penetrantes), los que envuelven y enredan a la presa (envolventes), y lo que secretan una sustancia adhesiva utilizada para la locomoción y la fijación (glutinantes) (Ruppert y Barnes 1996).

Las células sensoriales están esparcidas entre las demás células epidérmicas, sobre todo alrededor de la boca, los tentáculos y en el disco pedio. El extremo libre de cada célula sensorial lleva un flagelo, que es un receptor sensorial para estímulos químicos y táctiles. Los otros extremos se ramifican en finas prolongaciones que forman sinapsis con las células nerviosas (Ruppert y Barnes 1996).

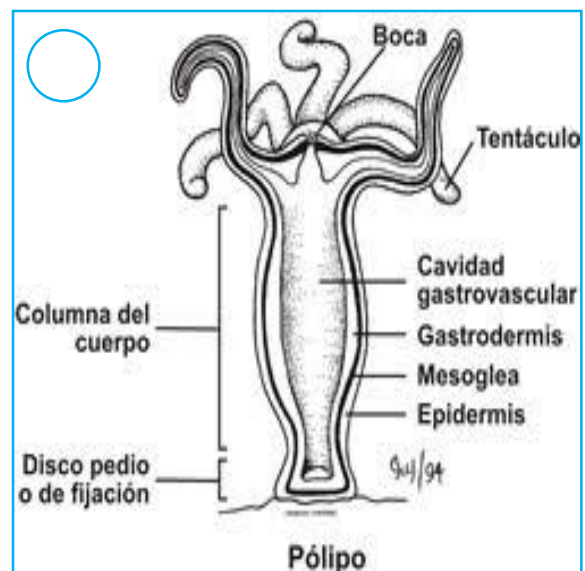


Figura 3. Estructura morfológica de un pólipo. Hernández Samuel, 2004-2018. <http://es.plopedia.wikia.com/wiki/Cnidarios>

Planteamiento del problema

No existen análisis funcionales de CCC en especies no bilaterales, y dado que entre las principales características de esta familia están la coordinación del desarrollo de la neurotransmisión inhibitoria, la maduración sináptica, así como la regulación del volumen celular y el transporte transepitelial de sal, documentado ampliamente en vertebrados, es posible que miembros de los CCC, especialmente los KCC, presentes ya en linajes de eucariontes tempranos, uno de ellos el cnidario *Hydra vulgaris*, muestren la importancia del surgimiento de funciones fisiológicas diversas y un mejor entendimiento de las vías evolutivas a las que ha sido sujeta esta familia de cotransportadores.

Justificación

La familia SLC12A tiene una importancia fisiológica fundamental que se refleja con el hecho de que se ha establecido en el genoma desde las arqueas. Tanto KCC y NKCC aparecieron como cotransportadores de iones en eucariontes y metazoarios, respectivamente. Dado que la caracterización de los CCC en vertebrados ha sido ampliamente documentada y para entender mejor la evolución de esta familia de proteínas, se ha analizado las características de ortólogos en organismos más simples y no bilaterales y determinar si estos son importantes para la regulación del volumen celular y el transporte iónico.

Hipótesis

Se sabe que el cnidario dulceacuícola *Hydra vulgaris* expresa un cotransportador endógeno de K^+Cl^- con una estructura similar a la de un cotransportador de mamífero. Por lo tanto, al coexpresar el cRNA de hvKCC en ovocitos de *Xenopus laevis* se espera que comparta propiedades funcionales y moleculares de KCC de organismos más complejos, sugiriendo, entre otras funciones, que este cotransportador desempeña un papel importante en la regulación del volumen celular del hidrozooario.

Objetivo general

Caracterizar funcionalmente al cotransportador endógeno de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* (hvKCC) empleando el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Objetivos particulares

- Determinar los parámetros funcionales del cotransportador endógeno de *Hydra vulgaris* y compararlo con las isoformas de KCCs de mamíferos.
- Evaluar el efecto de agentes activadores e inhibidores ya descritos para otros KCCs en la función de hvKCC para obtener su perfil regulador.

Metodología

Obtención de cDNA del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* (hvKCC)

El cDNA que codifica para el cotransportador endógeno de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* (hvKCC) fue amablemente donado por la Dra. Anna-Maria Hartmann de la Universidad de Oldenburgo en Alemania. A la clona se le insertó la etiqueta de la hemaglutinina (HA), en el extremo amino terminal para la detección y purificación de proteínas y se subclonó en el plásmido de expresión para ovocitos pGEMHE.

Una vez obtenida la clona, se transformaron bacterias de la cepa XL1-Blue con 50 ng del cDNA de la clona original en placas con agar y ampicilina (Sigma-Aldrich E.U.A) por un periodo de 24 h a 37 °C (incubadora Yamato modelo IC1103CM). Posteriormente, las colonias obtenidas se pusieron a crecer en un medio Luria-Bertani (LB) líquido (Sigma-Aldrich E.U.A) por 24 h a 37 °C y 250 rpm. Al finalizar este periodo de incubación, se obtuvo y purificó el cDNA (QIAGEN, E.U.A) cuya calidad y cantidad se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Promega) y espectrofotometría (Smartspec Plus 3000, BioRad E.U.A), respectivamente.

Generación de clonas mutantes del hvKCC de *Hydra vulgaris* para mimetizar fosforilación/desfosforilación.

La fosforilación es un mecanismo postraduccional de activación e inactivación a modo de interruptores, que es llevado a cabo por proteínas cinasas. Para que un aminoácido se pueda fosforilar debe presentar un grupo hidroxilo expuesto en su cadena lateral. Este fenómeno ocurre en residuos de tirosinas, serinas y treoninas principalmente (Romá, 2012).

hvKCC comparte un sitio susceptible de fosforilación con los KCCs de mamífero. Este sitio, correspondiente al sitio 1 (S1) es la treonina 892. De modo que para analizar el efecto de la fosforilación sobre la función de hvKCC, se generaron dos clonas mutantes en las que se cambiaría la treonina 892 por alanina o por aspartato para mimetizar la desfosforilación y fosforilación respectivamente. Primero se diseñaron los iniciadores específicos para cada sitio, basados en la secuencia del cDNA del KCC endógeno de *Hydra vulgaris*.

Iniciadores para mutagénesis:

HA-hvKCC T892A (mutante fosfoablative)

Iniciador sentido: 5'-TACACCTACGAGCGGG**CC**CTGAAAGCCGAGCAG-3'

Iniciador antisentido: 5'- CTGCTCGGCTTTCAG**GGCC**CGCTCGTAGGTGTA-3'

HA-hvKCC T892D (mutante fosfomimética)

Iniciador sentido: 5'-TACACCTACGAGCGGG**GAC**CTGAAAGCCGAGCAG-3'

Iniciador antisentido: 5'- CTGCTCGGCTTTCAG**GT**CCCGCTCGTAGGTGTA-3'

Se realizó una reacción de PCR (Thermocycler PTC-100, Research, Inc, E.U.A) para generar las mutantes, empleando la siguiente reacción y programa (Tabla 1 y 2):

Tabla 1. Reacción de PCR

Reacción	
Volumen (µl)	Reactivo
2.5	10x buffer
1.25	10 µM iniciador sentido
1.25	10 µM iniciador antisentido
1.0	10 mM dNTP's
1.0	cDNA(50-100ng)
0.4	Pful Ultra
17.7	Agua grado BM
25	<i>Volumen final</i>

Tabla 2. Programa para la reacción en PCR

Programa Mutagénesis	
Temperatura (°C)	Tiempo
95	60 seg
95	50 seg
55	50 seg
72	15 min
22 ciclos desde paso 2	
68	7 min
4	Hasta alcanzar 4 °C
4	Fin

Posteriormente, la reacción se incubó por 2 h a 37 °C (Thermomixer, Eppendorf) con la enzima *DpnI* (Agilent, E.U.A) y mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% se analizaron 10 µl de la reacción. Una vez confirmados los productos y su calidad, las bacterias XL1-Blue fueron transformadas con 5 µl (50 ng) de la reacción previa para obtener el cDNA correspondiente. Para confirmar las mutaciones, el cDNA obtenido fue enviado a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las muestras se prepararon de acuerdo con las indicaciones de la unidad, en un tubo de 0.2 µl, con un volumen final de 16 µl que contiene de 600 a 1000ng del DNA, 1 µL de iniciador a una concentración de 10 µM y agua destilada.

Los iniciadores para secuenciar serán:

5'-TTCCTGGCCTGCGTG-3'

5'-CTGATCTGCGAGATC-3'

5'-ATTGTGCACGACGGC-3'

Confirmadas las mutaciones se generó el cRNA correspondiente para su análisis y la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* (Nasco, E.U.A).

PCR para comparar el cotransportador de *Hydra vulgaris* con los KCC de mamífero

Para las PCR se diseñaron iniciadores específicos para el hvKCC de *Hydra vulgaris* y las condiciones fueron de mediana estringencia. El DNA de los KCC con los que se comparó son: KCC1 de conejo, KCC2b de humano, KCC3a de humano y KCC4 de ratón. Se realizaron combinaciones con los 6 iniciadores diseñados (Tabla 3) y se usó un control negativo diferente para cada reacción. Al término del programa para la PCR (Tabla 4), se realizaron geles de agarosa al 1 y 1.5% para ver los tamaños correspondientes de las clonas y la calidad de este.

Tabla 3. Iniciadores específicos diseñados para la reacción de PCR

Iniciador	Secuencia	Posición	Tm (°C)
hvKCC-1S	TTCCTGGCCTGCGTG	843	50
hvKCC-2S	CTGATCTGCGAGATC	1614	46
hvKCC-3S	ATTGTGCACGACGGC	2475-S	48
hvKCC-5S	ACTGATGCTGCTGAT	2492	48
hvKCC-2AS	GCCGTCGTGCACAAT	2475-AS	48
hvKCC-3AS	CCACCAGTTTGTTC	2944-AS	48

Todas las clonas fueron diluidas a razón de 50 ng/μl y se usó 100 ng por reacción de 25 μl (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Programa para la reacción de la PCR

Programa PCR	
Temperatura (°C)	Tiempo
94	60 seg
94	30 seg
47	30 seg
72	3 min
30 ciclos desde el paso 2	
72	5 min
4	Hasta alcanzar 4°C
4	fin

Tabla 5. Reacción para la comparación de los KCC

Reacción	
Volumen (μl)	Reactivo
2.5	10x buffer
0.75	50mM MgCl ₂
0.5	10mM dNTPs
0.5	10μM iniciador sentido
0.5	10μM iniciador antisentido
2.0	DNA (100ng)
0.125	Taq Polimerasa
18.125	Agua grado BM
25.0	<i>Volumen total</i>

Linearización del cDNA

Se linealizaron 1.5 µg del cDNA de la clona silvestre de hvKCC, así como de las mutantes de fosforilación (T892A y T892D). La digestión se realizó con la enzima de restricción *NotI* (New EnglandBioLabs, E.U.A) en el extremo -3' del cDNA a 37 °C por 2 h. Al término de este tiempo el cDNA linearizado se purificó usando el método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich, E.U.A), precipitado con acetato de amonio y alcohol etílico y finalmente resuspendido en agua grado BM, libre de DNAsas y RNAsas. La calidad de los productos se analizó con un 1µl de la reacción en un gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio para su visualización.

Obtención del cRNA

Del resto de la reacción de la digestión, aproximadamente 1 µg, se procedió con la obtención del cRNA empleando el kit mMMESSAGE T7 (Ambion, Lituania). La reacción se mantuvo a 37 °C por 3h para posteriormente precipitarla con alcohol isopropílico, el cual se dejó por una noche. Al siguiente día el cRNA se centrifugó para obtener un precipitado que se lavó con alcohol etílico y se resuspendió en 20 µL de Tris-HCl a 100 mM. La calidad y cantidad de los productos se analizaron en un gel de agarosa-formaldehido al 1% y espectrofotometría, respectivamente.

Inyección del cRNA de hvKCC de *Hydra vulgaris* en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos después de ser extraídos de la rana se incubaron por 2 h en una solución de mantenimiento sin Ca⁺² (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 5 mM) y colagenasa A (2 mg/ml), para remover la folicula. Después fueron transferidos a una solución ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 5 mM) donde se seleccionaron los ovocitos de mejor tamaño y estado. Los ovocitos seleccionados se incubaron en ND96 con piruvato de sodio a 2.5 mM y gentamicina a 5 µg/ml (ND96+P+G) por dos días a 16 °C, cambiando el medio cada 24 h. Todos los reactivos empleados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, E.U.A.

Al tercer día se preparó la inyección con el cRNA de hvKCC de *Hydra vulgaris* (15ng/ovocito en 50 nl (nanolitros) de tris HCl 100mM, pH 7.4). Durante el transcurso del proyecto de investigación se determinó con precisión las clonas a coinyectar con hvKCC, así como las concentraciones y condiciones. Las clonas empleadas se muestran en la Tabla 6. Se inyectaron los ovocitos y se incubaron por 48 h en ND96+P+G, cambiando la solución cada 24 h (Figura 4).

