



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL CO-TRANSPORTADOR
DE NaCl POR LA LIGASA DE UBIQUITINA KLHL3.”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LBM. JAZMINE PAOLA ARÉVALO BAUTISTA

TUTOR PRINCIPAL

DR. GERARDO GAMBA AYALA

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DRA. LORENZA GONZÁLEZ-MARISCAL

Depto. De Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV

MÉXICO, D. F. AGOSTO, 2015



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, ubicada en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con la asesoría del Dr. Gerardo Gamba Ayala.

Mis estudios de maestría fueron apoyados por la beca otorgada por el CONACyT (No. de registro 549678).

Al Dr. Gerardo Gamba Ayala

Por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutela, por su tiempo, confianza y apoyo en todo momento.

A los miembros del laboratorio

Zesergio, Lorena, Alejandro, Zaira, Luz, Paola, Silvana, Eduardo, Erika, Diana, Adriana, María, Víctor y Karla. Por su amistad, compañerismo y disposición de compartir conmigo sus conocimientos.

Al Dr. Jesús Aguirre y a la Dra. Lorenza González-Mariscal

Por su crítica constructiva y sugerencias en la elaboración de éste proyecto.

A la QFB. Norma Vázquez

Por la ayuda en el desarrollo de experimentos.

Resumen

El síndrome de Gordon o también conocido como pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII), es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por hipertensión arterial con hipercalemia y acidosis metabólica debido a que el co-transportador electroneutro de NaCl sensible a tiazidas (NCC) en el túbulo contorneado distal de la nefrona se encuentra anormalmente activo. Los genes que se han identificado como productores de la enfermedad son dos cinasas conocidas como WNK1 y WNK4, y dos más que codifican para las proteínas KLHL3 y CUL3, que juntas forman un complejo ligasa de ubiquitina tipo RING. Se sabe que las cinasas WNK regulan la actividad de NCC - a través de la cascada de señalización WNK-OSR1/SPAK-NCC -, y que las isoformas WNK1 y WNK4 son sustratos del complejo KLHL3-CUL3; de tal manera que, las mutaciones de tipo PHAII en cualquiera de estas proteínas, impiden la interacción de las cinasas y el complejo ligasa de ubiquitina, causando un aumento en la actividad de NCC. Reportes de pacientes con mutaciones *missense* en WNK1 con fenotipo de hipercalemia y acidosis metabólica pero sin hipertensión, así como el hallazgo de un aminoácido potencialmente fosforilable en el dominio de unión de WNK3 con KLHL3 sugirieron la posible existencia de una regulación específica de éstas cinasas con respecto a su interacción con KLHL3. Se utilizaron ovocitos de rana *Xenopus laevis* como sistema de expresión funcional heteróloga para co-expresar RNAc de NCC, WNK1, WNK3, WNK4, KLHL3 y SGK1, y mutantes de las mismas para esclarecer los mecanismos por los cuales se regula la cascada de señalización que activa al co-transportador NCC. Se realizaron estudios con células HEK293 para analizar el efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3 sobre las cinasas WNK. Se encontró que el efecto de KLHL3 sobre la cinasa WNK1 es regulado por SGK1, y que la Thr541 de la cinasa WNK3 es importante para su reconocimiento y degradación por KLHL3. Estos resultados muestran la existencia de una regulación muy fina y específica del efecto de KLHL3 sobre las cinasas WNK1 y WNK3.

Índice

	Página
Resumen	4
Abreviaturas	6
Introducción	7
Anatomía y Fisiología del Riñón	7
Equilibrio Hídrico	13
Presión Arterial	15
Eje Renina-Angiotensina-Aldosterona	16
Co-transportadores Electroneutros Acoplados a Cl ⁻	21
Co-transportador de Na ⁺ :Cl ⁻ Sensible a Tiazidas (NCC)	22
Enfermedades Relacionadas con NCC	25
Cinasas WNK	28
Cascada de Señalización WNK-SPAK/OSR1-NCC	31
El Complejo KLHL3-CUL3 y El Sistema de Ubiquitina	32
Planteamiento del Proyecto	46
Justificación	46
Objetivos	47
Materiales y Métodos	48
Resultados	51
Discusión	66
Conclusiones	72
Perspectivas	74
Referencias	75

Abreviaturas

SCL12	Familia de co-transportadores electroneutros acoplados a Cl ⁻
NCC	Co-transportador de Na ⁺ :Cl ⁻ sensible a tiazidas
NKCC1	Co-transportador de Na ⁺ :K ⁺ :2Cl ⁻ tipo 1 sensible a bumetanida
NKCC2	Co-transportador de Na ⁺ :K ⁺ :2Cl ⁻ tipo 1 sensible a bumetanida
KCC1-4	Co-transportador de K ⁺ :Cl ⁻ tipo 1-4
IC	Intracelular
EC	Extracelular
TA	Tensión Arterial / Presión Arterial
GC	Gasto Cardíaco
RPT	Resistencia Periférica Total
RAA	Renina-Angiotensina-Aldosterona
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ADH/AVP	Hormona Antidiurética / Arginina Vasopresina
AngII	Angiotensina II
MR	Receptor de Mineralocorticoides
SGK1	Cinasa de Glucocorticoides en Suero tipo 1
11-βHSD2	11-β Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 2
TCP	Túbulo Contorneado Proximal
TCD	Túbulo Contorneado Distal
TCN	Túbulo Conector
DC	Ducto Colector
MD	Mácula Densa
ENaC	Canal Epitelial de Na ⁺
ROMK	Renal Outer Medullary K ⁺ Channel
ASDN	Nefrona Distal Sensible a Aldosterona
Nedd4-2	Proteína Expresada en Desarrollo Neuronal 4-2
KLHL3	Proteína tipo Kelch 3
CUL3	Proteína Cullin 3
WNK	Cinasa "With No K (lysine)"
PKC	Proteína Cinasa C

Introducción

La hipertensión arterial alta (HTA) es una de las enfermedades crónicas más comunes en la actualidad y constituye el factor de riesgo No. 1 de muerte en el mundo, por lo que se considera uno de los problemas de salud pública más importantes. La prevalencia en adultos es mayor al 30%. Los individuos que poseen ésta enfermedad tienen alta propensión a desarrollar otras alteraciones como fallo renal crónico, infarto agudo al miocardio, insuficiencia cardiaca y accidentes cerebrovasculares. La HTA se define como el incremento de la presión arterial diastólica <90 mmHg, acompañada de una presión arterial sistólica <140 mmHg^{[1][2]}.

En el 90% de los casos de hipertensión la causa es desconocida, pero se sabe que posee un importante componente genético, ya que es más común en descendientes de individuos hipertensos que en aquellos con padres normotensos. Se han estudiado más de 50 genes que podrían estar involucrados en el desarrollo de la enfermedad, por lo que es evidente que no es una enfermedad monogénica, sino el resultado de una herencia poligénica susceptible a factores ambientales, de los cuales los más importantes son el consumo de sal^[3] y la obesidad.

Con el fin de poder entender la importancia fisiológica de los mecanismos de reabsorción de sal que se estudian en éste trabajo, a continuación se hace una breve revisión del órgano encargado del mantenimiento y regulación de la presión arterial, el riñón.

Anatomía y Fisiología del Riñón

El riñón es el órgano encargado de mantener la homeostasis del cuerpo y de regular la presión arterial, manteniendo el equilibrio hídrico y el equilibrio ácido-base, a través de mecanismos de filtración, reabsorción y excreción de productos residuales de la sangre que son eliminados en la orina.

En el cuerpo humano existen dos riñones, cada uno de ellos conectados con el resto del organismo vía el hilio renal, el cual constituye el sitio de entrada y salida de la arteria y vena renal, el uretero y terminales nerviosas que acompañan a los vasos sanguíneos^[4].

Cada riñón humano está constituido por cerca de un millón de unidades funcionales llamadas nefronas. Cada nefrona consta de un glomérulo (grupo de capilares sanguíneos), rodeado por la cápsula de Bowman que desemboca en un túbulo compuesto por varios segmentos especializados en la filtración del plasma sanguíneo. En conjunto, las nefronas tienen la capacidad de filtrar el 20% del gasto cardiaco (GC) que corresponde a 125ml/min = aprox. 180 L/día, y producir cerca de 1 L de orina. Lo anterior corresponde a una tasa de reabsorción del 99.4% de lo que se filtra a nivel glomerular, por lo cual la regulación de los diferentes componentes filtrados es de suma importancia.

La nefrona se compone de diferentes segmentos o porciones, que son: glomérulo, túbulo contorneado proximal (TCP), asa descendente de Henle, asa ascendente de Henle, túbulo contorneado distal (TCD), túbulo conector (TCN) y ducto colector (DC)^[5] (**Figura 1**).

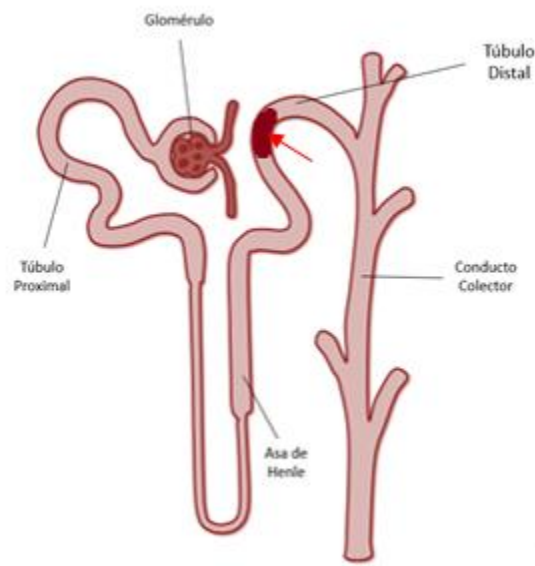


Figura 1. Nefrona. Segmentos en los que se divide la unidad funcional del riñón. Mácula densa (flecha roja).

Cada segmento posee funciones específicas en la filtración y reabsorción de los diferentes componentes del plasma sanguíneo y líquido extracelular. Desde el punto de vista regulatorio, la nefrona se puede dividir en dos segmentos distintos:

- Nefrona proximal, conformada por: glomérulo, TCP, asa de Henle (descendente y ascendente) y mácula densa (MD).
- Nefrona distal, conformada por TCD, TCN y DC.

Las diferencias histológicas de cada una de las porciones de la nefrona son esenciales para las tres funciones básicas del riñón: filtración, reabsorción y secreción. La filtración corresponde al proceso mediante el cual los componentes del plasma se filtran a través del glomérulo y ocurre gracias a la alta presión hidrostática que existe entre la arteriola aferente y la arteriola eferente, y a las fenestraciones de los capilares glomerulares. Esto permite que los diferentes componentes plasmáticos: H_2O , Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , glucosa, entre otros, posean la misma concentración en el filtrado glomerular y el plasma. Una excepción a esto son las proteínas que no se filtran debido a su tamaño y a la concentración de cargas negativas que se encuentran en la membrana basal del capilar glomerular y en los podocitos, los cuales son células especializadas que recubren los capilares glomerulares dentro de la cápsula de Bowman. El filtrado entonces, es conducido hacia los diferentes túbulos de la nefrona (**Figura 2**).