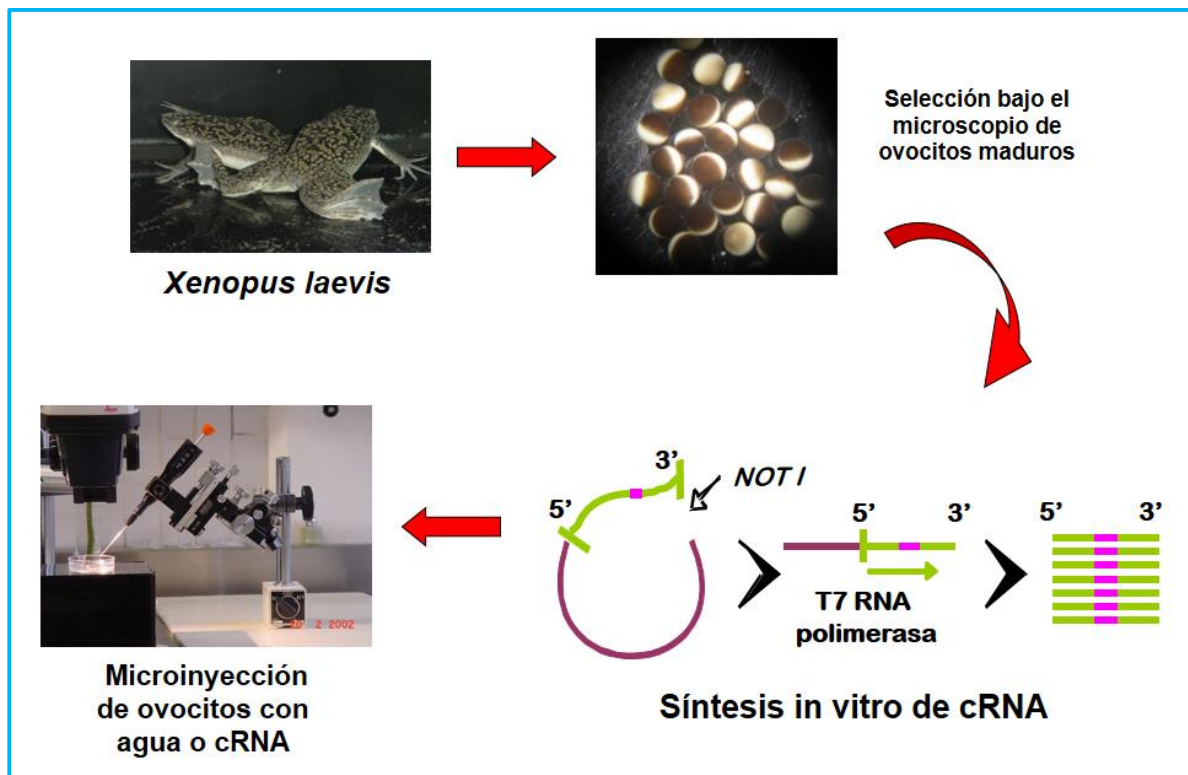


Figura 4. Inyección del cRNA de hvKCC de *Hydra vulgaris* en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos seleccionados fueron inyectados con el cRNA de hvKCC y como control sólo se inyectó agua. Después de ser inyectados los ovocitos, se colocan en la solución ND96, hasta el día del experimento funcional (48 h después). En este tiempo el ovocito lleva a cabo la síntesis de la proteína.

Tabla 6. Concentración y tonicidad del medio que se utilizó para el experimento funcional

Clona	Concentración (ng/ovocito)	Tonicidad del medio (~ mOsm/kg)
HA-hvKCC WT	15	110, 210
HA-hvKCC T892A	15	110, 210
HA-hvKCC T892D	15	110, 210
WNK1	10	110, 210

Experimento funcional

Pasadas las 48 h de la inyección los ovocitos se transfirieron a una solución libre de cloro (isetionato: isetionato-Na 96 mM, K-gluconato 2 mM, Mg-gluconato 1 mM, Ca-gluconato 1 mM, Hepes 5 mM), dos h antes del experimento funcional. La expresión funcional del cotransportador se analizó midiendo la captación de rubidio ($^{86}\text{Rb}^+$) (Perkin Elmer, Boston E.U.A) ya que este radioisótopo puede transportarse por las mismas vías que el K^+ . El número de ovocitos por grupo fue de entre 10 y 15 ovocitos para cada experimento. Los ensayos se realizaron en condiciones hipotónicas o isotónicas, según se indique, siguiendo el siguiente protocolo (Figura 5):

Precaptación

Antes de la precaptación los ovocitos se mantuvieron 2 h en isetionato. Después de este tiempo se incubaron en un medio hipotónico libre de Na^+ y Cl^- , (ND50-Na-Cl) (NMDG-gluconato 40 mM, K-gluconato 10 mM, Ca-gluconato 4.6 mM, Mg-gluconato 1mM, Hepes 5 mM, pH 7.4 con KOH) con 1 mM de ouabaina para bloquear la actividad de la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa y que el $^{86}\text{Rb}^+$ no sea transportado por esta vía. Los ovocitos se mantuvieron en este medio por 30 min en agitación ligera a temperatura ambiente.

Captación

Seguida de la precaptación, los ovocitos se transfirieron a una solución libre de Na^+ , ND50-Na (NMDG+Cl 40 mM, KCl 10 mM, CaCl_2 1.8 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes 5 mM pH 7.4 con KOH) a la cual, se le adicionó ouabaina y $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ de $^{86}\text{Rb}^+$. Los ovocitos se incubaron a 32°C en agitación ligera por 60 min.

Posteriormente, los ovocitos fueron lavados en la solución de captación fría para detener la captación de rubidio y ser transferidos individualmente a tubos con $500 \mu\text{l}$ de NaOH al 2%. La captación el rubidio se determinó en un contador beta de centelleo líquido.

En condiciones isotónicas se siguió con el mismo procedimiento y con las mismas soluciones, pero adicionadas con sacarosa ($3.42 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) para incrementar la osmolaridad a $\sim 200\text{mOsm}$.

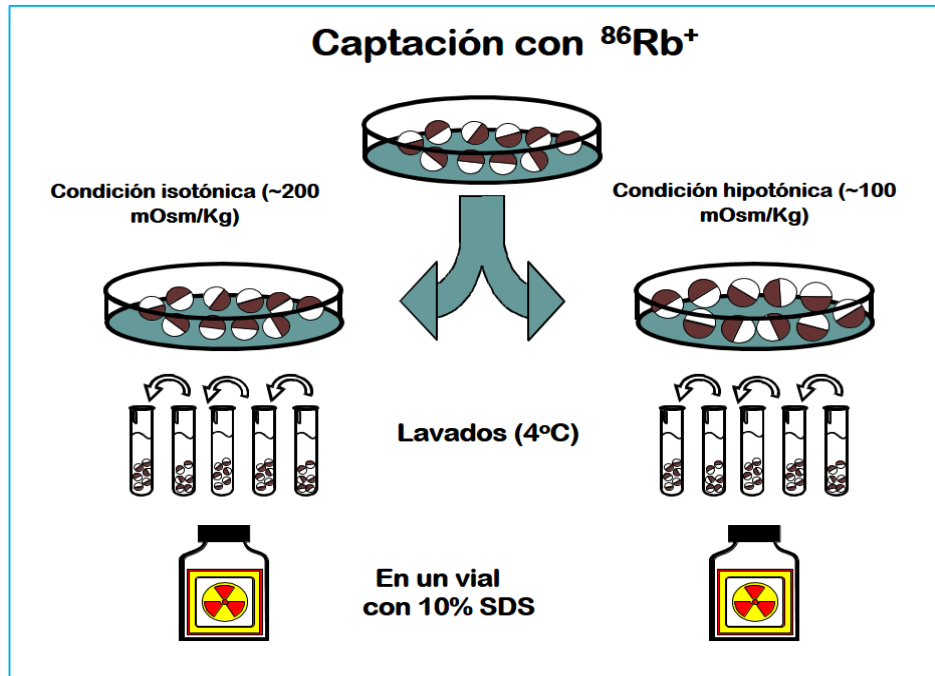


Figura 5. Experimento funcional usando rubidio radioactivo

Durante el transcurso del proyecto se determinó el efecto de activadores así como inhibidores de la función del cotransporte de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$. Las concentraciones y condiciones particulares se definieron conforme se desarrolló el trabajo. Los fármacos usados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Fármacos empleados en el experimento funcional

Fármaco	Concentración	Tonicidad del medio (~ mOsm/kg)
Caliculina A	100nM	110
Inhibidor WNK-463	1 y 10 μM	110, 210
N-etilmaleimida (NEM)	2mM	210

Para determinar si el cotransportador es activado por las fosfatasas e inactivado por las cinasas WNK, se adicionó a las soluciones de precaptación y captación drogas como la caliculina A (Sigma-Aldrich, E.U.A) (inhibidor de la proteína fosfatasa PP1) o el inhibidor 463 de las cinasas WNKs.

Otro fármaco usado fue el N-etilmaleimida o NEM (Merck, Alemania) que es un activador alquilante de los KCC con el fin de observar activación del cotransportador endógeno de *Hydra* en condiciones isotónicas que es donde el cotransportador es inhibido por el cambio de tonicidad.

Análisis de proteínas por Western blot

El Western blot o inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada.

Para la obtención de las proteínas de los ovocitos, se realizó un experimento funcional pero no se utilizó rubidio radioactivo. Al finalizar el ensayo, cada grupo se transfirió a un tubo frío con 5µl por ovocito de solución de lisis (Tris-HCl 1 M, pH 7.5; EGTA 0.2 M, pH 7.5; EDTA 0.2 M, pH 7.5; Nonidet 1%) adicionado con inhibidores de fosfatasa como ortovanadato de Na 0.1 M, fluoruro de Na⁺ a 10 mM, pirofosfato de Na⁺ 2 mM, e inhibidores de proteasas a 1 mM (SigmaFast, Sigma-Aldrich, E.U.A) por 10 min. En seguida se homogeneizaron e incubaron por 10 min a 4 °C. Posteriormente los tubos se centrifugaron en frío por 10 min a 10,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio que se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Las muestras para el inmunoblot se prepararon 1:2 con solución amortiguadora Laemmli (BioRad, E.U.A). A continuación, los geles de poliacrilamida-SDS al 8% con 20 µl por pozo (2 equivalentes de ovocito o 50 µg) de las proteínas totales previamente preparadas, fueron sometidos a electroforesis (50 volts por 60 min para el gel concentrador y 115 volts por 90 min, para el gel separador). Al finalizar la electroforesis las muestras son transferidas por 90 min a 90 volts a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRad E.U.A), bloqueadas en leche al 5% en TBST (solución salina con tris y tween 20 al 0.2%) por 60 min y entonces incubadas en el anticuerpo primario correspondiente. Los anticuerpos que se usaron son anti-HA (1:2000, Sigma-Aldrich, E.U.A) para medir la expresión total de hvKCC, el fosfoanticuerpo correspondiente a la treonina fosforilada T892 (2 µg/ml) para medir el estado de fosforilación y/o actividad de la proteína y β-actina-HRP (1:6000, Sigma-Aldrich, E.U.A) como control de carga. Las membranas fueron incubadas con estos anticuerpos a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, el anticuerpo primario se removió de las membranas que lo requieran para ser incubadas con el anticuerpo secundario anti-oveja (1:5000, Sigma-Aldrich, E.U.A). La presencia de la proteína en cuestión fue detectada mediante quimioluminiscencia por autoradiografía de las bandas y se cuantificó por análisis densitométrico (Image Studio Li-Cor).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba *t* de Student y se consideró que existen diferencias significativas cuando la probabilidad fue $p \leq 0.05$. Los resultados están expresados como la media \pm el error estándar. Se realizaron de 3 a 4 experimentos funcionales independientes, cada uno con 10-15 repeticiones (ovocitos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los miembros de la familia de CCC están principalmente involucrados en la regulación del volumen celular, el ajuste del Cl^- intracelular en neuronas, el transporte de iones a través de las células epiteliales y la secreción de K^+ . Su importancia fisiológica fundamental se refleja en el hecho de que han sido establecidos en el genoma desde las Arqueas. Los miembros de la subfamilia de cotransportadores de iones inorgánicos KCC y NKCC aparecieron por primera vez en eucariotas y metazoos, respectivamente. En los cnidarios, se han descrito como ortólogos (totales o parciales) de genes que originalmente se creían exclusivos de organismos bilaterales (Hartmann AM *et al*, 2017).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de investigación, que exploran las interrogantes planteadas en el proyecto respecto a si el hvKCC es regulado bajo las mismas condiciones que un KCC de mamífero.

Lo primero que se realizó fue la alineación de las secuencias de aminoácidos de la subfamilia de cotransportadores de KCC de las cuatro isoformas de mamíferos y se compararon con el cotransportador endógeno de *Hydra vulgaris* (hvKCC) usando el programa Clustal Omega de la European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. La figura 6 muestra que, al igual que las isoformas de mamífero este es un transportador de membrana de doce segmentos transmembranales (STM) flanqueados por un dominio amino terminal corto y un carboxilo terminal largo. Entre los STM 5-6 existe un asa extracelular que podría estar glucosilada.

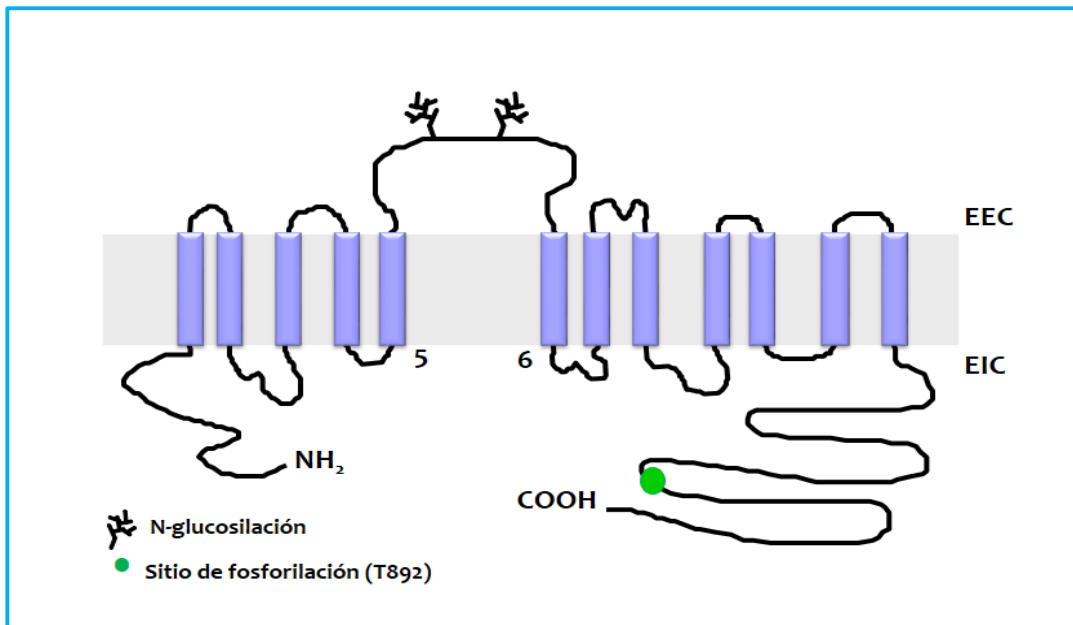


Figura 6. Estructura secundaria del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* (hvKCC). Consiste de un dominio central con 12 STM flanqueados por dominios hidrofílicos amino y carboxilo terminales. Entre los STM 5 y 6 hay un asa extracelular glucosilada y un sitio de fosforilación, indicado en verde, en el extremo carboxilo. Modificado de Hartmann AM *et al*, 2017.