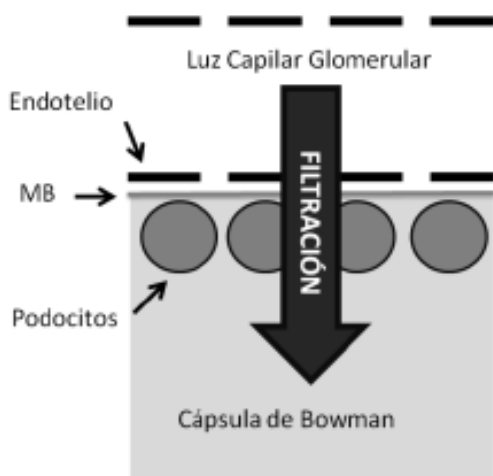


Figura 2. Barrera de filtración glomerular. Estructura formada por el endotelio capital fenestrado, la membrana basal y los podocitos. Estos dos últimos componentes, con una carga neta negativa que impide el paso de proteínas por oposición de cargas.

La mayor parte de la reabsorción (90-95%) ocurre en la nefrona proximal. En el TCP, la reabsorción de agua va ligada a la reabsorción de NaCl, la cual se lleva a cabo gracias a la presencia de diferentes transportadores e intercambiadores que modifican la reabsorción de Na⁺, entre los cuales encontramos a los co-transportadores de Na⁺/Glucosa, Na⁺/Fosfato y el co-transportador de Na⁺/H⁺. Posteriormente, la porción descendente del asa de Henle, sólo reabsorbe agua, mientras que la porción ascendente, reabsorbe exclusivamente iones. Esto tiene un efecto directo sobre la regulación de la osmolaridad plasmática. Por lo tanto, el riñón es el órgano blanco de la vasopresina, ya que es en ésta región de la nefrona (asa de Henle) en donde la activación de la retención de NaCl favorece la concentración urinaria y la retención de agua como efectores de la regulación de la osmolaridad del organismo. Sin embargo, la regulación del volumen y del balance de iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻, se lleva a cabo en porciones más distales de la nefrona. Esto se debe a un mecanismo llamado retroalimentación túbulo-glomerular, el cual ocurre entre la mácula densa (MD) y el glomérulo. La mácula densa, es un conjunto de células especializadas que se localizan en la transición del asa ascendente de Henle y el TCD. Esta estructura particular de la nefrona está localizada entre la arteriola aferente y eferente y le permite detectar la concentración de NaCl y por tanto, regular el filtrado glomerular de manera inversa. P/e: ante una disminución de la concentración de NaCl, la MD aumenta el filtrado glomerular mediante mecanismos de vasodilatación en la arteriola aferente y mediante la liberación de prostaglandinas que estimulan la liberación de renina por la cápsula suprarrenal y a su vez la activación del Eje Renina-Angiotensina-Aldosterona. Esto significa que las modificaciones en la reabsorción de NaCl que ocurran antes de la MD, son compensadas por cambios en el filtrado glomerular^{[5][6]}. En cambio, en la nefrona distal, donde existe una reabsorción del 5-10% del filtrado glomerular no existe un mecanismo de retroalimentación local, es por esto que las variaciones en la reabsorción de NaCl a este nivel son las que establecen el contenido urinario de NaCl y por consiguiente determinan el volumen extracelular y la tensión arterial (TA)^{[7][8]}.

La nefrona distal como se mencionó antes, está formada por tres segmentos histológica y funcionalmente diferentes: TCD, TCN y DC. A su vez, el túbulo contorneado distal se subdivide en TCD proximal (TCD1) y distal (TCD2)^{[7][8][9][10][11]}. Cada uno de estos segmentos se caracteriza por la expresión diferencial de proteínas de transporte y reguladoras, sugiriendo mecanismos de regulación complejos. En la nefrona distal la reabsorción de Na⁺ ocurre a través de dos vías: el co-transportador electroneutro de NaCl sensible a tiazidas (NCC), que se expresa exclusivamente en TCD con una amplia expresión en TCD1 que decae gradualmente a lo largo de TCD2, y el canal epitelial de Na⁺ sensible a amilorida (ENaC), cuya expresión aumenta gradualmente a lo largo de TCD2 y es mayor en TCN y DC^[7]. ENaC no se expresa en TCD1. La co-expresión de NCC y ENaC en TCD2 genera tres segmentos distintos: TCD1 donde sólo se expresa NCC, TCD2 donde se encuentran NCC y ENaC, y TCN/DC donde sólo ENaC está expresado (**Figura 3**).

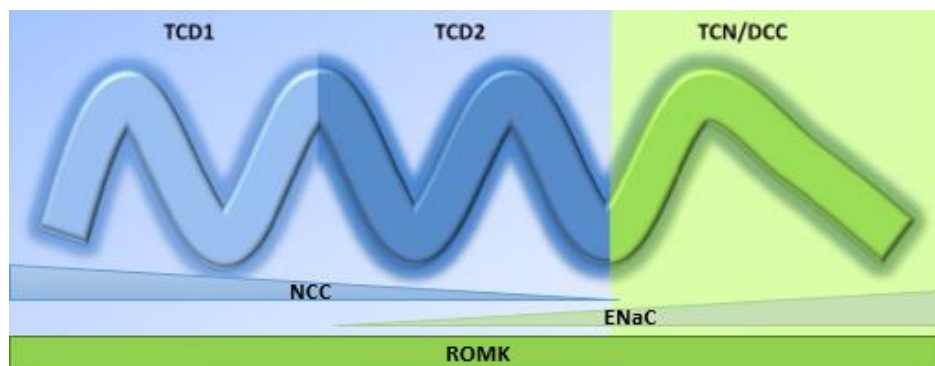


Figura 3. Nefrona distal. La nefrona distal está dividida en su porción proximal (TCD1) y distal (TCD2), túbulo conector (TCN) y ducto colector cortical (DCC) (en verde). La expresión de NCC y ENaC a lo largo de la nefrona distal es diferencial, mientras que ROMK se encuentra presente en los tres segmentos.

El sistema de reabsorción de Na⁺ en la nefrona distal está acoplada al sistema de excreción de K⁺. La entrada de Na⁺ a través de ENaC genera un voltaje negativo luminal que favorece la excreción de K⁺ a través de una variedad de vías de transporte de potasio localizadas en la membrana apical, que incluyen al canal ROMK (Renal Outer Medullary K⁺ Channel), el canal de K⁺ activado por Ca²⁺ y dependiente de flujo (BK Channel), entre otros. Además de

la presencia de proteínas transportadoras, la expresión de receptores y otras proteínas reguladoras a lo largo de la nefrona distal, son importantes para las funciones diferenciales entre los diferentes segmentos^[7] (**Figura 4**).

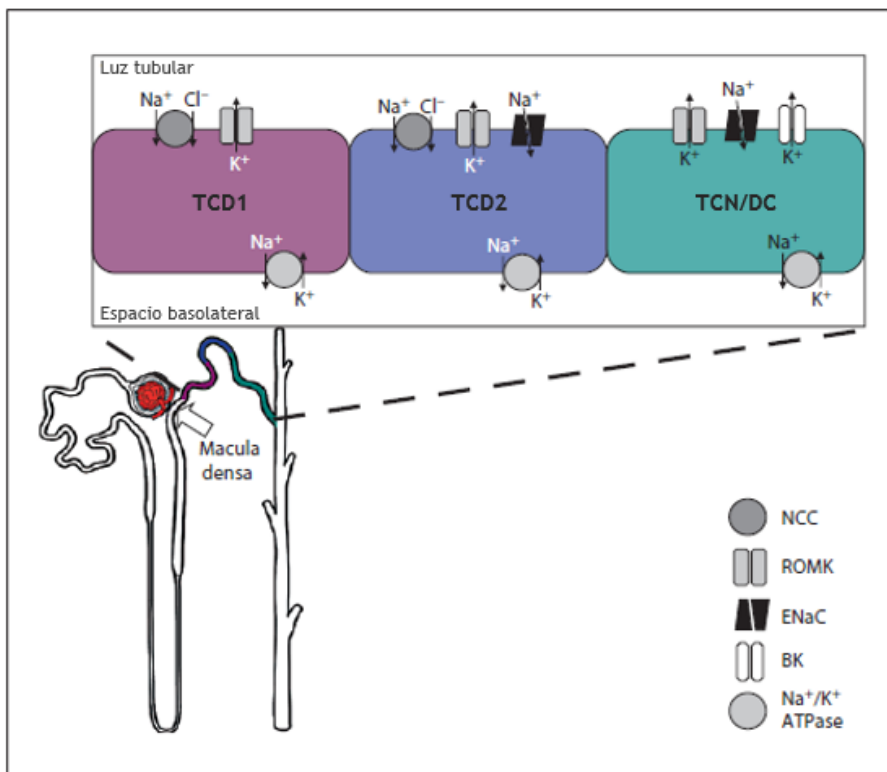


Figura 4. Distribución del co-transportador NCC, los canales ENaC, ROMK y BK, así como de la Na⁺/K⁺ ATPasa a lo largo de la nefrona distal.

Existe una clara relación entre la reabsorción de Na⁺ y la excreción de K⁺ en la nefrona distal. La excreción de K⁺ es favorecida por un incremento distal de la llegada de Na⁺. Adicionalmente, la presencia de los canales BK en TCN favorecen la elevada excreción de K⁺ cuando el flujo tubular (luminal) incrementa. El aumento en la concentración de Na⁺ en la nefrona distal favorece la reabsorción de Na⁺ vía ENaC con la subsecuente excreción de K⁺ vía ROMK y/o los canales BK. Clínicamente, la asociación entre el flujo distal y/o la concentración de Na⁺ y la excreción de K⁺ está fundamentada en el fenotipo presente en pacientes con mutaciones en las vías de transporte de Na⁺^[11]. Por ejemplo, en condiciones

en las que NCC está anormalmente activo - como en el síndrome de Gordon o PHAI - , la disminución de la concentración de Na^+ que llega a TCD2 disminuye la actividad de ENaC y a su vez impide la excreción de K^+ por parte de ROMK, con la consecuente hipertensión con hipercalemia clásica del fenotipo PHAI.

De esta forma, la nefrona distal posee dos funciones opuestas: 1) la reabsorción de Na^+ con la mínima excreción de K^+ y 2) la excreción de K^+ en donde la reabsorción de Na^+ no aumenta^[11]. Ambas funciones se llevan a cabo mediante la activación de los componentes del eje Renina-Angiotensina-Aldosterona. En condiciones de hipovolemia se secretan tanto AngII como aldosterona, mientras que en condiciones de hipercalemia, sólo se secreta aldosterona. Para realizar estas dos funciones opuestas en la nefrona distal, los transportadores y canales están sujetos a regulación diferencial y específica.

Para comprender cómo es que las diferentes porciones de la nefrona llevan a cabo sus funciones, es necesario analizar los conceptos básicos de la distribución de agua en el organismo y los mecanismos de control de la presión arterial.

Equilibrio Hídrico

El ser humano está compuesto de aproximadamente del 50-60% de agua^[5], por lo que la regulación del volumen total y su distribución en el organismo constituyen unas de las funciones vitales. El agua corporal total se distribuye en dos grandes compartimentos: el intracelular, que posee cerca del 60-70% del volumen total de agua; y el extracelular, que representa el 30-40% restante^[6]. El espacio extracelular a su vez, se divide en el espacio comprendido entre células (intersticial) y el espacio dentro de los vasos sanguíneos (intravasculares) **(Figura 5)**.

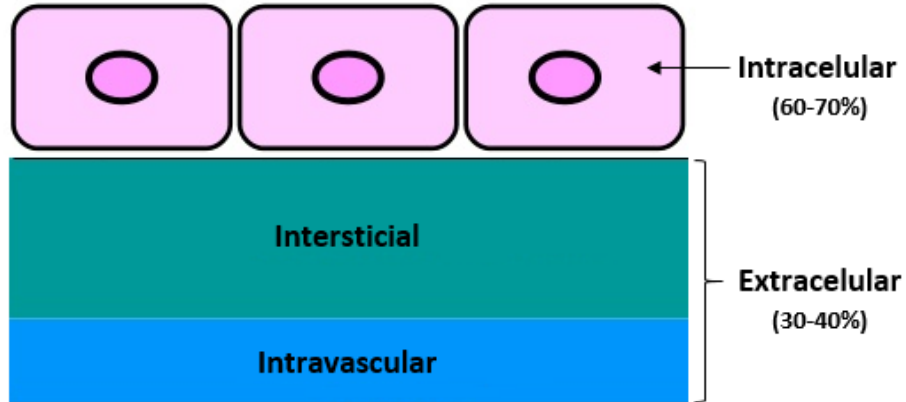


Figura 5. Compartimentalización y distribución del agua corporal. La mayor parte del agua se encuentra en el espacio intracelular, el resto se encuentra distribuido entre el espacio intersticial y el intravascular (espacio extracelular).

El movimiento del agua entre los diferentes compartimentos es mediado por un proceso denominado ósmosis, el cual se define como el paso de agua a través de una membrana semipermeable a favor de gradiente de concentración. La membrana plasmática de las células, constituye ésta barrera semipermeable y el paso de agua a través de ella se da mediante proteínas integrales de membrana conocidas como acuaporinas^[12], que no permiten el paso de iones ni otro tipo de moléculas^[6]. Esta impermeabilidad iónica permite que las concentraciones iónicas sean diferentes a cada lado de la membrana, lo cual es fundamental en la determinación de diversas funciones celulares, por ejemplo: la generación del potencial de acción.

En condiciones normales, la cantidad de agua que difunde en ambas direcciones de la membrana está equilibrada de manera tan precisa que se produce un cambio neto cero, por lo tanto el volumen celular permanece constante. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas donde hay ganancia o pérdida de iones o agua (cambio en la osmolaridad), se produce un cambio en las concentraciones del líquido extracelular y posteriormente se modifica el líquido intracelular como respuesta compensatoria. Como resultado, la célula sufre procesos de turgencia o crenación, los cuales tienen efectos graves sobre la función de la misma.

La distribución del agua entre el líquido intracelular y extracelular depende de las concentraciones de iones y moléculas permeables a la membrana plasmática, las cuales son extremadamente diferentes^[6] (**Tabla 1**). Una de las mayores diferencias radica en la concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻. La sal es el factor más importante en la determinación del volumen extracelular. Generalmente el consumo de sal va acompañado por el consumo de agua, lo que genera expansión del volumen intersticial e intravascular, siendo el incremento del líquido intravascular lo que repercute en la presión arterial.

Ion	Concentración EC	Concentración IC
Na ⁺	142 mEq/L	10 mEq/L
K ⁺	4 mEq/L	140 mEq/L
Cl ⁻	103 mEq/L	4 mEq/L
Mg ²⁺	1.2 mEq/L	58 mEq/L
Ca ²⁺	2.4 mEq/L	0.00001 mEq/L
HCO ³⁻	28 mEq/L	10 mEq/L

Tabla 1. Concentraciones iónicas. Extracelulares (EC) e intracelulares (IC).

Presión Arterial

La presión arterial se define como la presión que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias y se requiere para la correcta perfusión de los órganos^[6]. La presión o tensión arterial (TA) es el producto del gasto cardiaco (GC), es decir, la cantidad de sangre expulsada por el corazón en litros por minuto y la resistencia periférica total (RPT), que es la resistencia al flujo de la sangre que ofrece el sistema arterial, principalmente los vasos pequeños conocidos como arteriolas.

$$TA = GC \times RPT$$

La ecuación anterior nos indica que para que ocurran cambios en la TA, debe cambiar el GC, la RPT, o ambas. Teniendo en cuenta que el mantenimiento de la presión arterial es

fundamental para la vida, el organismo ha desarrollado diversas vías para poder conservarla estable, modificando ya sea el GC o la RPT.

Uno de los mecanismos neuro-hormonales para el mantenimiento de la TA lo representan las catecolaminas como la norepinefrina y la epinefrina, hormonas que ejercen su efecto sobre receptores adrenérgicos acoplados a proteínas G, ya sea mediante un aumento en la resistencia periférica y/o aumentando el gasto cardiaco^{[5][6]}. Otro mecanismo de regulación de la TA se debe a la hormona antidiurética conocida como arginina vasopresina (ADH/AVP) que se secreta en el lóbulo posterior de la glándula pituitaria (neurohipófisis) en respuesta a una reducción en el volumen del plasma y tiene como efectos el aumento de la RPT y la disminución de la pérdida de sal y agua en la orina^{[6][13]}. El Eje Renina-Angiotensina-Aldosterona (Eje RAA) también es un mecanismo de preservación de la TA y constituye la principal respuesta del organismo para promover el aumento del volumen circulante a través de la retención de sal^{[14][15][16]}.

Como se mencionó anteriormente, se desconocen el o los mecanismos a través de los cuales se genera hipertensión arterial en los seres humanos; sin embargo, el papel que juega la RPT contra la retención renal de sal favorece la teoría de que la retención renal de sal es un factor causal en el desarrollo de la hipertensión arterial crónica^{[16][17][18]}. Es por lo anterior, que el estudio de los mecanismos hormonales (Eje RAA) y moleculares (proteínas transportadoras de sal) a través de los cuales el riñón es capaz de retener o excretar sal, así como su regulación, han sido objeto de investigación durante los últimos años.

Eje Renina-Angiotensina-Aldosterona

Este eje hormonal está formado por una cascada enzimática que da como resultado la producción de Angiotensina II y Aldosterona. En condiciones de hipotensión renal, es decir, cuando existe una disminución en la presión de perfusión renal – o por aumento del tono simpático^{[19][20][21]} –, se activa la producción de la enzima renina por parte del aparato yuxtglomerular del riñón, siendo este el mecanismo que constituye el paso limitante para la activación del eje. La renina es una peptidasa que escinde los últimos cuatro aminoácidos

del angiotensinógeno (molécula producida en el hígado^[21]) convirtiéndolo en el decapeptido AngI. Una vez en el torrente sanguíneo, la AngI llega a los pulmones donde por efecto de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA), se escinden los dos últimos aminoácidos y se convierte en el octapéptido AngII^{[22][23][24]}. La AngII es un potente vasoconstrictor que aumenta la RPT al favorecer la vasoconstricción arteriolar y por otro lado, aumenta el GC al favorecer la retención de sal y agua, incrementando el volumen extracelular y por consiguiente el volumen circulante^{[14][15][16][19]}. Los efectos de la AngII se deben a la unión con su receptor acoplado a proteínas Gq (AT1) o Gi (AT2)^[21]. Los receptores AT1 son los principales mediadores de los efectos clásicos de la AngII: vasoconstricción generalizada y retención renal de Na⁺. Los receptores AT2 se relacionan con efectos contrarios a los producidos por los receptores AT1^[21]. La estimulación por parte de la angiotensina II sobre los receptores AT1 en la corteza suprarrenal, aumenta la secreción de otra hormona, la aldosterona, la cual también estimula la reabsorción renal de sal^{[20][25][26][27]} (Figura 6).

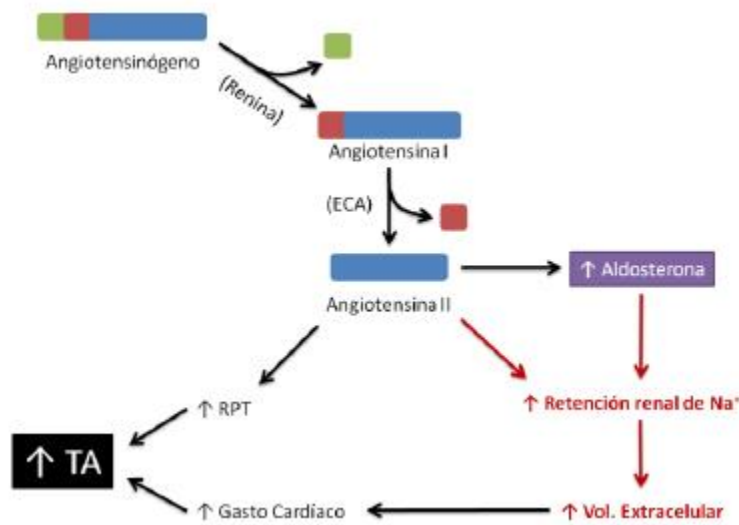


Figura 6. Eje RAA. La renina promueve la síntesis de AngI, que a su vez se convierte en AngII por efecto de la ECA. La AngII tiene la capacidad de aumentar la RPT y la retención renal de Na⁺. Adicionalmente, la aldosterona favorece la retención renal de Na⁺ y la excreción de K⁺. La combinación de estos efectos conlleva al aumento de la TA.

La aldosterona es una hormona esteroidea de la familia de los mineralocorticoides producida por efecto de la AngII en la sección glomerulosa de la glándula suprarrenal, donde la corticoesterona es hidroxilada por la enzima aldosterona sintetasa (CYP450 C11AS) y la convierte en aldosterona^[22]. Al ser una hormona esteroidea y no poderse almacenar en vesículas, su secreción está regida por sus síntesis^[20]. En consecuencia, una vez que se activa la síntesis de aldosterona, ésta es liberada a la circulación y difunde a través de la membrana plasmática de sus tejidos blanco donde se une con su receptor intracelular llamado receptor de mineralocorticoides (MR). El efecto clásico de la aldosterona es aumentar la reabsorción de sal en epitelios como el riñón, intestino, glándulas salivales y glándulas sudoríparas^[28]. Una vez que la aldosterona entra a las células epiteliales, sus efectos se pueden dividir en tres fases. Durante la primera fase, que no está asociada a la unión con su receptor (0 – 20 min), incrementa la concentración de IP₃, DAG, Ca²⁺ intracelular y la actividad de la Proteína Cinasa C (PKC)^{[29][30]}. Durante la segunda fase (1 – 6 h), aumenta el transporte de Na⁺ mediado por proteínas inducidas por aldosterona que ejercen su efecto sobre canales pre-existentes; y en la tercera fase (> 3 h), aumenta el transporte de Na⁺ mediado por un aumento en la cantidad de proteínas transportadoras presentes en la célula. La segunda y la tercera fase se dan en respuesta a la unión de la aldosterona con su receptor^{[20][28][31]}.