A diferencia de las isoformas en vertebrados, hvKCC sólo presenta uno de los dos sitios de fosforilación reportados en KCC3, correspondiente al sitio 1, la treonina 892 (T892). Otra característica importante es el sitio de unión a la cinasa SPAK (motivo RFXV) en el extremo amino terminal que únicamente comparte con las isoformas KCC2 y KCC3 (Figura 7).

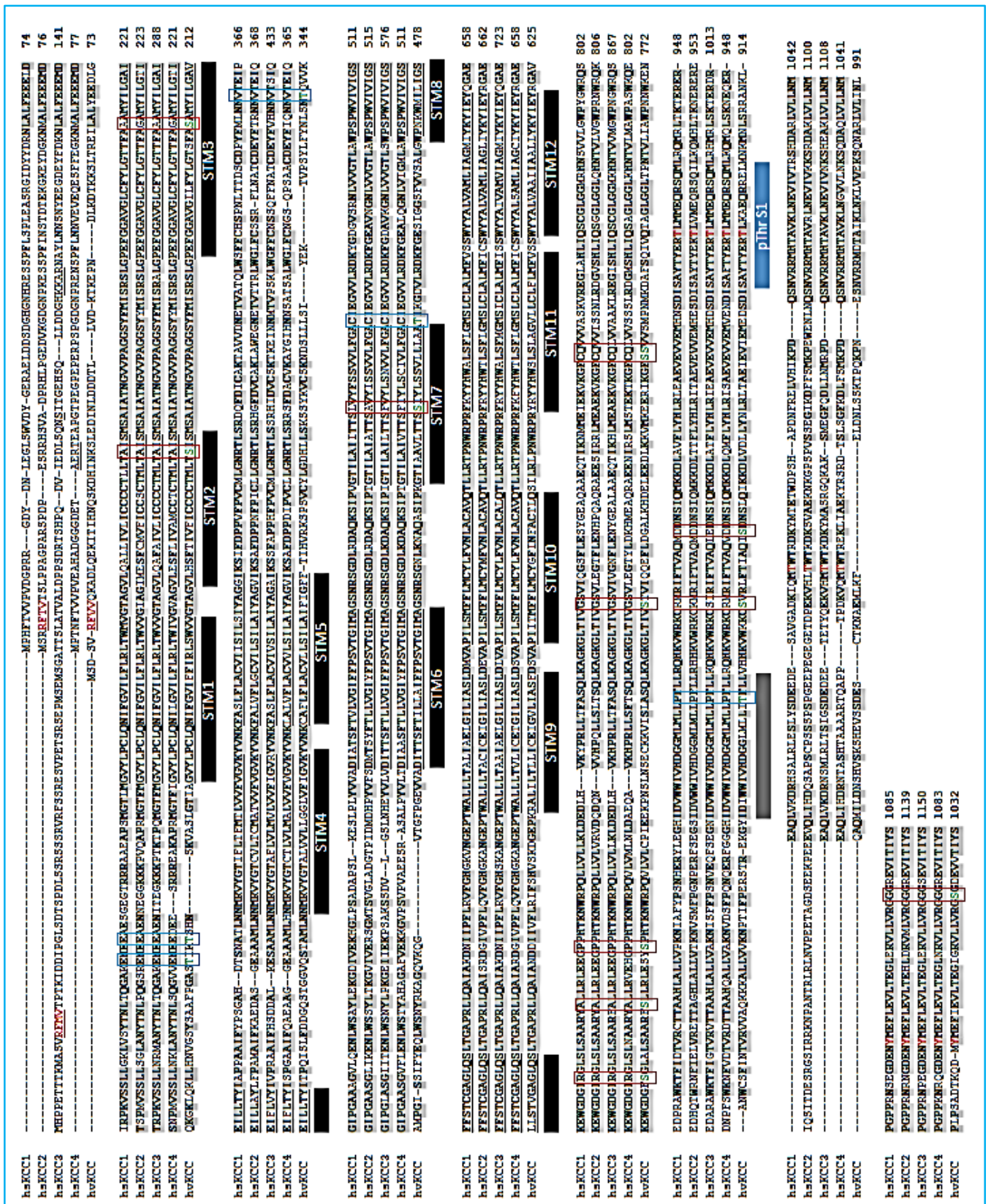


Figura 7. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la subfamilia de cotransportadores de los KCC de las de mamíferos, c comparadas con el cotransportador endógeno de *Hydra vulgaris* (hvKCC) usando el programa Clustal Omega de la European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

Con la secuencia de aminoácidos del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* se realizó un cladograma para determinar el porcentaje de identidad con respecto a los cotransportadores de mamíferos. El cotransportador endógeno de *Hydra vulgaris* tiene un 40% de identidad con los KCCs, siendo la isoforma KCC1 con la que comparte mayor homología (Figura 8).

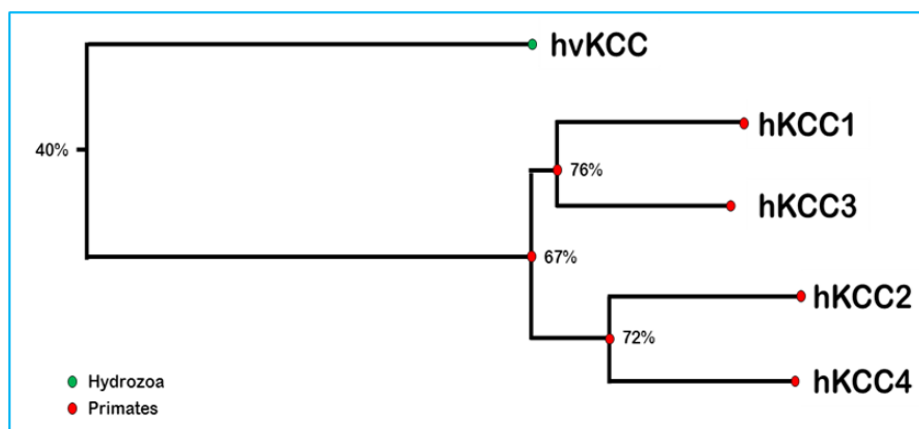


Figura 8. Cladograma de la subfamilia de los cotransportadores electroneutros de K^+Cl^- . hvKCC de *Hydra vulgaris* comparte un 40% de identidad con los KCCs de mamífero. Clustalo-l20180124-185607-0073-4079809-p1m

También se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en presencia de seis pares de iniciadores específicos llamados hvKCC (Sigma) para comparar el cDNA del cotransportador de *Hydra vulgaris* con los KCC de mamífero disponibles en el laboratorio. Las condiciones de la PCR fueron de baja severidad, de modo que los iniciadores puedan alinearse a las secuencias del cDNA de los diferentes KCC de mamífero analizados. Los fragmentos amplificados se muestran en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8. Tamaño de los fragmentos esperados

Par de iniciadores	Fragmento esperado (pb)
hvKCC-1S/2AS	1632
hvKCC-2S/2AS	861
hvKCC-3S/3AS	469
hvKCC-5S/3AS	452
hvKCC-1S/3AS	2101
hvKCC-2S/3AS	1330

Los fragmentos amplificados, resultado de las PCR se muestran en la figura 9. Las bandas esperadas para el cotransportador hvKCC se muestran en los carriles 2, 4 y 6, mientras que aquellas en los carriles 3, 5 y 7 corresponden a la isoforma indicada del KCC de mamífero. Usando estos pares de iniciadores es evidente que la mayor similitud entre hvKCC es consistente con la isoforma KCC1 que con el resto de los KCC.

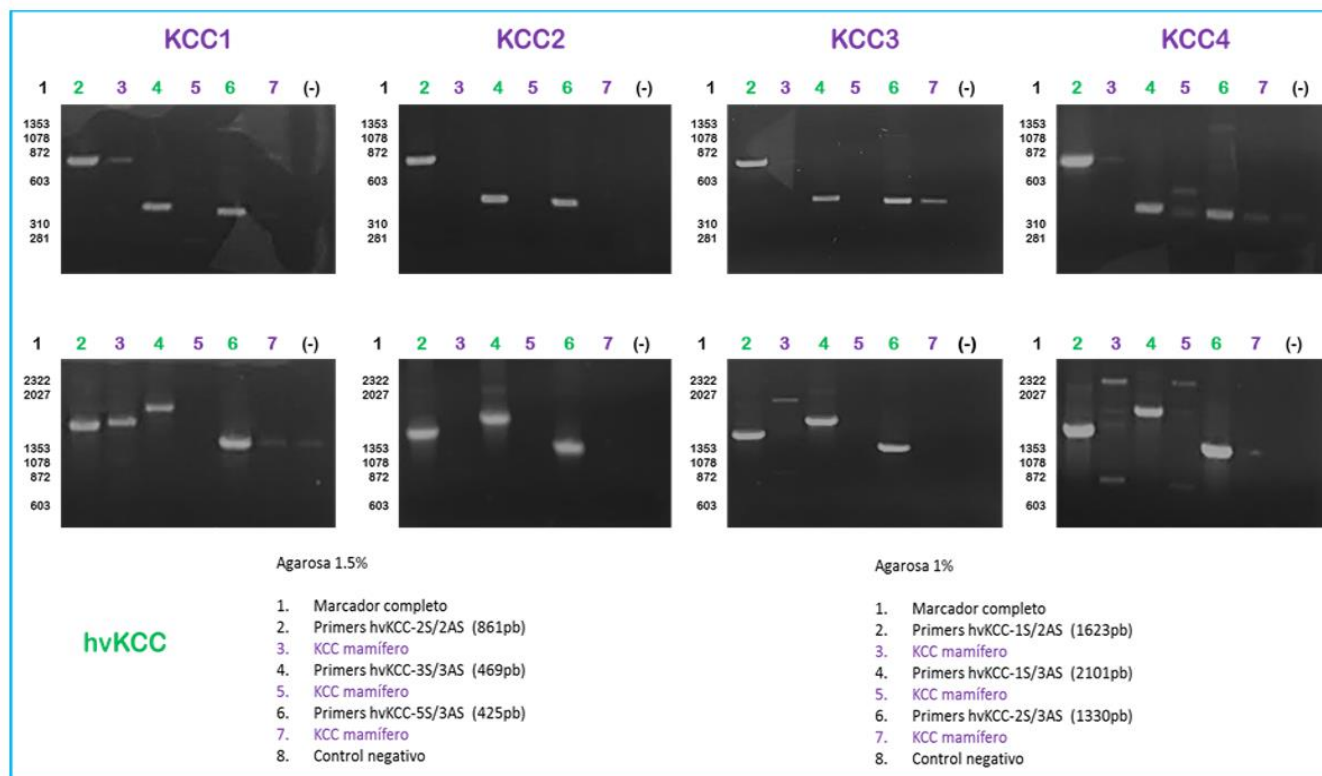


Figura 9. Comparación del cDNA de los cotransportadores mamíferos de KCC con el cotransportador endógeno de *Hydra vulgaris* (hvKCC). El cDNA de las isoformas de mamífero correspondiente se muestran en morado y la de hvKCC en verde. El marcador de bajo o alto peso molecular se muestra en el carril 1, mientras que el control negativo está indicado como (-) por cada carril se colocó 10µL de muestra. El panel superior muestra los amplificados pequeños (452, 469 y 861pb) mientras que el inferior, el de los amplificados de mayor tamaño (1330, 1632 y 2101pb). Las condiciones de la PCR se detallan en la metodología.

Una vez secuenciada y confirmada la clona silvestre correspondiente al KCC de *Hydra vulgaris* procedimos a generar, mediante mutagénesis dirigida e iniciadores específicos (Sigma), las mutantes fosfoablativa hvKCC-T892A y fosfomimética hvKCC-T892D usando el kit QuickChange (Agilent). El cDNA de las clonas obtenidas se envió a secuenciar a la Unidad de Secuenciación de la UNAM para comprobar la mutación puntual. El resultado de los cromatogramas de cada mutante, así como los iniciadores usados para generar cada mutación se muestran en la figura 10.