Los efectos de la aldosterona sobre la nefrona distal se limitan a un segmento específico del TCD, conocido como nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN), que comprende TCD2, TCN y DC. Es en estas regiones donde la acción de la aldosterona puede tener efecto a través de la co-expresión del receptor de aldosterona: el receptor de mineralocorticoides (MR) y la enzima 11-β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 (11- βHSD2) (**Figura 7**), la cual es necesaria para degradar al cortisol y prevenir la ocupación promiscua del MR por el mismo^{[32][33][34][35]} (**Figura 8**). El cortisol es una hormona esteroidea también producida por la glándula suprarrenal, con una alta afinidad por el MR, debido a que circula en concentraciones 100 -1000 veces mayor en plasma que la aldosterona. La ausencia de la 11-βHSD2 en TCD1 se debe a la temprana insensibilidad del TCD a la aldosterona.

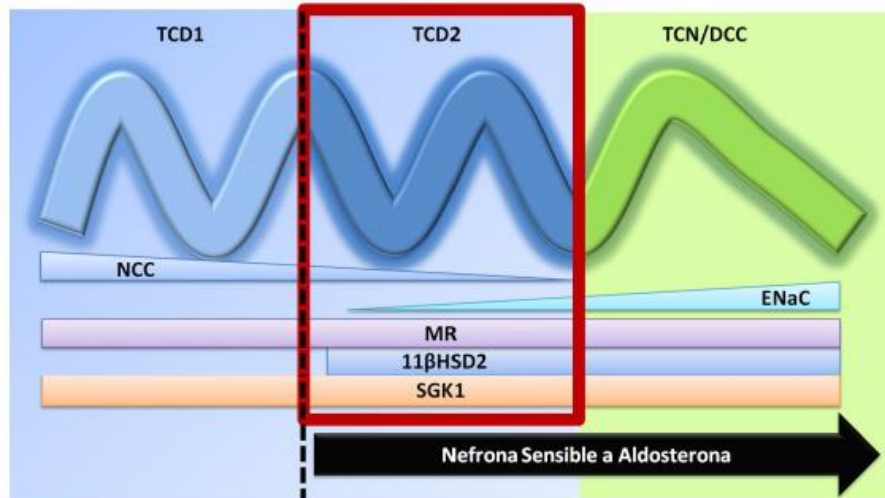


Figura 7. Componentes del sistema de respuesta a aldosterona. La expresión de la 11-βHSD2, el MR y SGK1 coincide en TCD2, de tal forma que esta porción de la nefrona constituye una región importante para la reabsorción de Na⁺.

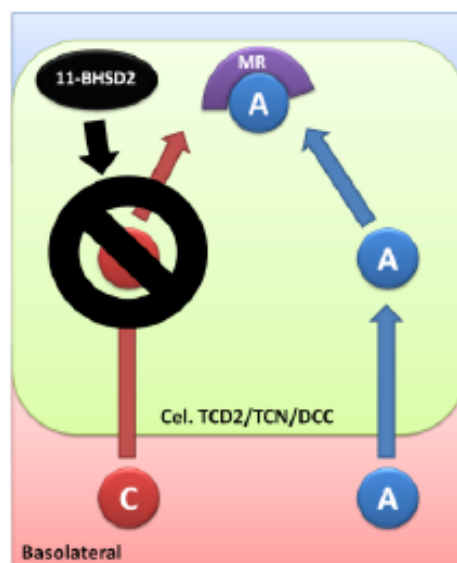


Figura 8. Acción de la 11-βHSD2. La presencia de esta enzima favorece la degradación del cortisol (C) y permite que la aldosterona (A) ocupe su lugar en el receptor de mineralocorticoides (MR).

Otras dos proteínas reguladoras involucradas con los efectos de la aldosterona se expresan en ASDN, la ligasa de ubiquitina tipo HECT E3 Nedd4-2 (Neuronally Expressed Developmentally Downregulated 4-2)^[36] y la cinasa SGK1 (Serum Glucocorticoid Regulated

Kinase 1)^[25]. La inducción de SGK1 produce un aumento en el transporte de Na⁺ al incrementar la translocación apical y aumentar la estabilidad de NCC y ENaC^{[25][31][37][38][39]}. Se ha demostrado que Nedd4-2 regula una variedad de canales iónicos incluido ENaC^[40], mediante la interacción de motivos PY - PPXY, donde P es prolina, X cualquier aminoácido y Y es tirosina -, localizados en el dominio C-terminal de ENaC. Nedd4-2 induce la ubiquitinación de ENaC promoviendo su internalización y degradación. La regulación de ENaC mediada por aldosterona se logra a través de la inducción de la expresión de SGK1 que fosforila a Nedd4-2 en la Ser328 inhibiendo la interacción de Nedd4-2 con ENaC, disminuyendo así la ubiquitinación y degradación de esta última. La aldosterona también induce aumento en la expresión de NCC a nivel proteico – sin aumento de su RNAm -, únicamente en TCD2 donde puede llevar a cabo su efecto^[41]. El efecto post-traducciona de la aldosterona sobre NCC se lleva a cabo vía Nedd4-2^{[42][43][44]}, de manera similar a la regulación por aldosterona de ENaC^[45]. Experimentos previos han demostrado que en condiciones normales, Nedd4-2 es un regulador negativo de NCC interactuando de manera independiente del motivo PY (contrario al caso de ENaC) promoviendo la ubiquitinación de NCC en la membrana plasmática, efecto que, es inhibido por la fosforilación de NCC como consecuencia de la actividad de SGK1, de forma dependiente de cinasa^[45] (**Figura 9**).

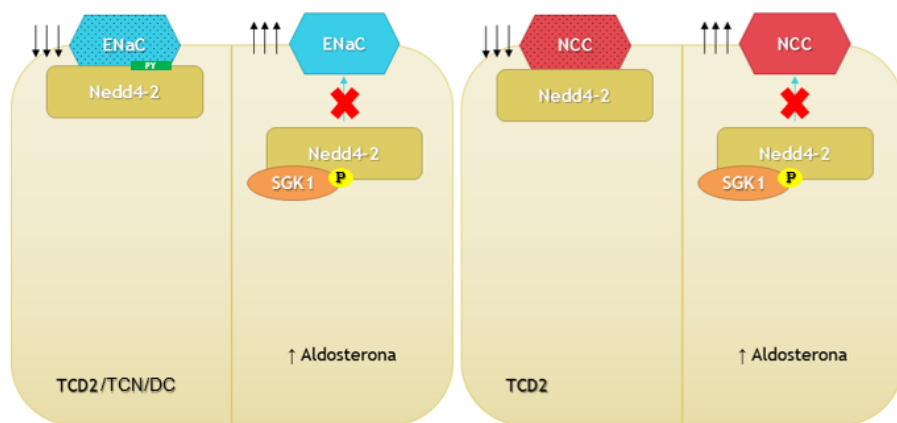


Figura 9. Efecto de SGK1 sobre ENaC y NCC. En condiciones normales, la ligasa de ubiquitina Nedd4-2, ubiquitina y degrada a ENaC (dependiente de motivo PY) y NCC; mientras que en presencia de aldosterona, la síntesis de la cinasa SGK1 promueve la fosforilación de Nedd4-2 en la Ser328 e impide la degradación de ENaC y NCC, aumentando la permeabilidad al Na⁺ en TCD2.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se puede definir que los efectos de la aldosterona como principal mediador de la reabsorción de volumen – secundario a la activación del eje RAA^{[6][16][20][46]} -, se deben a la regulación de NCC y ENaC en TCD2. A continuación se describirán brevemente las características de los co-transportadores electroneutros acoplados a Cl⁻, profundizando en el co-transportador de Na⁺:Cl⁻ (NCC), el cual es el sujeto de estudio del presente trabajo.

Co-transportadores Electroneutros Acoplados a Cl⁻

La familia SLC12 se compone de 9 genes que codifican para un grupo de co-transportadores electroneutros acoplados a Cl⁻, de los cuales 7 se han caracterizado ampliamente desde el punto de vista funcional. Esta familia se divide en dos ramas:

1. Co-transportadores electroneutros acoplados a Na⁺
 - SCL12A1: es un gen que codifica para NKCC2, un transportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ (estequiometría 1:1:2); se expresa exclusivamente en el asa ascendente de Henle y determina los mecanismos de reabsorción de NaCl y cationes divalentes, así como la concentración urinaria de los mismos.^[47]
 - SCL12A2: es un gen que codifica para NKCC1, un transportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ (estequiometría 1:1:2); de expresión ubicua para el que se han descrito funciones importantes en la regulación de Cl⁻, la percepción del dolor y el volumen intracelular en el sistema nervioso^{[48][49][50]}.
 - SLC12A3: es un gen que codifica para NCC, un transportador de Na⁺:Cl⁻ (estequiometría 1:1) que se expresa en el túbulo contorneado distal y su función es clave en la regulación del volumen extracelular y la presión arterial^{[47][51][52]}.
2. Co-transportadores electroneutros acoplados a K⁺
 - SCL12A4 - SCL12A7: son genes que codifican para KCC1 – KCC4, son co-transportadores de K⁺:Cl⁻ (estequiometría 1:1); se expresan en diversos tejidos

incluyendo eritrocitos (KCC1), sistema nervioso central (KCC2) y riñón (KCC3 y KCC4)^{[48][53][54][55][56][57]}.

Los transportadores de la familia SCL12 son transportadores de membrana estructuralmente similares que poseen 12 segmentos transmembranales^[58], un extremo amino terminal corto y un extremo carboxilo terminal largo, ambos intracelulares^[47]. Los co-transportadores acoplados a Na⁺ poseen un asa hidrofílica larga de localización extracelular con dos sitios de N-glicosilación entre los segmentos transmembranales 7 y 8.

Los co-transportadores de la familia SLC12 se regulan por hormonas como catecolaminas^[59], vasopresina (AVP/ADH)^{[12][13]}, hormona paratiroidea^{[59][60]}, hormona de crecimiento^[61], angiotensina II^{[62][63]} y aldosterona^{[64][65]}.