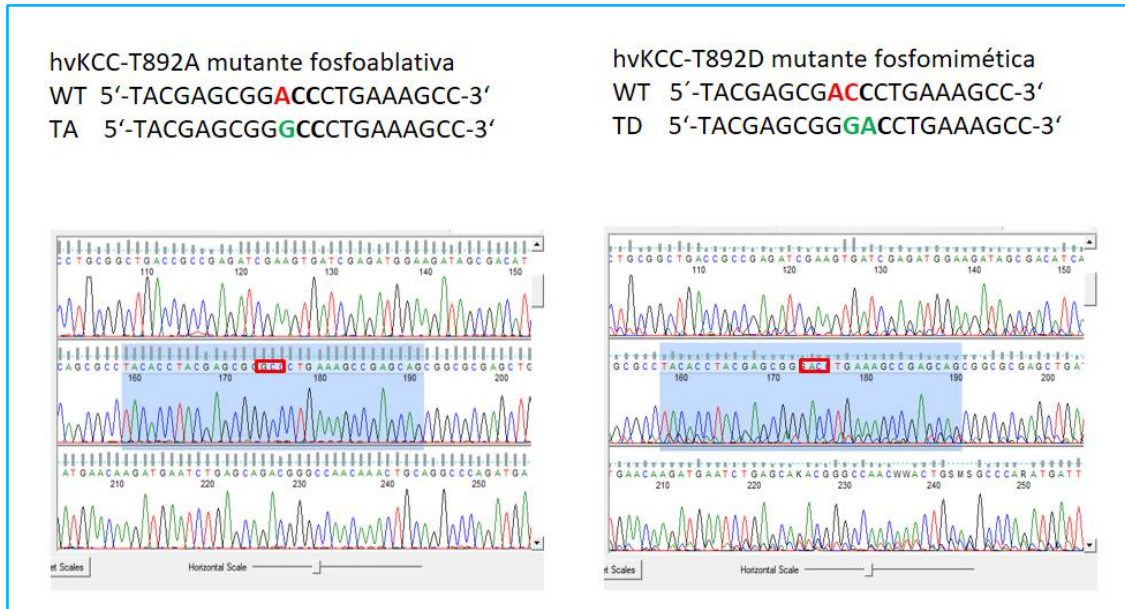


Figura 10. Secuenciación de las mutantes hvKCC-T892A y hvKCC-T892D. Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Posteriormente, se sintetizó el cRNA a partir de la linealización en el extremo 3' de los cDNA silvestre y las mutantes T892A y T892D de hvKCC. Para linealizar las muestras se empleó la enzima de restricción *NotI* (NEB) que generó una banda de 6165 pb y, al día siguiente se usó el promotor T7 de la RNA polimerasa (Ambion) con la cual se obtuvo un producto de 3126 pb. La calidad y cantidad del cDNA y cRNA respectivos se analizó en geles de agarosa (Figura 11) indicando que el cRNA obtenido es de buena calidad para ser microinyectado en ovocitos de *Xenopus* y realizar los ensayos de expresión funcional.

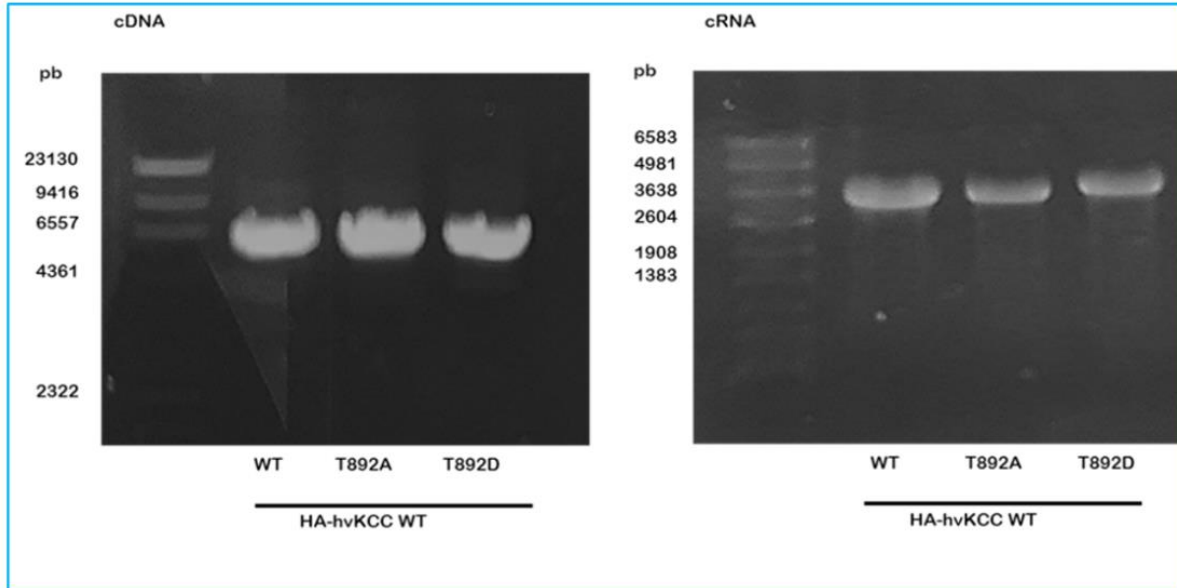


Figura 11. Linealización del cDNA y síntesis *in vitro* del cRNA de HA-hvKCC-WT, T892A y T892D. La linealización del cDNA se realizó con la enzima de restricción *NotI* (NEB) en el extremo 3', mientras que la síntesis del cRNA se llevó a cabo usando el promotor T7 de la RNA polimerasa (Ambion).

Para determinar la función del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris*, ovocitos de la rana *Xenopus laevis* fueron microinyectados con el cRNA de las clonas obtenidas en la figura 11. Las gráficas siguientes muestran, en el eje de las ordenadas, la captación de $^{86}Rb^+$ en picomoles por ovocito por hora (pmol/ovocito/h), y en las abscisas, el tratamiento o condiciones a las que fueron sometidos. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar del conjunto de experimentos funcionales que se realizaron. Seguido del análisis de Western blot de las proteínas totales del cotransportador endógeno de *Hydra vulgaris* expresado en ovocitos de *Xenopus*. Los blots fueron revelados contra el anticuerpo HA, con el cual se etiquetó a hvKCC (HA-hvKCC), el fosfoanticuerpo correspondiente al sitio 1 (pT892) y β -actina usado como control de carga.

En la figura 12 se muestra la curva de tonicidad en ovocitos inyectados con el cotransportador de K^+Cl^- endógeno de *Hydra vulgaris*. Así, en una tonicidad de 120 mOsm, la actividad del cotransportador (captación de $^{86}Rb^+$) en presencia de cloro incrementó a 1432.7 ± 251.7 pmol/ovocito/h con respecto al control (H_2O) que fue de 327.7 ± 55.7 con un nivel de significancia de $p < 0.001$. La actividad de hvKCC en ausencia de cloro disminuyó a 547.7 ± 83.6 pmol/ovocito/h. Por otro lado, al aumentar la tonicidad del medio se puede observar que la actividad del cotransportador disminuye. Al llegar a una tonicidad de ~ 200 mOsm (isotonicidad para los ovocitos de *Xenopus*), la captación de hvKCC fue menor con un valor de 276.4 ± 432.9 pmol/ovocito/h, que al compararlo con su actividad en el medio

hipotónico muestra significancia de $p < 0.001$. Esto indica que el hidrozooario *Hydra vulgaris* expresa un cotransportador endógeno de K^+Cl^- que es activado en condiciones hipotónicas y dependiente de la presencia de cloro.

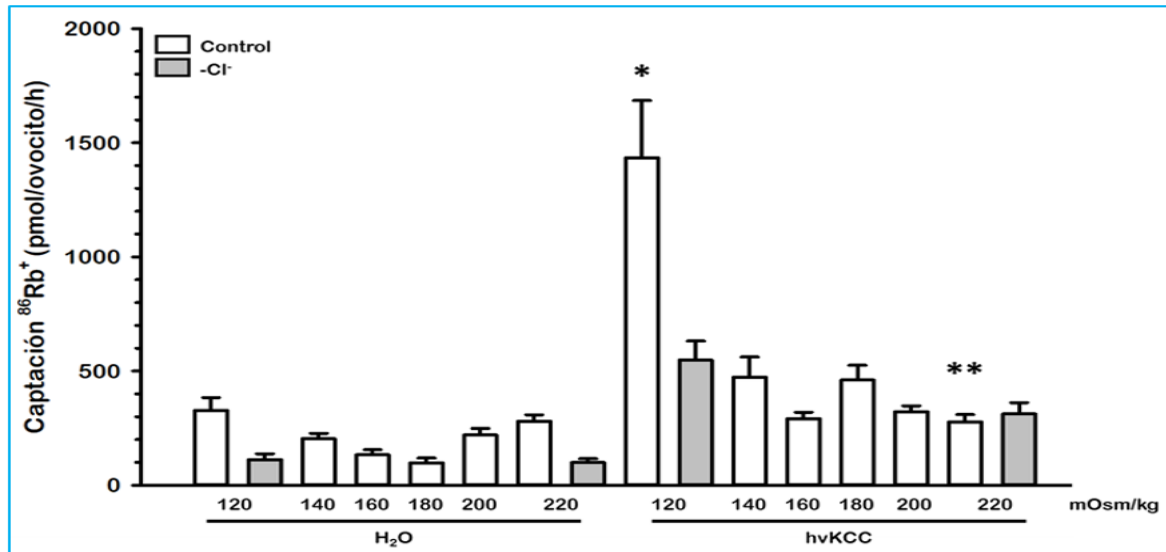


Figura 12. Curva de tonicidad en ovocitos inyectados con el cotransportador de K^+Cl^- endógeno de *Hydra vulgaris*. La captación de $^{86}Rb^+$ fue determinada en las osmolaridades indicadas en presencia (barras blancas) o ausencia de cloro (barras grises) en ovocitos microinyectados con agua o con el cRNA de hvKCC. (N=1, * $p < 0.001$ vs H₂O control en 120 mOsm; ** $p < 0.001$ vs. hvKCC en 120 mOsm).

En el primer blot se muestran lisados de ovocitos de tres experimentos diferentes, inyectados con 15 ng de cRNA HA-hvKCC. Cada banda corresponde a tres equivalentes de ovocito en condiciones hipotónicas (Figura 13). Como puede observarse, el anticuerpo anti-HA reconoce una banda de ~115 kDa que corresponde a la proteína total de hvKCC y que no se encuentra en el grupo de ovocitos inyectados con agua. La banda de ~48 kDa corresponde a la β -actina, usada como control de carga. La densitometría en la gráfica de lado derecho muestra la expresión relativa (x1000) de ovocitos microinyectados con H₂O o con el cRNA de hvKCC. De acuerdo con lo esperado, sólo los ovocitos inyectados con hvKCC expresan una proteína de ~115 kDa (hvKCC, 7.94 ± 1.55 vs. H₂O, $0.08 \pm 2 \times 10^{-7}$ (x1000, UA) $p < 0.001$), sugiriendo que el KCC de *Hydra* no es el mismo que se expresa de manera endógena en los ovocitos.

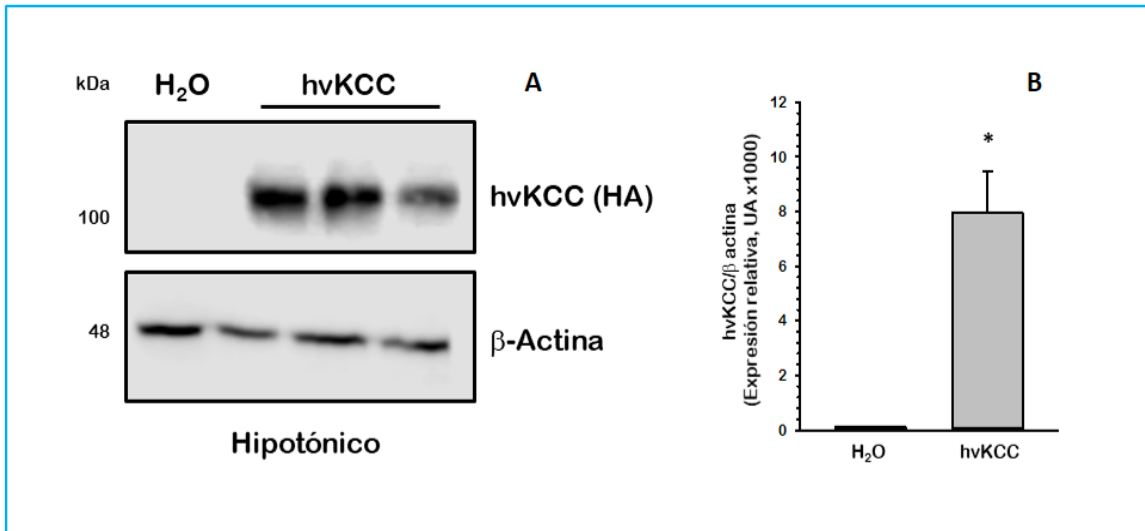


Figura 13. Expresión del cotransportador de K⁺:Cl⁻ endógeno de *Hydra vulgaris* (hvKCC) en condiciones hipotónicas. A. Western blot representativo usando el anticuerpo monoclonal anti-HA y β -actina como control de carga. Las proteínas totales fueron extraídas de ovocitos de *Xenopus* microinyectados con agua o con el cRNA de hvKCC y expuestos a condiciones hipotónicas. B. Densitometría de la expresión relativa del cotransportador de K⁺:Cl⁻ de *Hydra vulgaris*.

La figura 14 muestra el curso temporal de la captación de ⁸⁶Rb⁺ de hvKCC en ovocitos expuestos a un medio hipotónico. Al incrementar el tiempo de captación se observa que la actividad del cotransportador también aumenta de manera proporcional. A los 60 minutos de captación (1590.4 \pm 305.1 pmol/ovocito/h) ya se muestra una diferencia significativa (p= 0.004) con respecto a 15 minutos (327.8 \pm 32.8 pmol/ovocito/h), mientras que 90 minutos de captación promueven la activación de hvKCC hasta 2636.4 \pm 386.9 pmol/ovocito/h (p< 0.001 vs 15 mins). Por lo anterior, se decidió que todos los experimentos fueran realizados en un período de captación de 60 minutos, de la misma forma que se realizan para los KCC de mamífero.

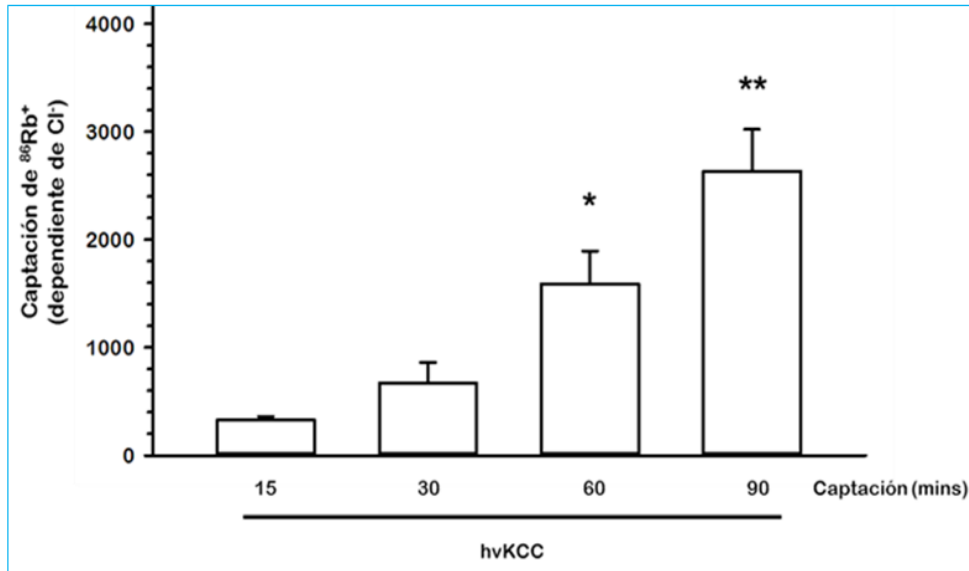


Figura 14. Curso temporal en ovocitos inyectados con el cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ endógeno de *Hydra vulgaris*. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de cloro fue determinada en hipotonicidad (120 mOsm/kg) a los tiempos indicados. (N=1, *p=0.004 vs 15 mins, **p<0.001 vs 15 mins).

Los líquidos corporales de los animales de agua dulce, incluyendo invertebrados, peces, anfibios, reptiles y mamíferos, generalmente son hiperosmóticos con el agua que los rodea. El proceso de adaptación se ve reflejado en la concentración de sus fluidos, el cual está influenciada por sus ancestros y su adaptación a la existencia en un medio hiposmótico (Libes S, 1992). Por lo tanto, se enfrentan a dos problemas: la ganancia osmótica de agua y la pérdida de iones. La mayor parte de la energía la gastan expulsando el agua que entra por ósmosis sin expulsar los iones de su interior a través de las vacuolas pulsátiles. Las soluciones a estos dos principales problemas son tres (Rodríguez, 2016):

La impermeabilidad en el tegumento.

Sistemas de excreción de agua (vacuolas pulsátiles).

Sistemas específicos de captura iónica en tegumentos y en el sistema digestivo y excretor.

Se sabe que los KCCs están implicados en la regulación del volumen celular. Por ejemplo, en el antozoario *Aiptasia diaphana* se han mostrado que la regulación del volumen de los nematocitos es inducida por hipotonicidad (Marino *et al*, 2010). Los

nematocistos son secretores especializados y células sensoriales de cnidarios que se usan para estrategias de depredación y agresión.

En la figura 15A se observa que el cotransportador de K^+Cl^- endógeno de *Hydra vulgaris* en un medio hipotónico (120 mOsm) activa la captación del $^{86}Rb^+$ (1080.2 ± 107.4 pmol/ovocito/h) en comparación a un medio isotónico (220 mOsm) en el cual disminuye dicha actividad a 319.9 ± 29.3 pmol/ovocito/h con una diferencia significativa de $p < 0.001$. Al tomar la actividad del cotransportador dependiente de Cl^- en un medio hipotónico como el 100% y compararla con el medio isotónico vemos que la actividad del cotransportador es sólo del 2.46% con una diferencia significativa de $p < 0.001$ (Figura 15B); lo cual indica que el cotransportador es activado por hinchamiento celular dado ante un cambio en la tonicidad del medio.

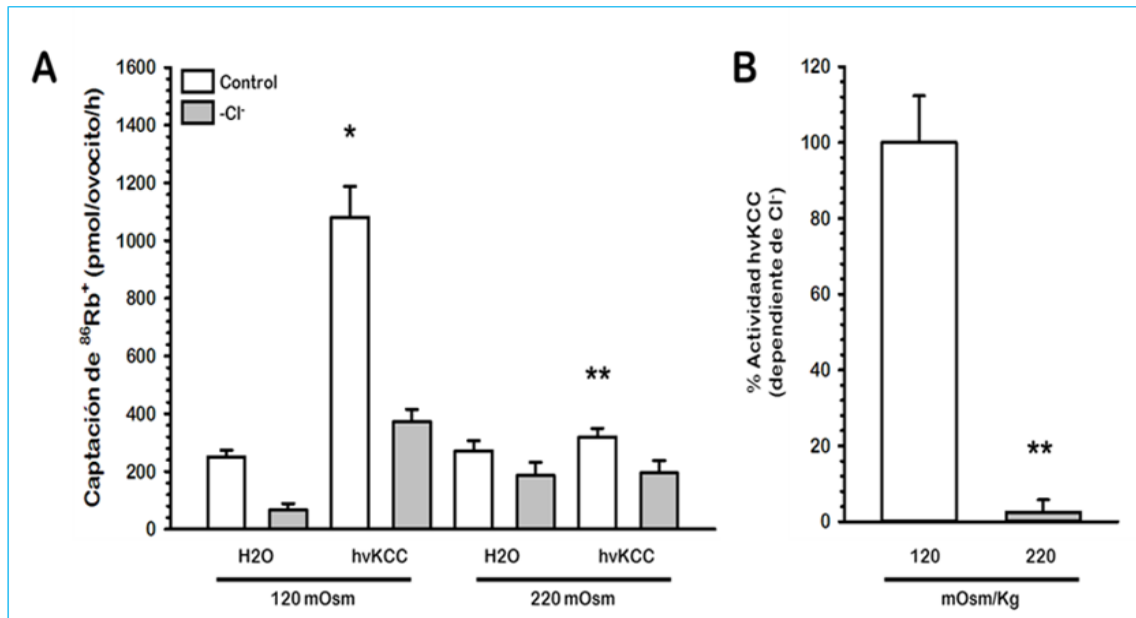


Figura 15. *Hydra vulgaris* expresa un cotransportador de K^+Cl^- endógeno (hvKCC) dependiente de cloro y activado por hinchamiento celular. **A.** La captación de $^{86}Rb^+$ fue determinada en condiciones hipotónicas e isotónicas en presencia (barras blancas) o ausencia de cloro (barras grises) en ovocitos microinyectados con agua o con el cRNA de hvKCC silvestre (* $p < 0.001$ vs. H₂O; ** $p < 0.001$ vs. hvKCC en 120 mOsm). **B.** La captación de $^{86}Rb^+$ dependiente de cloro en hipotonicidad observada en el hvKCC control fue tomada como el 100%, y el efecto de la tonicidad normalizado. Se muestra sólo al KCC de *H. vulgaris* (** $p < 0.001$ vs. hvKCC en 120mOsm). (N=9 experimentos en hipotonicidad y N=4 experimentos en isotonicidad).

A continuación, y dado que la activación de los KCC se asocia con la disminución en la fosforilación de residuos de treonina en el COOH-terminal (Rinehart *et al*, 2009; de los Heros, *et al*, 2014; Hartmann *et al*, 2017), se determinó la activación de hvKCC con el fosfoanticuerpo específico para el sitio 1 (pT1048 en KCC3a; pT892 en hvKCC). La figura 16A muestra la expresión de la proteína total del cotransportador en condiciones hipotónicas e isotónicas. Como se observa en el blot y de acuerdo con lo esperado, la activación por hipotonicidad de hvKCC está asociada a una disminución en la fosforilación del residuo T892 en lisados totales de ovocitos. La densitometría del lado derecho muestra el porcentaje de expresión de hvKCC con respecto a la fosforilación del sitio T892. Así, considerando la isotonicidad como la condición de máxima fosforilación e inactivación de hvKCC ($99.8 \pm 21.6\%$), la hipotonicidad promovió una disminución significativa en el porcentaje de fosforilación del sitio T892 ($5.07 \pm 2.06\%$, $p < 0.03$). Lo anterior indica que hvKCC requiere estar desfosforilado en el residuo T892 para ser activo.

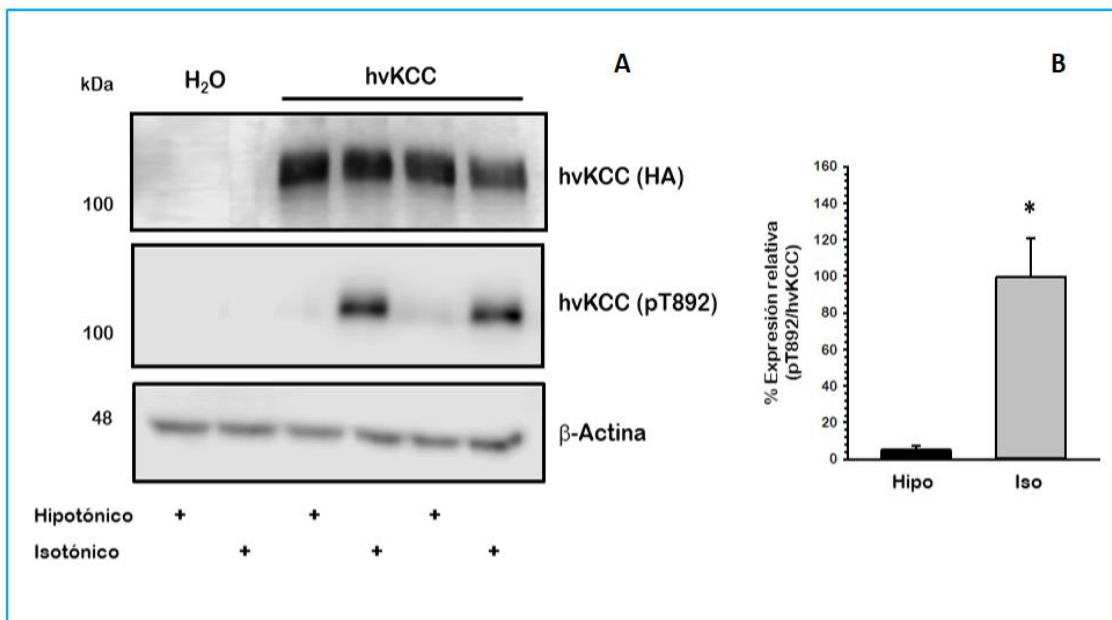


Figura 16. Efecto de la tonicidad del medio sobre la actividad del cotransportador endógeno de K⁺:Cl⁻ de *Hydra vulgaris* (hvKCC). La isotonicidad induce la fosforilación del sitio T892 de hvKCC e inhibe su función. **A. Western blot representativo usando el anticuerpo monoclonal anti-HA, el fosfoanticuerpo pT892 de hvKCC y β-actina como control de carga. Las proteínas totales fueron extraídas de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con agua o con el cRNA de hvKCC y expuestos a condiciones hipotónicas o isotónicas durante 90 minutos, como se señala. Tres diferentes experimentos fueron analizados. Cada banda equivale a tres ovocitos. **B.** Porcentaje de expresión relativa del sitio pT892 de hvKCC en condiciones hipotónicas e isotónicas.**

Una de las principales características del cotransporte de K^+Cl^- es su activación por el agente alquilante N-etilmaleimida (NEM) (Jennings *et al.*, 1991). Este compuesto modifica los grupos sulfhidrilo en residuos de cisteína mediante la formación de enlaces covalentes. Recientemente, Conway *et al.* observaron que, aunque los niveles de proteína total de KCC2 en presencia del NEM no aumentaron en neuronas, si hubo una mayor expresión en la membrana que modificó el perfil de fosforilación de KCC2 aumentando su capacidad de extrusión de Cl^- . Demostraron también una disminución de la fosforilación de la cinasa SPAK durante el tratamiento con NEM, sugiriendo que dicho compuesto podría estar inhibiendo las cinasas WNK (Conway, *et al.*, 2017). Así, los cambios en el estado de fosforilación de KCC2 que Conway *et al.* refieren coinciden con estudios previos que sugieren que el NEM actúa a través de la modulación de una cinasa o fosfatasa involucrada en la regulación de KCC, en lugar de actuar directamente sobre estos transportadores.

En la figura 17 se muestra el efecto que tiene el NEM sobre la función del transportador de K^+Cl^- endógeno de *Hydra vulgaris*. Como se observa, en condiciones isotónicas el NEM incrementó la captación de $^{86}Rb^+$ con respecto al grupo control de 346.9 ± 29.5 pmol/ovocito/h a 2979.1 ± 659.8 pmol/ovocito/h ($p < 0.001$). De tal manera que la adición del NEM en condiciones isotónicas incrementa la función del cotransportador hvKCC del mismo modo que lo hace con las isoformas de vertebrados y muy probablemente, como se ha sugerido, actuando directamente sobre las cinasas WNK.