Co-transportador de Na⁺:Cl⁻ Sensible a Tiazidas (NCC)

El co-transportador de Na⁺:Cl⁻ sensible a diuréticos tipo tiazida (hidroclorotiazida, metolazona, clortalidona, etc.), se encuentra en la membrana apical de las células del TCD y depende del gradiente de Na⁺ generado por la Na⁺/K⁺ ATPasa basolateral^{[7][66]} (**Figura 10**).

El transporte de Na⁺ acoplado a Cl⁻ fue descrito inicialmente en la vejiga urinaria de *Pseudopleuronectes americanus* (lenguado), mostrando que existe un transporte activo y electroneutro de Na⁺ y Cl⁻ con dirección de membrana apical a membrana basolateral de las células de la vejiga urinaria^[67]. Posteriormente, se reportó la interdependencia del transporte de Na⁺ y Cl⁻, ya que la perfusión de soluciones libres de Na⁺ o Cl⁻ inhibían el transporte^[68], siendo independiente de la presencia de K⁺ e inhibido de manera rápida y reversible por medicamentos tipo tiazida sin efectos basolaterales^[69]. Se identificó el sitio de acción de las tiazidas en las primeras porciones de la nefrona distal (que se encuentra exclusivamente en la corteza renal) y se propuso un modelo en donde el receptor/transportador tiene un sitio de unión para Na⁺ y un sitio competitivo de unión para Cl⁻ o tiazidas, explicando así su función diurética^[70].

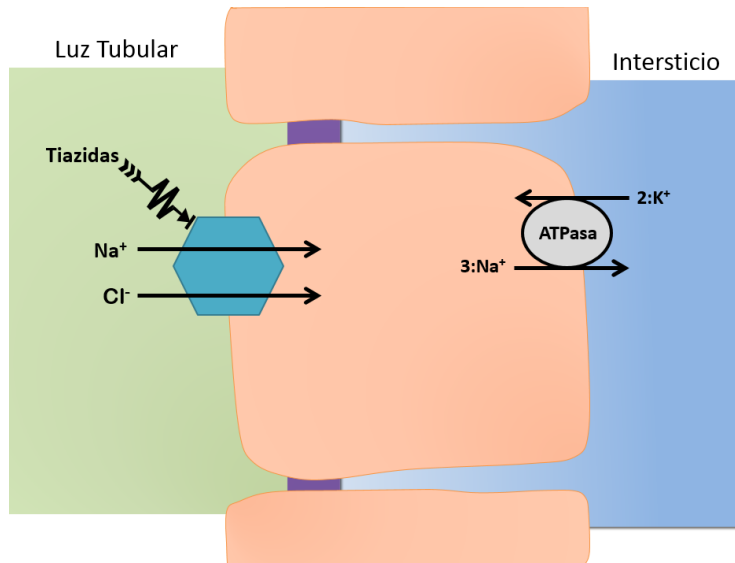


Figura 10. Co-transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$. NCC se expresa en la membrana apical de las células de TCD, es inhibido por diuréticos tipo tiazida y es dependiente de la función de la Na^+/K^+ ATPasa.

Debido a que la vejiga urinaria de *P. americanus* se puede considerar desde el punto de vista embriológico, como una especie de TCD primitivo^[71], se empleó la técnica de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión heterólogo para identificar una clona de DNAC de 3686 pares de bases con un marco de lectura abierto de 3069 bases que codifica para una proteína de 1023 aminoácidos y una masa molecular calculada de 110 kDa, que aumentaba la captación de $^{22}\text{Na}^+$ dependiente de Cl^- y se inhibía de manera selectiva por tiazidas. Así fue como se demostró que el DNAC aislado codificaba para el co-transportador Na^+ y Cl^- sensible a tiazidas (NCC)^[51]. Más tarde, por análisis de hidropatía, se sugirió la presencia de un extremo amino terminal intracelular corto e hidrofílico, seguido de 12 α -hélices que correspondían a potenciales segmentos transmembrana con un asa hidrofílica con tres posibles sitios de N-glicosilación (N403, N414 y N432), localizada extracelularmente, y finalmente, un extremo carboxilo terminal intracelular largo de aproximadamente 450 aminoácidos^[58] (**Figura 11**).

Posterior a la identificación de la secuencia del NCC de lenguado, se reportó la identificación del gen de NCC de rata, con 61% de homología^[47]. El NCC de ratón se aisló vía PCR mostrando

una homología del 97% con el NCC de rata^[72]; y mediante Northern Blot se observó que en rata y ratón el RNAm de NCC solo se expresa en el riñón^[73]. El NCC de humano fue identificado como dos transcritos codificados en el cromosoma 16q13, uno con un marco de lectura abierto de 3063 pares de bases que codifica una proteína de 1021 aminoácidos con peso molecular de 112 kDa, y otro con marco de lectura abierto de 3090 pares de bases que codifica para una proteína de 1030 aminoácidos. Existe una diferencia de longitud del NCC humano contra el NCC de rata o ratón debido a la expresión del exón 20 (presente en humanos, pero no en rata o ratón) que agrega 17 aminoácidos (variante de 1021 aminoácidos) o 26 aminoácidos (variante de 1030 aminoácidos). Se observó también que en humanos el transcrito de NCC se expresa únicamente en riñón^{[49][73]}.

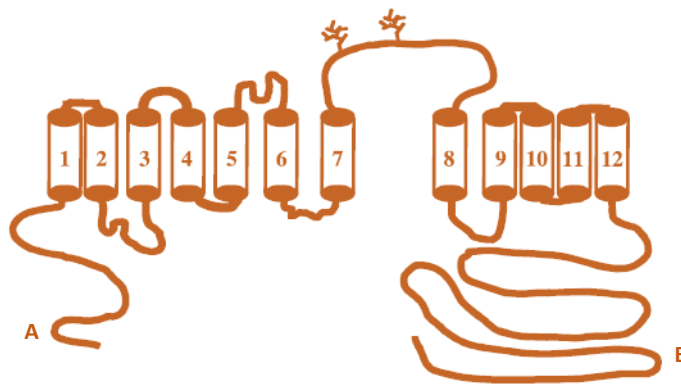


Figura 11. Estructura de NCC. NCC se compone de un extremo N-terminal intracelular (A), 12 segmentos transmembrana (1-12) con sitios de glucosilación entre los segmentos 7 y 8, y un extremo C-terminal intracelular (B).

Como ya se mencionó anteriormente, NCC se expresa en TCD, siendo mayor su expresión en la primera porción del túbulo contorneado distal (TCD1) y menos en la segunda porción del túbulo contorneado distal (TCD2) ^{[11][47] [49][74][75][76][77]} (**Figura 12**). Debido a la localización específica de NCC en la nefrona distal, su regulación es un factor determinante en la regulación de la TA, lo que resulta evidente en pacientes con síndromes clínicos asociados a la disfunción de NCC^{[47][66]}.

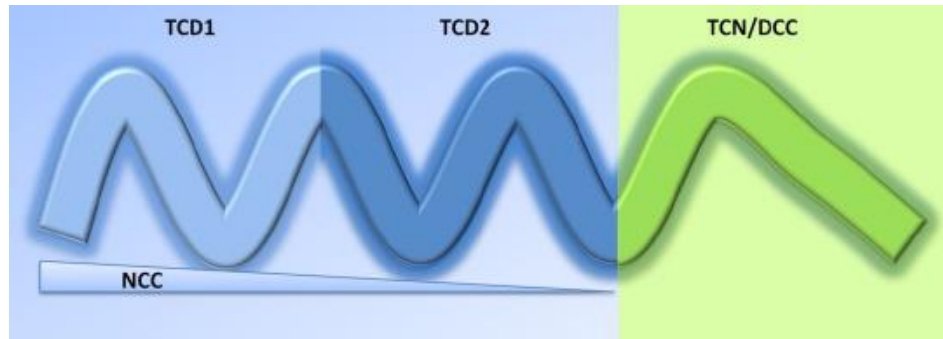


Figura 12. Expresión de NCC en la nefrona distal. El co-transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (NCC) se expresa ampliamente en TCD1 y disminuye a lo largo de TCD2.

Enfermedades Relacionadas con NCC

Dos de las enfermedades más importantes relacionadas con el transporte de NaCl mediado por NCC son: el síndrome de Gitelman y el síndrome de Gordon, los cuales son imágenes en espejo uno del otro (**Figura 13**).

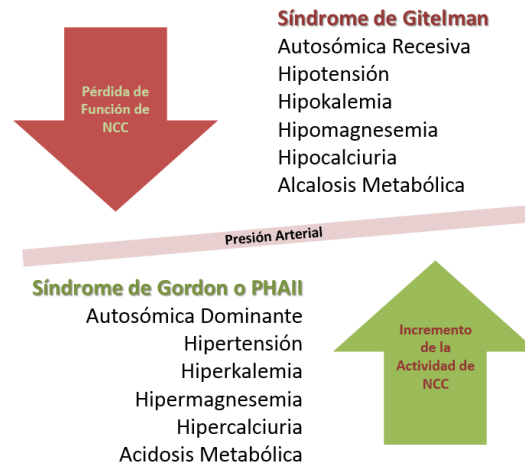


Figura 13. El síndrome de Gitelman y el síndrome de Gordon (PHAII) poseen fenotipos opuestos.

El síndrome de Gitelman, es una enfermedad autosómica recesiva que presenta un fenotipo de hipotensión, hipocalcemia y alcalosis metabólica^[78]. Se ha determinado que las mutaciones en pacientes con este síndrome están localizadas en el gen que codifica para NCC^{[52][79]}. Existe un gran número de mutaciones en NCC causantes del síndrome de Gitelman, las cuales exhiben un procesamiento anormal en el tráfico y expresión del transportador que disminuye su concentración en la membrana plasmática e inhibe su función. Para confirmar que las alteraciones en la expresión de NCC son la causa del síndrome, se hicieron experimentos con ratones knock-out (KO) y knock-in (KI) de NCC y se encontró que evocaban el fenotipo del síndrome de Gitelman^{[80][81]}. La disminución en la presión arterial en pacientes con Gitelman demuestra que la función de NCC constituye un factor clave en la regulación de la TA, aunado al hecho de que los diuréticos tipo tiazida son el medicamento de primera línea en el tratamiento de la hipertensión arterial^[82], lo cual subraya el papel de NCC en la regulación de la reabsorción de Na⁺, el volumen circulante y la presión arterial.

El síndrome de Gordon o pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) es una enfermedad autosómica dominante que ha sido clave en el entendimiento de la regulación de NCC. El PHAII se caracteriza por hipertensión, hipercalemia y acidosis metabólica^{[83][84]}. Durante los primeros estudios de pacientes con PHAII, se observó que al restringirles la ingesta de sal, se corregían los niveles de K⁺, H⁺ y TA^[85], lo que hacía pensar en una hiperactivación del eje RAA, a pesar de que las concentraciones plasmáticas de renina y aldosterona se encontraban disminuidas. Al principio de la identificación del síndrome de Gordon, se describió que el fenotipo de PHAII era completamente corregido con dosis bajas de tiazidas^[86], lo que llevó a pensar que este síndrome se debía a mutaciones activantes en NCC, sin embargo, la secuencia de NCC en pacientes con PHAII era normal^[87].


Estudios posteriores describieron mutaciones en dos isoformas de unas cinasas conocidas como WNK1 y WNK4, como las causantes de PHAII^[88], y más adelante se demostró que éstas cinasas participan en una cascada de señalización - mediante el reclutamiento de otras dos proteínas: SPAK (Ste20-related Proline-Alanine-rich Kinase) y OSR1 (Oxidative Stress-

Responsive Gene 1)^{[89][90]} -, que termina en la fosforilación y activación de NCC^[91]. Siendo la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC la base molecular del síndrome de Gordon^[92].

Recientemente se identificaron dos genes adicionales responsables del desarrollo de PHAI que codifican para las proteínas KLHL3 y CUL3, encontrados en pacientes con expresión normal de las cinasas WNK1 y WNK4^{[93][94]}. A la fecha se ha descrito que las proteínas KLHL3 y CUL3 forman un complejo ligasa de ubiquitina E3 que tiene como sustratos a las cinasas WNK1 y WNK4, marcándolas para su degradación por la vía del proteasoma^{[95][96][97][98][99][100]}.

Las diferentes mutaciones en los cuatro genes descritos hasta el momento causantes de PHAI, presentan diferencias en cuanto a la edad en la que se presentan el fenotipo y la gravedad del mismo, siendo la mutante de CUL3 la más grave y las mutantes de WNK1 las más sutiles (**Tabla 2**).

Fenotipo					
Proteína	Edad	Mutación	Hipertensión	Hiperkalemia	Acidosis Metabólica
CUL3	< 10 años	Delección del intrón 9	*****	*****	*****
KLHL3	< 20 años	N-terminal (Cul3) C-terminal (Sustrato)	****	****	****
WNK4	20-40 años	Puntuales en el dominio ácido	***	***	***
WNK1	> 30 años	Delección del intrón 1	**	**	**
WNK1	> 40 años	Puntuales en el dominio ácido	--	*	*



A vertical arrow on the right side of the table points downwards, labeled 'Gravedad del Fenotipo', indicating that the severity of the phenotype increases from top to bottom.

Tabla 2. Gravedad del fenotipo PHAI según la mutación. Mutantes PHAI de CUL3, KLHL3, WNK4 y WNK1.

A continuación analizaremos los componentes de la vía KLHL3/CUL3-WNK-SPAK/OSR1-NCC para un mejor entendimiento de los mecanismos de regulación a los que se encuentra sometido NCC y se profundizará principalmente en el papel de las mutantes PHAI.

Cinasas WNK

Las cinasas WNK (With No K – lysine -) son una familia de cinasas de Ser/Thr que deben su nombre a la ausencia de la lisina catalítica clásica de este tipo de cinasas y a la presencia de una cisteína en su lugar^{[88][101]}. Existen cuatro miembros identificados: WNK1 (con sus variantes L-WNK1 y KS-WNK1), WNK2, WNK3 y WNK4^{[102][103]}. Todas comparten una estructura común, la cual se compone de un extremo amino terminal (146-200 aminoácidos), un dominio cinasa altamente conservado (274 aminoácidos) – excepto KS-WNK1 -, un dominio autoinhibitorio, dominios coiled-coil y un dominio ácido (11 aminoácidos) localizados en el extremo carboxilo terminal (786-1888 aminoácidos) (**Figura 14**).

La cinasa WNK1 se ha descrito como activadora de NCC y el gen que codifica para ella produce dos transcritos a partir de empalme alternativo: L-WNK1 (Long), es una variante larga con extremo amino terminal y dominio cinasa completos, de expresión ubicua^[104] y KS-WNK1 (Kidney Specific) una variante corta y específica de riñón, particularmente expresada en la nefrona distal, que carece del dominio amino terminal clásico y del dominio cinasa^{[88][103][105][106]} –localizado en los exones 3 y 4-, debido a la transcripción alternativa del exón 4A^[102]. La expresión de WNK2 predomina en el sistema nervioso central y posee un papel importante en la regulación de los co-transportadores NKCC1 y NKCC2 en neuronas^[107]. WNK3 y WNK4 han sido identificadas en riñón. WNK3 funciona como activadora de NCC^[108], mientras que WNK4 posee un efecto dual sobre NCC actuando como inhibidor o como activador dependiendo del contexto fisiológico específico en el que se encuentre. Actualmente se desconoce la totalidad de la extensión, expresión y función de estas cinasas en otros tejidos^{[101][105]}.

La actividad específica de cada una de las cinasas WNK sobre la regulación de la actividad de NCC se han estudiado más a fondo en diversos trabajos que van más allá de los intereses de esta tesis, por lo que nos enfocaremos principalmente en el papel de las mutantes PHAI de WNK1 y WNK4.

Las mutaciones causantes de PHAI identificadas en WNK4, son cuatro mutaciones *missense*, de las cuales tres se localizan en su dominio ácido (E561K, D564A, Q565E) y una más en su extremo C-terminal (R1185C)^[88] (**Figura 14**).

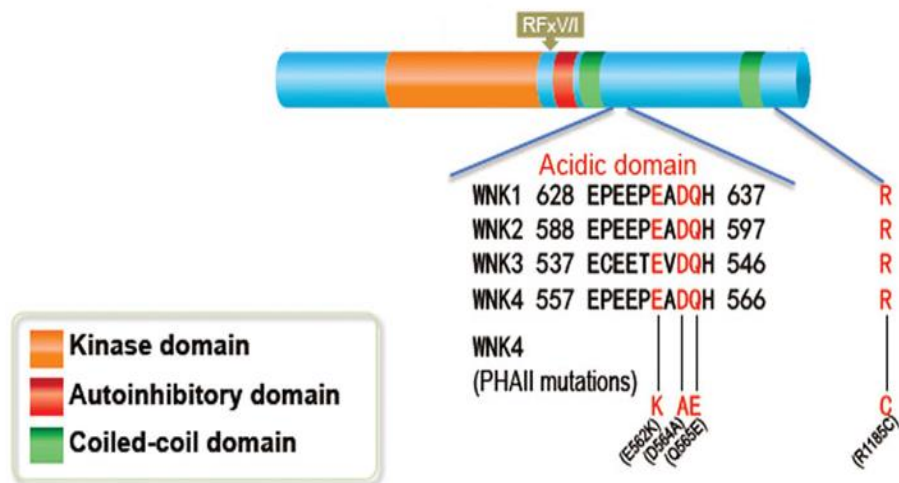


Figura 14. Estructura de las cinasas WNK. Todas las cinasas WNK comparten una estructura similar compuesta por un extremo N-terminal, un dominio cinasa (naranja) - excepto KS-WNK1 -, un dominio autoinhibitorio (rojo) y un dominio C-terminal. Además, todas poseen dos dominios coiled-coil. Se muestra el alineamiento del dominio ácido -altamente conservado en todas las cinasas WNK -, con los sitios de mutaciones PHAI encontrados en WNK4.

En el caso de WNK1, la mutación causante de PHAI es la delección del primer intrón (WNK1 $\Delta 1$) del gen que codifica para la isoforma L-WNK1 y causa un incremento cinco veces mayor de la expresión de WNK1 silvestre^[88].

Recientemente (resultados aún no publicados) se han encontrado mutaciones *missense* en el dominio ácido de WNK1, las cuales presentan el fenotipo de hipercalcemia con acidosis metabólica, pero sin hipertensión (**Tabla 2**). La particularidad del fenotipo ocasionado por estas mutaciones puntuales en WNK1 resulta sumamente interesante, ya que podría indicar la existencia de un mecanismo desconocido de regulación para NCC en TCD2 - donde la expresión de NCC es mucho menor que en TCD1 -, de tal forma que los cambios en la

activación del co-transportador en esta porción de la nefrona no serían tan importantes como para generar alteraciones en la presión arterial, lo cual explicaría el fenotipo de hipercalemia sin hipertensión. Por esta razón, decidimos explorar la posibilidad de que la cinasa WNK1 estuviera regulada por SGK1 en la nefrona distal sensible a aldosterona.

El dominio ácido de las cinasas WNK es el sitio de unión con la ligasa de ubiquitina KLHL3 y corresponde a una secuencia de 11 aminoácidos altamente conservada en todas las isoformas^[88]. Para WNK1 y WNK4 la secuencia de aminoácidos es idéntica (EPEEPEADQHQ), mientras que para WNK3 existe variación en 4 aminoácidos (ECEETEVDQHV) (**Figura 15**). Entre las diferencias del dominio ácido de WNK3, destaca la presencia de un residuo potencialmente fosforilable que corresponde a la Thr541, único para ésta isoforma y conservado entre ortólogos (**Figura 16**).

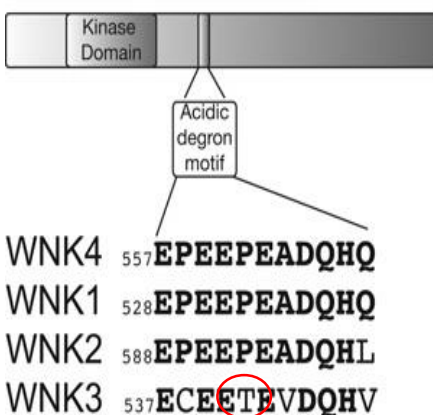


Figura 15. Alineamiento del dominio ácido de las cinasas WNK. Se observa que WNK3 es la única isoforma que posee un residuo potencialmente fosforilable, la Thr541.

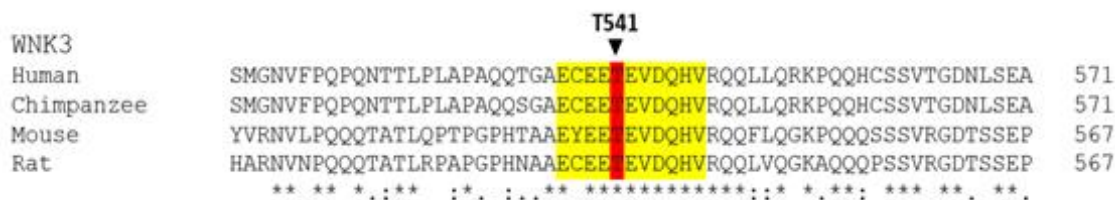


Figura 16. Alineamiento del dominio ácido de WNK3 entre especies.

Además de las cinasas WNK1 y WNK4, la cinasa WNK3 es también sustrato del complejo ligasa de ubiquitina KLHL3-CUL3. De tal forma que la presencia exclusiva y conservada de la Thr541 en el dominio ácido de WNK3 nos llevó a estudiar la posibilidad de la existencia de un mecanismo de regulación único para ésta isoforma, que conlleve a la modulación sutil de NCC.