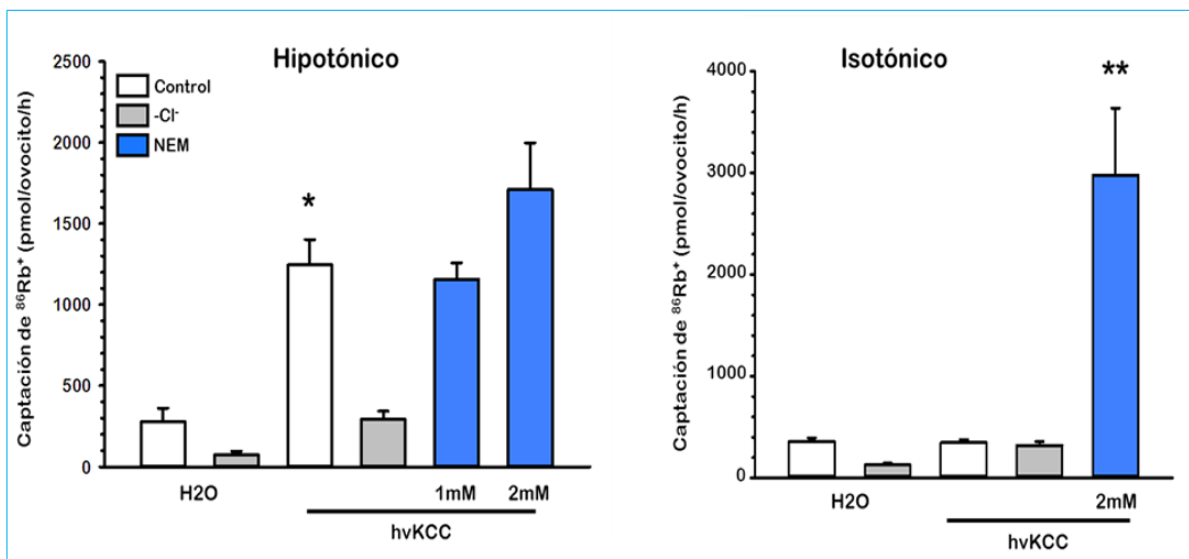


Figura 17. Efecto de la N-etilmaleimida (NEM) sobre la función del cotransportador endógeno de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris*. La captación de $^{86}Rb^+$ fue determinada en condiciones hipotónicas e isotónicas, según se indica, en presencia (barras blancas) o ausencia de cloro (barras grises). Los ovocitos microinyectados con el cRNA de hvKCC silvestre fueron incubados por 15 minutos en presencia de 1 o 2mM de NEM (barras azules) (N=4 experimentos, * $p < 0.001$ vs H₂O; ** $p < 0.001$ vs. hvKCC control).

Se ha demostrado que los cotransportadores de mamífero se regulan mediante un mecanismo de fosforilación y defosforilación (de los Heros P, *et al.*, 2006). Para comprobar que la función del cotransportador de K^+Cl^- endógeno de *Hydra vulgaris* esta modulado por este mecanismo, la figura 18 muestra, en condiciones hipotónicas, el efecto de adicionar caliculina A, un inhibidor de proteínas fosfatasas, particularmente de PP1 α . En esta serie de experimentos se observa que la activación por hinchamiento de hvKCC (1245.1 ± 156.7 pmol/ovocito/h) disminuye a 534.9 ± 112.1 pmol/ovocito/h en presencia de caliculina A con una $p < 0.002$. Esto indica que el cotransportador de K^+Cl^- presente en *Hydra vulgaris* es regulado por proteínas fosfatasas y que, muy probablemente, PP1 α está involucrada en la defosforilación y por tanto en la activación del cotransportador en condiciones hipotónicas.

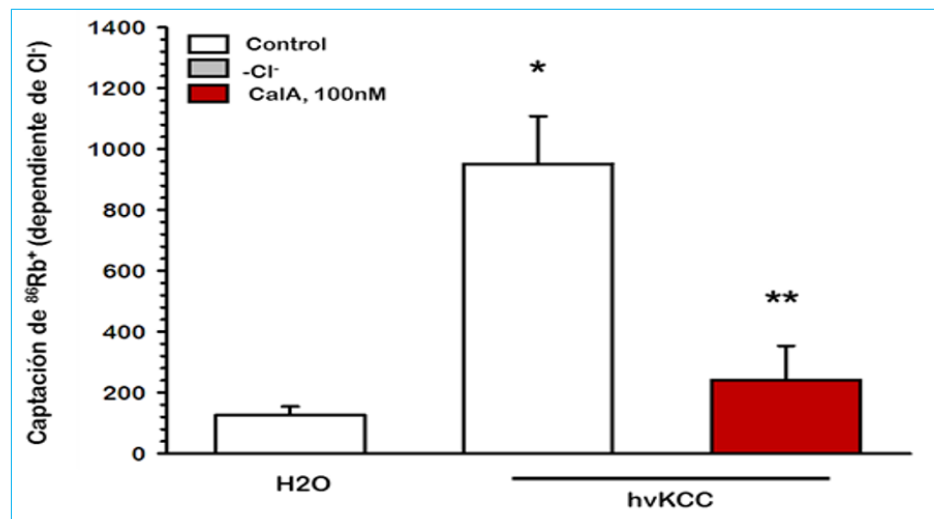


Figura 18. La caliculina A inhibe la función del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* a través de inactivar a las proteínas fosfatasas en condiciones hipotónicas. La captación de $^{86}Rb^+$, dependiente de cloro, fue determinada en condiciones hipotónicas. Los ovocitos microinyectados con el cRNA de hvKCC silvestre fueron incubados durante todo el experimento con 100nM de caliculina A (barra roja) (N=4 experimentos, * $p < 0.001$ vs H₂O, ** $p = 0.002$ vs hvKCC).

Se han reportado múltiples estudios en los cuales se ha demostrado que las cinasas WNK regulan la función de los cotransportadores electroneutros a través de la fosforilación de sitios claramente identificados.

Para determinar si el transportador endógeno de *Hydra vulgaris* es regulado por las cinasas WNK, ovocitos inyectados con hvKCC fueron tratados con el inhibidor específico WNK463, dos horas previas al ensayo de captación. En la figura 19 se observa que en condiciones hipotónicas el tratamiento de hvKCC con el inhibidor no tiene efecto en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ con respecto al control sin tratamiento (2333.2 ± 102.6 pmol/ovocito/h con WNK463 vs 2018.3 ± 148.1 pmol/ovocito/h control, $p=\text{NS}$), lo que confirma que en estas condiciones las cinasas ya están inactivas. En cambio, en condiciones isotónicas, donde está bien documentado que las cinasas WNKs están activas y no así hvKCC, observamos que el tratamiento con el inhibidor WNK463 promueve un aumento significativo en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ que va de 418.5 ± 26.5 pmol/ovocito/h en el grupo control a 2165.4 ± 128 pmol/ovocito/h en el grupo tratado con WNK463 con una $p < 0.001$. Por lo tanto, en condiciones isotónicas en donde las cinasas están activas y mantienen inhibidos a los KCCs a través de la fosforilación, el tratamiento con WNK463 revierte el efecto, abatiendo la función de las cinasas WNKs y permitiendo al transportador activarse.

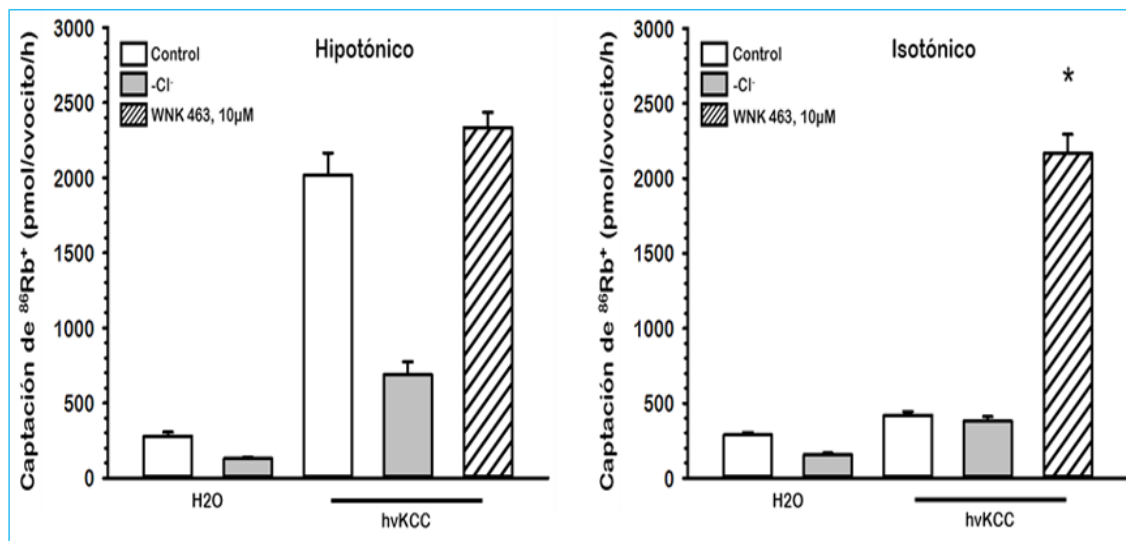


Figura 19. Efecto del inhibidor de cinasas WNK463, sobre la función del cotransportador de K⁺:Cl⁻ de *Hydra vulgaris*. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ fue determinada en condiciones hipotónicas e isotónicas, según se indica, en presencia (barras blancas) o ausencia de cloro (barras grises). Los ovocitos microinyectados con el cRNA de hvKCC silvestre fueron incubados dos horas antes y durante todo el experimento con $10 \mu\text{M}$ del inhibidor WNK463 (barras entramadas) (N= 2 experimentos en hipotonicidad, N=4 experimentos en isotonicidad, * $p < 0.001$ vs hvKCC control).

Resumiendo lo anterior, en la figura 20A se muestra tanto el efecto de la caliculina A como del inhibidor WNK463 sobre la función del cotransportador de K^+Cl^- endógeno de *Hydra vulgaris* (hvKCC). Es evidente que las proteínas fosfatasas y las proteínas cinasas interactúan con este transportador para activarlo/desactivarlo. En la figura del blot (20B) observamos que en presencia del inhibidor de la fosfatasa PP1 aumenta la fosforilación y por lo tanto el cotransportador es inactivo. Por otro lado, la presencia del compuesto WNK463 libera del efecto inhibitorio al cotransportador, por lo cual su fosforilación disminuye y aumenta su actividad. En las gráficas C y D observamos el porcentaje de actividad relativa del sitio pT892 con respecto al blot. Tomando como el máximo de actividad/desfosforilación al KCC de *Hydra* en hipotonicidad ($99.9 \pm 31.8\%$) en isotonicidad se observa un aumento en la fosforilación del sitio T892 del $608.8 \pm 72.3\%$ ($p < 0,001$ vs hipo).

Por su parte en la densitometría del panel D, se compara los valores obtenidos entre los ovocitos con hvKCC y aquellos expuestos a caliculina A en condiciones hipotónicas y se observa un aumento de $357.2 \pm 81.5\%$ en la fosforilación del sitio T892 ($p < 0.03$) que concuerda con la inhibición de la función de hvKCC (panel A). Por otro lado, al comparar a los ovocitos inyectados con el cRNA de hvKCC en condiciones isotónicas ($99.9 \pm 11.8\%$) con los ovocitos expuestos al inhibidor 463 se observa una disminución en la fosforilación ($61.5 \pm 10.2\%$) con una probabilidad de ≤ 0.04 , lo que claramente se sugiere que la fosforilación en este sitio disminuye al adicionar el inhibidor WNK463.

Cabe hacer notar que los ovocitos de *Xenopus* expresan de manera endógena un KCC que, al igual que el resto de la subfamilia de KCCs, es activado por aumento de volumen celular y comparte los mismos sitios de fosforilación. Por lo tanto, es frecuente detectar señal con el fosfoanticuerpo (pT892) en los ovocitos inyectados con agua. Esta señal aumenta en condiciones isotónicas y disminuye en hipotonicidad, lo que concuerda con la inhibición/activación de los KCCs (Mercado *et al*, 2000).

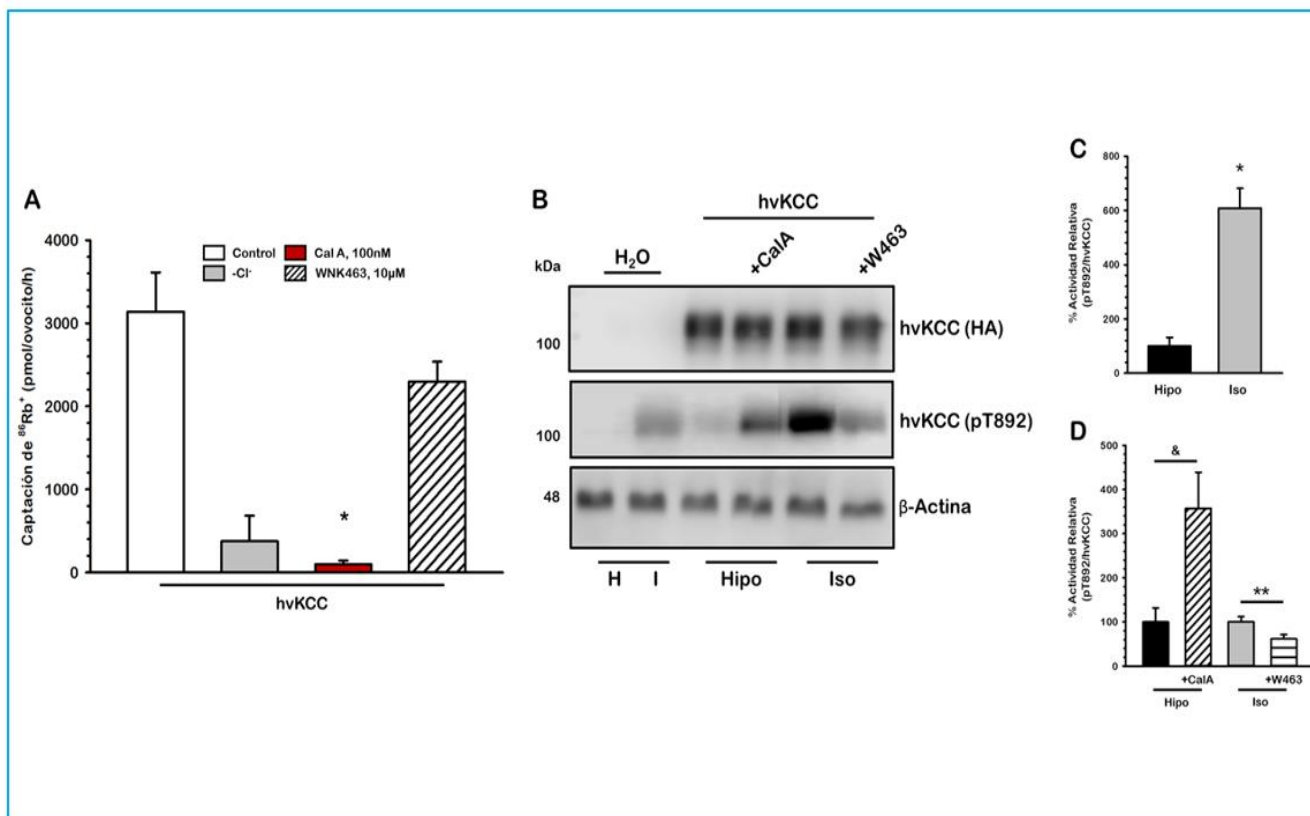


Figura 20. La función del cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ de *Hydra vulgaris* es regulado por la interacción de proteínas fosfatasa y proteínas cinasa. A. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ fue determinada en condiciones hipotónicas en presencia (barra blanca) o ausencia de cloro (barra gris). Los ovocitos microinyectados con el cRNA de hvKCC silvestre fueron incubados durante todo el experimento con 100nM de caliculina A (barra roja) o dos horas antes y durante todo el experimento con 10 μM del compuesto WNK463 (barra entramada) (N=4 experimentos, * $p < 0.001$ vs hvKCC control). **B.** Western blot representativo que muestra al cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ endógeno de *Hydra vulgaris* (hvKCC) en presencia de Cal A o WNK463 en condiciones hipotónicas e isotónicas usando el anticuerpo monoclonal anti-HA, pT892 y β -actina como control de carga. Las proteínas totales fueron extraídas de ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con agua o con el cRNA de hvKCC. Cada banda equivale a tres ovocitos. **C y D.** Porcentaje de actividad relativa del sitio pT892 de hvKCC.