Cascada de Señalización WNK-SPAK/OSR1-NCC

Posterior a la identificación de WNK1 y WNK4 como los genes causantes de PHAI, se realizaron numerosos estudios que llevaron a la identificación de las cinasas de Ser/Thr OSR1 y SPAK como sustratos de WNK1 y WNK4^{[89][90]}. OSR1 y SPAK poseen un dominio catalítico en su extremo amino terminal similar al encontrado en otros miembros de las cinasas Ste20, dos regiones conservadas conocidas como motivo S (motivos de serina), y un dominio carboxilo terminal conservado (CCT). SPAK a su vez, se caracteriza por tener una zona rica en prolina y alanina (48 aminoácidos) en su región amino terminal. Se ha encontrado que el dominio CCT de OSR1 y SPAK interactúa con el motivo RFX[V/I] presente en las cinasas WNK y en los transportadores miembros de la familia SLC12 (**Figura 17**).

Estudios que identificaban a OSR1 y SPAK como reguladores de NKCC1^{[109][110][111][112]} sirvieron como fundamento para pensar que otro miembro de esta familia de transportadores, el NCC, también podría ser sustrato de estas dos cinasas^[113]. Mediante alineamiento de secuencias entre NKCC1 y NCC se identificaron tres posibles sitios de fosforilación (Thr53, Thr58 y Ser71) para NCC (**Figura 17**) y en un modelo de ratón knock-in con la mutación WNK4 D561A causante del fenotipo PHAI se demostró que la fosforilación de NCC aumentaba, así como la fosforilación de las cinasas OSR1 y SPAK, lo que sugería que la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC estaba presente en riñón y se activaba por mutaciones causantes de PHAI^[110].

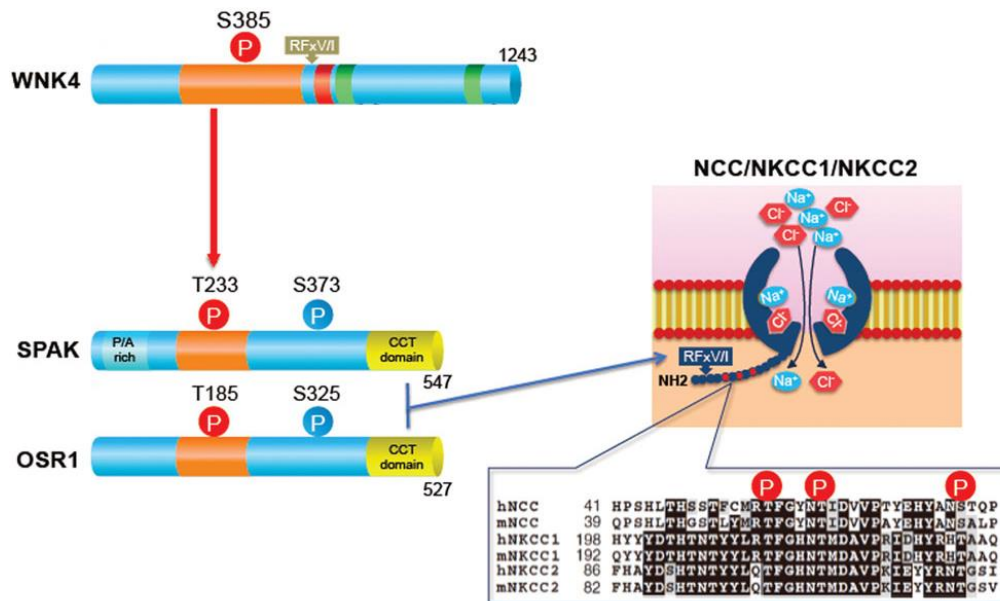


Figura 17. Las cinasas WNK activan a SPAK y OSR1. La activación sucede mediante la fosforilación de residuos de treonina en sus dominios cinasa (Thr233 y Thr185). Los residuos de serina (S373 y S325) en el motivo S, también son fosforilados por las cinasas WNK, pero sin efecto sobre la activación de OSR1 y SPAK. El extremo C-terminal (altamente conservado en SPAK y OSR1) se une al motivo RFX[V/I] en las cinasas WNK y en los miembros de la familia SLC12.

Aunque se habían identificado varios reguladores río arriba de esta cascada de señalización, se desconocía con exactitud cómo estos reguladores modulaban la actividad de las cinasas WNK. Teniendo en cuenta que las mutaciones reportadas en las cinasas WNK1 y WNK4, y en las proteínas KLHL3 y CUL3 conllevan al desarrollo de PHAII, y que la activación de la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC subyace su patogénesis, fue razonable especular que algunos de los componentes de esta cascada de señalización, en particular las cinasas WNK, podrían ser los sustratos del complejo KLHL3-CUL3 para ser marcados y llevados a degradación por la vía del proteasoma.

El Complejo KLHL3-CUL3 y el Sistema de Ubiquitina

KLHL3 es miembro de la familia de proteínas Kelch-like formada por 42 miembros descritos hasta el momento^[114]. En general, las proteínas KLHL poseen un dominio BTB (Bric a Brac 1,

Tramtrack, and Broad Complex) que facilita la interacción proteína-proteína^[115], un dominio BTB y amino terminal denominado BACK, y un extremo carboxilo terminal formado por cinco o seis dominios Kelch. Los dominios Kelch forman una hoja con estructura de β -hélice, también involucrada en la interacción proteína-proteína pero con unión preferencial por sus sustratos (**Figura 18**). Se han reportado mutaciones en genes que codifican para proteínas KLHL en múltiples patologías. Mutaciones en el gen para KLHL7 causan retinitis pigmentosa autosómica dominante^{[116][117]}, mientras que mutaciones *missense* en el gen para KLHL9 genera miopatía distal^[118]. En estudios sobre estas enfermedades, se encontró que las proteínas KLHL se unen a proteínas Cullin3 mediante sus dominios BTB y capturan sus sustratos mediante sus repeticiones Kelch, exhibiendo actividad de ligasas E3^[117] (**Figura 19**).



Figura 18. Estructura de las proteínas Kelch-like. Extremo N-terminal con dominios BTB y BACK y un extremo C-terminal con seis dominios Kelch. El dominio BTB es el sitio de unión para CUL3 y las repeticiones Kelch forman una estructura de propela que permite capturar al sustrato. Algunas de las mutaciones causantes de PHAI1 (amarillo) se localizan en los dominios Kelch.

CUL3 es miembro de la familia Cullin3 y sirve como proteína adaptadora para ligasas de ubiquitina E3. Se compone de un extremo amino terminal variable que le confiere la capacidad de interacción proteína-proteína, y un extremo carboxilo terminal que funciona como sitio de unión para proteínas RING que a su vez, funcionan acercando a las enzimas E2 del sistema de ubiquitina^[93].

KLHL3 se expresa predominantemente en la membrana apical de las células de TCD, mientras que CUL3 es de expresión ubicua y se encuentra en todos los segmentos de la

nefrona, con un particular aumento de su expresión en túbulo proximal y TCD. Estos hallazgos son congruentes con que ambas proteínas juegan un papel importante en la regulación de sal y electrolitos en la nefrona distal^[93].

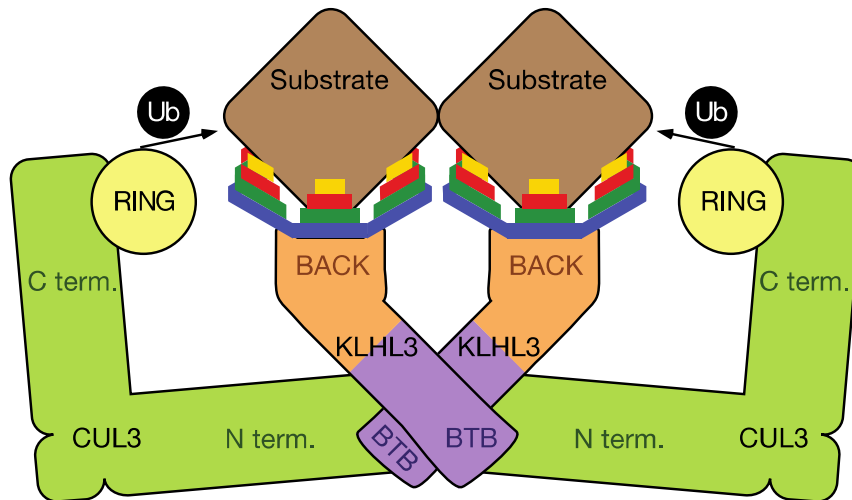


Figura 19. Esquema del complejo KLHL3-CUL3. Interacción formada por dímeros de KLHL3 y CUL3. KLHL3 (naranja y morado) y CUL3 (verde) se unen a través de su extremo N-terminal y la transferencia de ubiquitinas se realiza a través de la proteína RING (amarillo) que funciona como una E3 del sistema de ubiquitina. El sustrato (café) es anclado mediante las repeticiones Kelch de KLHL3.

La ubiquitinación es una modificación post-traduccional que involucra la unión de un residuo de ubiquitina, vía un motivo de di-glicina localizado en su extremo carboxilo terminal, a una proteína blanco^[119]. La ubiquitina es una proteína intracelular pequeña (76 aminoácidos) altamente conservada a lo largo de la evolución, de expresión ubicua, la cual se une vía enlace covalente isopeptídico a residuos de lisina (K) en las proteínas blanco^[119]. El proceso de ubiquitinación se describió inicialmente como una señal de marcaje intracelular para proteínas destinadas a degradación por el proteasoma^[120]. Actualmente se sabe que la ubiquitinación es un proceso altamente específico, que entre muchas funciones, regula el tráfico intracelular de proteínas, la internalización de proteínas de membrana y la degradación por la vía del proteasoma^{[42][43][119]}. La ubiquitina misma posee siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) lo que permite la formación de cadenas de residuos

de ubiquitina. Se ha descrito que la unión en la K48 está asociada a degradación proteasomal y en la K63 con procesos de internalización y endocitosis^{[42][43][119]}. La ubiquitinación se puede dividir en monoubiquitinación (unión de una molécula de ubiquitina en diferentes residuos de lisina de una misma proteína) y poliubiquitinación (unión de más de dos moléculas de ubiquitina en el mismo residuo de lisina).

El mecanismo a través del cual la ubiquitina se une a su proteína blanco es complejo, a continuación se explicará de manera sencilla. La unión de la ubiquitina consiste en una cascada enzimática compuesta por tres o cuatro miembros (**Figura 20**):

- E1. Enzima activadora de la ubiquitina: esta proteína une a la ubiquitina mediante hidrólisis de ATP vía un enlace tioéster a una cisteína catalítica de la E1.
- E2. Enzima transportadora de la ubiquitina: esta proteína recibe la ubiquitina activada de la E1 y la transporta a través de un residuo de cisteína. Actúa en conjunto con la E3.
- E3. Ligasa de ubiquitina: esta enzima es la encargada de llevar a cabo el reconocimiento del sustrato y de transferir la ubiquitina a la proteína blanco.
- E4. Miembro inconstante de la cascada de ubiquitinación, que al estar presente favorece la formación de cadenas de poliubiquitinación.
- DUB. Desubiquitinasa: enzima que posee la capacidad de revertir el proceso de ubiquitinación.