Como se mencionó antes, las proteínas cinasas WNK regulan la activación de los CCC. Con el fin de conocer si el transportador hvKCC es regulado como los KCC de mamífero, se realizaron experimentos coinyectando a la cinasa WNK1. En la figura 21A se muestra el ensayo de captación en condiciones hipotónicas. Los ovocitos inyectados con el cRNA de hvKCC silvestre (barra blanca) muestran una captación de $^{86}\text{Rb}^+$ de 3138.6 ± 472.8 pmol/ovocito/h que al compararlo con el grupo coinyectado con WNK1 (barra verde) disminuye a 1049 ± 363.3 pmol/ovocito/h con una $p=0.004$. Por lo tanto, la cinasa WNK1 es capaz de fosforilar al transportador e inhibir su función. En el Western blot (B) se observó que, al coinyectar ovocitos con estas proteínas y someterlos a estrés hipotónico aumenta la señal de fosforilación del transportador, evidenciado en el ensayo funcional como la disminución en la actividad del cotransportador de hvKCC en presencia de la cinasa WNK1 (barra verde). Las gráficas en el panel C muestran la expresión relativa de hvKCC de acuerdo al nivel de fosforilación del sitio T892. Tomando como el máximo porcentaje de desfosforilación/activación de hvKCC en hipotonicidad ($99.7 \pm 62.1\%$) y al compararlo con su exposición a isotonicidad o en presencia de WNK1 se observa un aumento del $528.7 \pm 13.9\%$ y $1134.3 \pm 66.8\%$, respectivamente ($p<0.03$) de la señal de fosforilación. Por su parte, en condiciones isotónicas, la fosforilación de hvKCC ($100.02 \pm 2.6\%$) en presencia de WNK1, se observa un aumento en la fosforilación del sitio T892 ($161.1 \pm 8.7\%$, $p<0.03$), sugiriendo que las proteínas cinasas del tipo WNK fosforilan al transportador y por lo tanto inhiben su función (panel A).

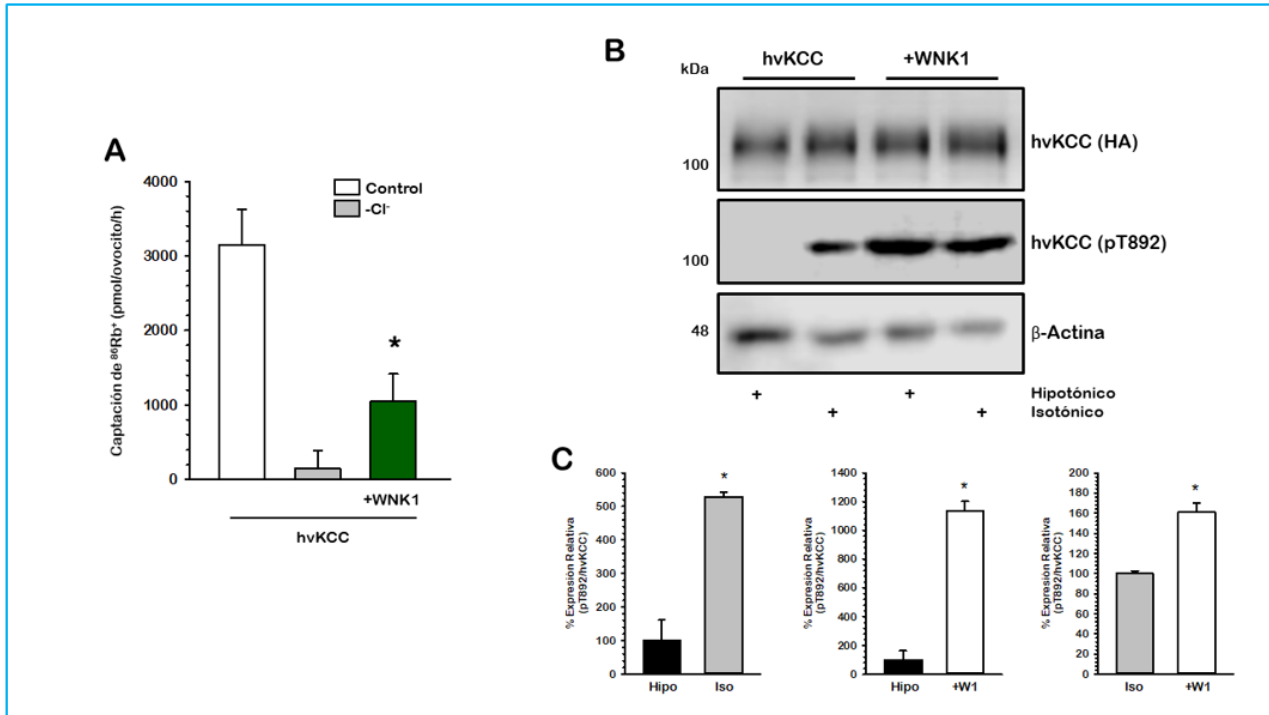


Figura 21. Efecto de la cinasa WNK1 sobre la función del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris*. **A.** La captación de $^{86}Rb^+$ fue determinada en condiciones hipotónicas en presencia (barras blancas) o ausencia de cloro (barras grises). Los ovocitos coinyectados con el cRNA de hvKCC y de la cinasa WNK1 se muestra en la barra verde (N= 2 experimentos, *p=0.004 vs. hvKCC control). **B.** Western blot representativo de hvKCC en presencia de WNK1 en condiciones hipotónicas e isotónicas. Los anticuerpos usados fueron anti-HA monoclonal, pT892A y β -actina como control de carga. Las proteínas totales fueron extraídas de ovocitos de *Xenopus laevis*. Cada banda equivale a tres ovocitos. **C.** Expresión relativa con respecto al blot de acuerdo a la fosforilación de sitio T892.

En la figura 22 analizamos la coexpresión del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris* con la cinasa WNK1 en presencia del compuesto WNK463. Como se puede ver en la gráfica, al coexpresar a WNK1, la actividad del transportador disminuye con respecto al control (3138.6 ± 472.8 pmol/ovocito/h vs. 1048.9 ± 363.3 pmol/ovocito/h, p=0.004), y al adicionar el compuesto WNK463, un inhibidor específico de las cinasas WNK, la actividad del cotransportador aumenta a 4464.2 ± 260.5 pmol/ovocito/h con una significancia de p<0.001 con respecto al control sólo o coinjectado con WNK1. Esto es, la inactivación de la cinasa WNK1 por el compuesto WNK463 evita la fosforilación de hvKCC permaneciendo desfosforilado y activo.

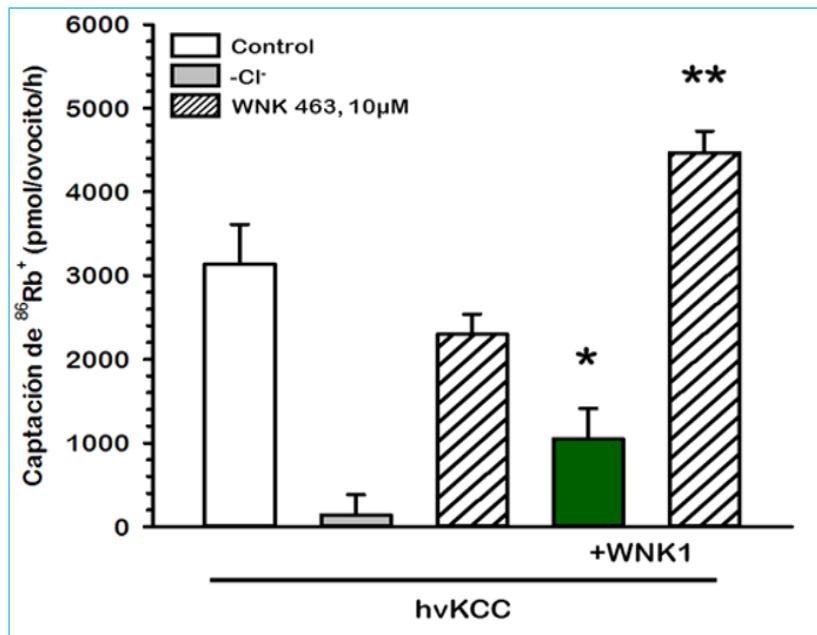


Figura 22. WNK463 abate la función de la cinasa WNK1, liberando al cotransportador de K⁺:Cl⁻ de *Hydra vulgaris* de su efecto inhibitor. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ fue determinada en condiciones hipotónicas en presencia (barra blanca) o ausencia de cloro (barra gris). Los ovocitos inyectados con el cRNA de hvKCC o coexpresados con WNK1 (barra verde) fueron incubados dos horas antes y durante todo el experimento con 10 µM del compuesto WNK463 (barras entramadas) (N= 2 experimentos, *p=0.004 vs hvKCC control, **p<0.001 vs hvKCC o coinyectado con WNK1).

Resumiendo lo anterior, en la figura 23 se muestra el Western blot del cotransportador de K⁺:Cl⁻ de *Hydra vulgaris* en donde se compara su fosforilación en presencia de caliculina A (inhibidor de fosfatasas), NEM, el compuesto WNK463 y la cinasa WNK1 en condiciones hipotónicas e isotónicas. Aquí observamos que la fosforilación del sitio T892 en presencia de caliculina A aumenta con respecto al control en hipotonicidad (445.6 ± 85.2%) y por lo tanto se abate la función de hvKCC. Cuando la cinasa WNK1 es coinyectada con hvKCC, la señal de fosforilación a través del sitio T892 del cotransportador aumenta con respecto al control (122.4 ± 7.7%) y en presencia del compuesto WNK463 (42.6 ± 4.8%), que inhibe la función de la cinasa WNK1, el cotransportador se defosforila, lo que se traduce en la

inactivación de hvKCC. Por su parte, en condiciones isotónicas, la incubación del cotransportador con el compuesto NEM ($37 \pm 4.83\%$), disminuye la fosforilación del sitio T892 del transportador con respecto a su basal ($99.8 \pm 20.5\%$) y por tanto hvKCC puede activarse. Así pues, hvKCC es un cotransportador de K^+Cl^- regulado por eventos que involucran la presencia de cinasas y fosfatasa.

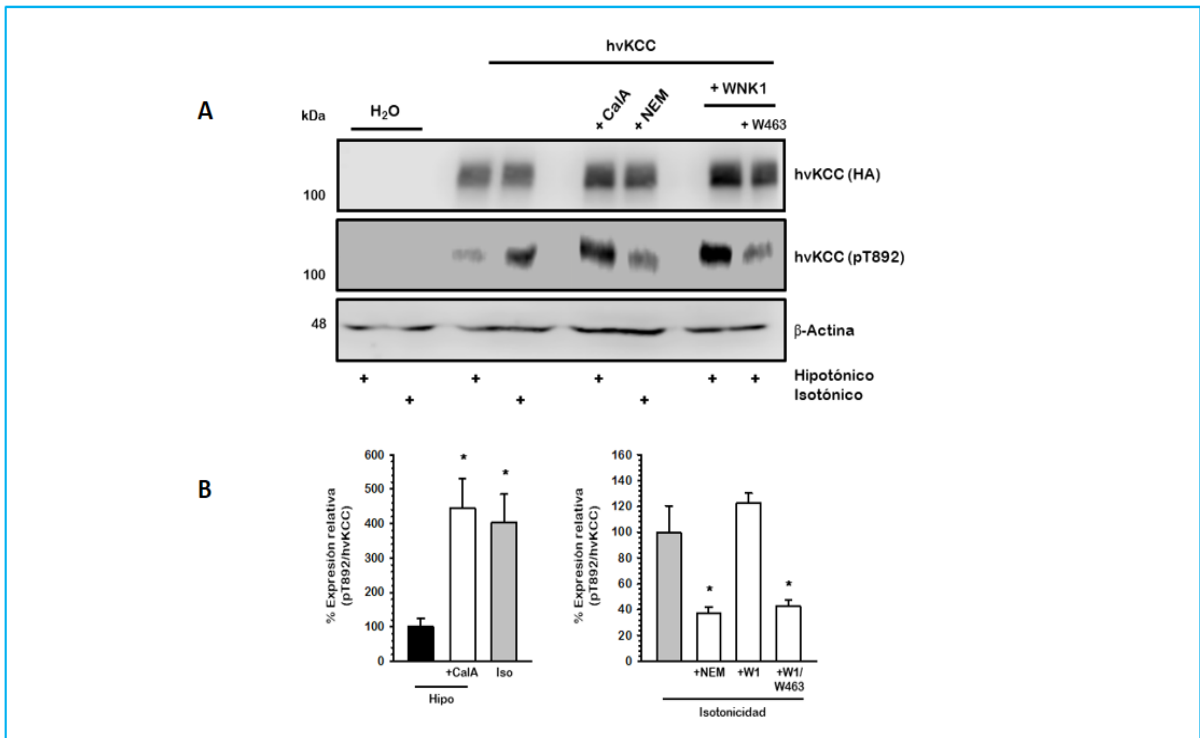


Figura 23. Análisis de Western blot del cotransportador de K^+Cl^- endógeno de *Hydra vulgaris* (hvKCC) en presencia de diversos estímulos. Las proteínas totales fueron extraídas de ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con agua o con el cRNA de hvKCC y expuestos CalA (100nM), NEM (2mM), WNK1 y WNK463 (10 μ M) en condiciones hipotónicas e isotónicas. Cada banda equivale a tres ovocitos. **B.** Porcentaje de expresión relativa del sitio pT892 de hvKCC.

Para demostrar el papel de la fosforilación y defosforilación en la función del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris*, se generaron las mutantes fosfoablative hvKCC-T892A y fosfomimética hvKCC-T892D, mediante mutagénesis sitio dirigida. Como se mencionó previamente, este sitio está conservado en todas las isoformas de KCCs a lo largo de la escala evolutiva (Hartmann *et al*, 2017; Hartmann *et al*, 2015). El ensayo funcional en condiciones hipotónicas de la figura 24 muestra mayor captación de la mutante hvKCC-T892A con respecto a la clona silvestre hvKCC (2000.1 \pm 142.9 pmol/ovocito/h vs 1412.7 \pm 164.5 pmol/ovocito/h, $p=0.003$), sin cambios significativos con la mutante hvKCC-T892D (1690.5 \pm 158.4 pmol/ovocito/h, $p=0.09$). En condiciones isotónicas ninguna mutante mostró diferencias significativas (hvKCC: 300.3 \pm 27.1; T892A 365 \pm 32.9; T892D 435.3 \pm 40.7 pmol/ovocito/h, $p=NS$). Aunque es común la generación de mutantes fosfoablative y fosfomiméticas cambiando los residuos de aminoácidos fosforilables por alaninas o aspartatos, respectivamente, no siempre estos muestran diferencias en la función de las proteínas. Por este motivo, los ensayos de inmunodetección del tipo Western blot aportan información adicional y complementaria que permite analizar la función de estos cotransportadores con un enfoque bioquímico.

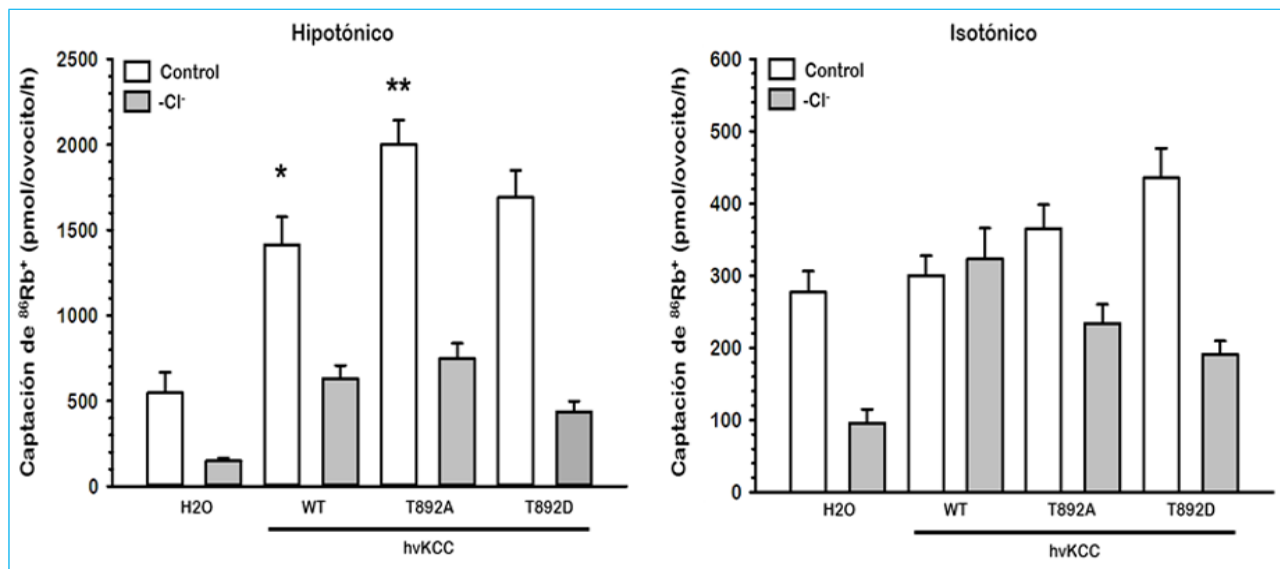


Figura 24. Efecto de las mutantes de fosforilación en la función del cotransportador de K^+Cl^- de *Hydra vulgaris*. La captación de $^{86}Rb^+$ fue determinada en condiciones hipotónicas e isotónicas, según se indica, en presencia (barras blancas) o ausencia de cloro (barras grises). Las mutantes de fosforilación T892A y T892D se muestran en las abscisas (N= 3 experimentos, * $p<0.001$ vs. H₂O, ** $p=0.003$ vs. hvKCC

Se ha indicado que los KCCs presentan residuos de treonina denominados Sitio-1 (Tre991 en KCC3) y Sitio-2 (Tre1048 en KCC3), ambos ubicados dentro del dominio C-terminal. Estos sitios juegan un papel crítico en el control de la actividad de los KCC (Rinehart *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2013; de los Heros, *et al.*, 2014). En el caso de *Hydra vulgaris* los sitios potenciales de fosforilación conservados se localizan en los residuos Tirosina887, Treonina892 y Tirosina1003 análogos a los residuos Tirosina903, Treonina906 y Tirosina 1087 de KCC2, que son importantes para la regulación postraducciona de los KCCs de mamífero (Hartmann A y Nothwang, 2015; Weber 2014). Es muy posible que al generar mutaciones simples o compuestas en estos sitios se pueda encontrar una mayor activación del cotransportador en condiciones isotónicas.

CONCLUSIÓN

El cotransportador identificado en *Hydra vulgaris* es un KCC ya que, de forma electroneutra, transporta potasio dependiente de cloro, es activado por hipotonicidad y NEM, es sensible a inhibidores de proteínas fosfatasas y cinasas del tipo WNK. Además, este transportador juega un papel importante en la regulación del volumen celular en *Hydra vulgaris*, sugiriendo que estos cotransportadores están presentes en organismos menos especializados como resultado de una adaptación a las condiciones de su entorno.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adragna NC, Di Fulvio M, Lauf PK. Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *Journal of membrane Biology*. **2004**; 201: 109-137.

Conway LC, Cardarelli RA, Moore YE, et al. *N*-Ethylmaleimide increases KCC2 cotransporter activity by modulating transporter phosphorylation. *Journal Biology Chemistry*. **2017**; 292:21253-21263.

Curtis H, Barnes S, Schnek A. *Biología*. 7ª ed. Médica Panamericana. Madrid, España. **2008**. Pág. 1009.

Cherak SJ, Gugala N, Turner RJ. Transporte de membrane. Universidad de Calgary, Alberta, Canadá. **2016**.

Delpire E. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiology Sociology*. **2000**; 15: 309-312.

Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters, *Review of Physiol*. **2005**; 85: 423-493.

Guillen A. Mundo Microscopico, Imagen: *Hydra vulgaris*. Actualizada: Junio **2015**. [Fecha consultada: 4 Mayo 2018]. Recuperado de: <https://www.biodiversidadvirtual.org/micro/Hydra-vulgaris-img1434.html>

Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica, 12ª ed. Elsevier Saunders. **2002**. Pág 44.

de los Heros P, Garzón-Muvdi T, Gamba G. Regulación de los cotransportadores electroneutros por las cinasas WNK. *Boletín Bioquímico*. **2006**.

de los Heros P, Alessi DR, Gourlay R, et al. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺:Cl⁻ co-transporters. *Biochem. Journal*. **2014**; 458, 559–573.

Hickman C. P., Roberts, R. G. y Larson, A. C. Principios integrales de Zoología. Mc Graw-Hill Interamericana. España. **1998**. Pág 1119.

Hartmann A y Nothwang HG. Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. **2015**. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 470.

Hartmann AM, Tesch D, Nothwang HG, *et al.*, ORP. Evolution of the Cation Chloride Cotransporter Family: Ancient Origins, Gene Losses, and Subfunctionalization through Duplication. *Molecular biology and evolution*. **2017**; 31(2):434-447.

Haas M, Forbush B 3rd. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Review Physiol*. **2000**; 62:515–534.

Hekmat-Safe DS, Lundy MY, Ranga R, *et al.* Mutations in the K⁺/Cl⁻ cotransporter gene *kazachoc* (*kcc*) increases seizure susceptibility in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*. **2006**; 26:8943-54.

Hernández S. Astronatura, Imagen: Polipo. actualizada: Septiembre **2016**. [Fecha consultada: 4 Mayo 2018]. Recuperado de: <https://www.asturnatura.com/articulos/cnidarios/hidrozoos.php>

Jennings ML, Schula RK. Okadaic acid inhibition of KCl cotransport. Evidence that protein de phosphorylation necessary for activation of transport by either cell swelling or N-ethylmaleimide. *Journal General Physiology*, **1991**, 97(4). 799-8817

Joiner CH, Rettig RK, Jiang M, *et al.* Urea stimulation of KCl cotransport induces abnormal volume reduction in sickle reticulocytes. *Blood* **2007**; 109:1728–1735.

Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, *et al.* WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **2004**; 101: 2064-2069

Lang F, Busch GL, Ritter M, *et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Review Physiology*. **1998**; 78: 247-306.

Libes, S. An introduction to marine biogeochemistry. **1992**. Edit Wiley and Sons Inc. 734

Marino A, Morabito R, La Spada G, *et al.* Mechanisms of hyposmotic volume regulation in isolated nematocystes of the anthozoan *Aiptasia diaphana*. *Cell Physiology Biochem*. **2010**; 26(2): 209-218.

McCormick JA y Ellison DH. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Review Physiology*. **2011**; 91(1): 177–219.

Melo Z, de Los Heros P, Cruz-Rangel S, *et al.* N-terminal Serine Dephosphorylation Is Required for KCC3 Cotransporter Full Activation by Cell Swelling. *Journal of Biological Chemistry*. **2013**. 288(44):31468-76.

Mercado A, Luyan S, Norma V *et al.* Functional comparison of the K⁺:Cl⁻ cotransporter KCC1 and KCC4. *Journal of Biological Chemistry*. **2000**; 275 (39): 30326-30334

Mercado A, Mount DB, Gamba G. Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem.* **2004**; 29: 17-25.

Mercado A y Melo Z. Aspectos fisiopatológicos de los cotransportadores de K⁺:Cl⁻. *Revista de Investigación Clínica.* **2014**; 66(2):18873-180.

Raisman JS. Proteínas de membrana [en línea] Actualizada Enero **2000**. [Fecha consultada: 15 Abril 2018]. Disponible en: www.biblioteca.org.

Rigalli A. Transporte a través de membranas [en línea]. Actualizada: septiembre **2017**. [Fecha consultada: 18 Abril 2018]. Disponible en: rephip.unr.edu.ar/bitstream/.../transporte%20a%20traves%20de%20membranas.pdf?

Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, *et al.* Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell.* **2009**; 138, 525–536.

Rodríguez Pablo. La osmosis de los animales, infobiolo [en línea]. Actualizada: Diciembre **2016**. [Fecha consultada: 2 Septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.infobiologia.net/2016/12/osmosis-animales.html>

Romá Mateo, C. Hablando de ciencia. [en línea]. Actualizada: 28 Junio 2012. [Fecha consultada: 4 Mayo 2018]. Disponible en: <https://www.hablandodeciencia.com/articulos/2012/06/28/sutiles-cambios-quimicos-drasticas-consecuencias-para-la-funcion-de-las-proteinas/>

Ruppert E. y Barnes D. *Zoología de los Invertebrados*. Mc Graw-Hill Interamericana. 6^a ed. México. **1996**. Pág: 1114.

Schuchert, P. *Hydra vulgaris* Pallas, 1766. World Hydrozoa database. World Register of Marine Species. **2011**. Pág: 12-18.

Strange K, Denton J, Nehrke K. Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology (Bethesda)*. **2006**; 21:61–68.

Tanis JE, Bellemer A, Moresco JJ, *et al.* The potassium chloride cotransporter KCC-2 coordinates development of inhibitory neurotransmission and synapse structure in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosc.* **2009**; 29: 9943-54.

Weber M, Hartmann A-M, Beyer T, Ripperger A, *et al.* A novel regulatory locus of phosphorylation in the C-terminus of the potassium chloride cotransporter KCC2 that interferes with Nethylmaleimide or staurosporine mediated activation. *Journal of Biological Chemistry.* **2014**: M114.

Xu B, English JM, Wilsbacher JL, *et al.* WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *Journal Biology Chemistry*. **2000**; 275(22): 16795–801.

Zhao W, Tian Y, Cai M, *et al.* Studying the nucleated mammalian cell membrane by single molecule approaches. *Plos One*. **2014**; 9(5):e91595.