La transferencia de la ubiquitina de la E2 a la E3 requiere una explicación más detallada debido a que existen dos tipos de ligasas de ubiquitina E3: a) familia de RING (Really Interesting New Gene) y b) familia de HECT (Homologous to E6AP Carboxy Terminus domain). Ambos tipos reconocen a la proteína blanco, sin embargo, en el caso de las ligasas tipo RING, éstas aproximan al sustrato a la E2 para que se lleve a cabo la transferencia de la ubiquitina; mientras que las tipo HECT reciben a la ubiquitina de la E2 y la misma HECT E3 es la encargada de transferir la ubiquitina a la proteína blanco^[43].

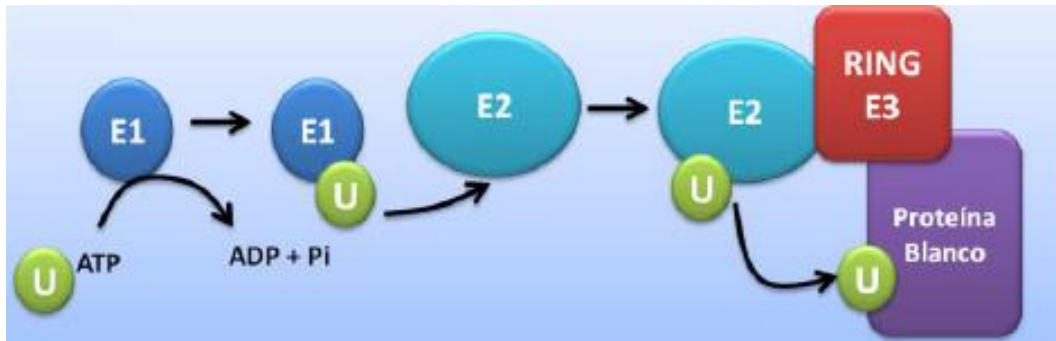


Figura 20. Ubiquitinación. Cascada enzimática compuesta por tres miembros (E1, E2 y E3). En el caso de la ligasa de ubiquitina E3 tipo RING, la E3 funciona como adaptador que aproxima a la E2 y al sustrato. Las E4 pueden favorecer la formación de cadenas de poliubiquitinación y las DUB (desubiquitininas) revierten el proceso (no mostradas en la figura).

Las mutaciones PHAI encontradas en KLHL3 - mediante secuenciación de exomas -, pueden ser recesivas o dominantes y no están confinadas a una sola región^[93], sino que se encuentran presentes en los dominios BTB, BACK y repeticiones Kelch (**Figura 21A**). Experimentos con transfecciones estables de KLHL3 WT y sus diferentes mutantes PHAI en células HEK293, mostraron que las mutaciones en los dominios BTB y BACK afectan su capacidad de unirse a CUL3, mientras que las mutaciones en las repeticiones Kelch inhiben la capacidad de KLHL3 para unirse con sus sustratos^[96] (**Figura 21B**).

Por otra parte, las mutaciones halladas en CUL3 son de tipo dominante y se deben a un empalme alternativo que elimina el exón 9, causando una delección de 57 aminoácidos (403-459)^[93]. Experimentos en células HEK293 mostraron que la mutante CUL3 Δ 9 no pierde su capacidad de unión con KLHL3 (**Figura 22A**), sino que aparentemente incrementa su actividad de ligasa de ubiquitina E3 contra KLHL3 (**Figura 22B**) y la degrada^[121] (**Figura 22C**).

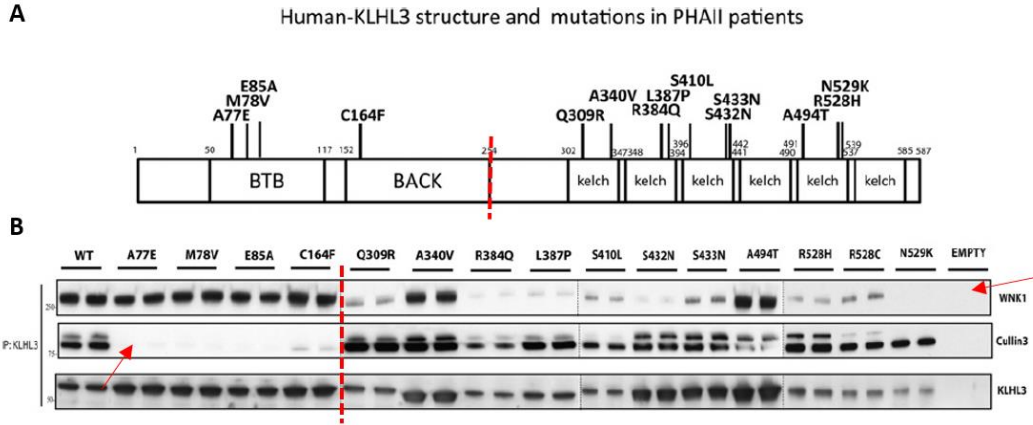


Figura 21. Las mutantes PHAI1 de KLHL3 pierden su capacidad de unión con CUL3 y sus sustratos. A) Representación esquemática de las mutaciones PHAI1 halladas en los diferentes dominios estructurales de KLHL3. **B)** Inmunoprecipitación donde se observa que las mutaciones PHAI1 de KLHL3 localizadas en los dominios BTB y BACK impiden su interacción con CUL3, mientras que las mutaciones en las repeticiones Kelch de KLHL3 presentan diferente afinidad por el sustrato WNK1^[96].

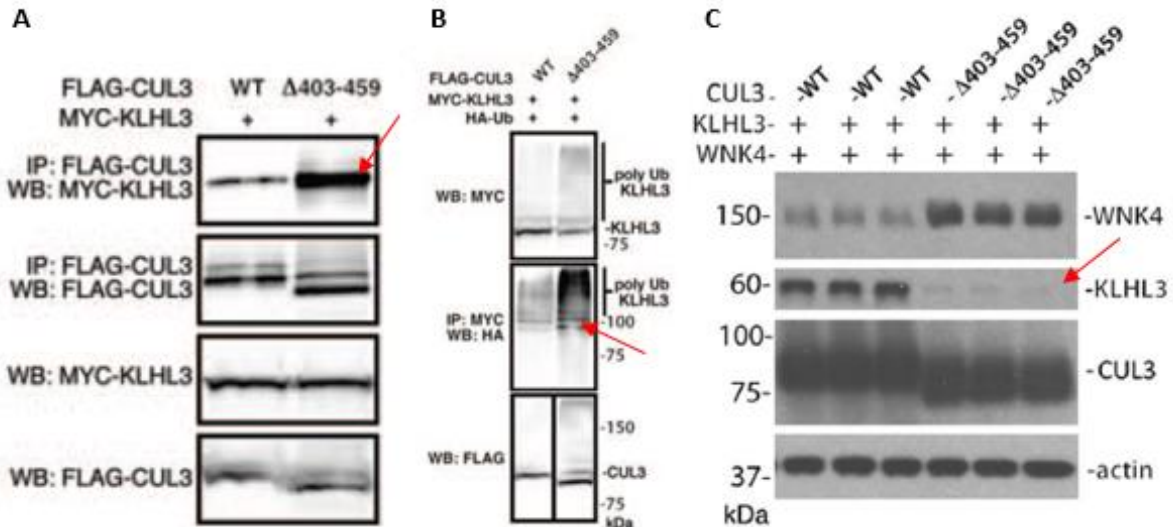


Figura 22. La mutante CUL3 $\Delta 9$ ubiquitina y degrada a KLHL3. A) Inmunoprecipitación donde se observa que la mutante CUL3 $\Delta 9$ mantiene la habilidad de interactuar con KLHL3. **B)** CUL3 $\Delta 9$ ubiquitina a KLHL3 de manera más eficaz que CUL3 WT. **C)** La co-expresión de CUL3 WT y KLHL3 en células HEK293 disminuye la abundancia de WNK4, mientras que la mutante CUL3 $\Delta 9$ tiene afinidad preferencial por degradar a KLHL3. Ellison^[121].

Subsecuente a la identificación de las mutaciones en KLHL3 y CUL3 relacionadas a PHAI1, se encontró que las cinasas WNK1 y WNK4 son los sustratos del complejo KLHL3-CUL3^[95] ^{[96][97][98][99][100]}. Mediante experimentos en células HEK293 transfectadas con WNK1, KLHL3 WT y KLHL3 R528H (mutante PHAI1 de unión al sustrato), y en presencia de los componentes del sistema de ubiquitina (E1, E2 y ubiquitina) – en diferentes combinaciones –, e incubadas con ATP y Mg²⁺ como cofactor, se demostró que la presencia de todas las proteínas del sistema de ubiquitina promueve la ubiquitinación de WNK1, así como que la mutante KLHL3 R528H es incapaz de unir y ubiquitinar a WNK1^[96] (**Figura 23A**). De la misma forma, se observó la ubiquitinación de WNK4 en presencia de KLHL3 WT, en experimentos de inmunoprecipitación en condiciones desnaturizantes^[97] (**Figura 23B**).

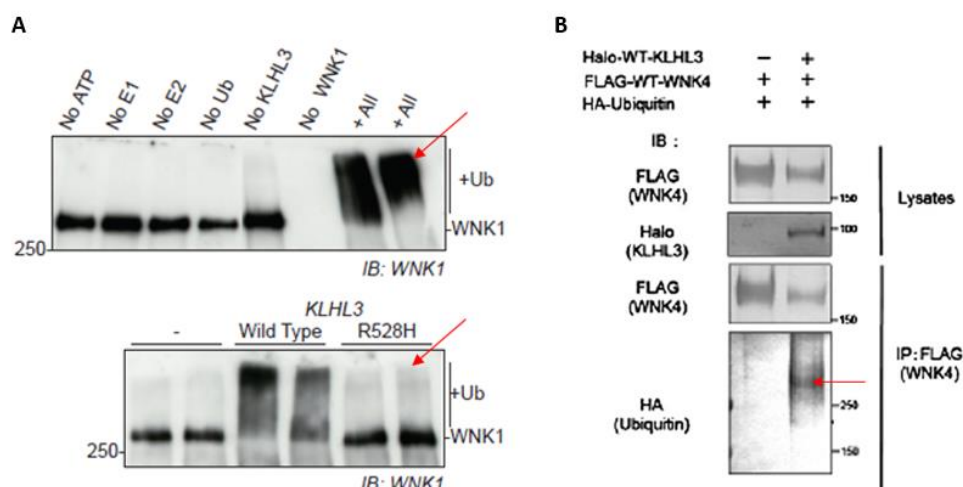


Figura 23. WNK1 y WNK4 son sustratos de KLHL3. **A)** La presencia de todos los componentes del sistema de ubiquitina (ATP, E1, E2, ubiquitina) y KLHL3 WT promueven la ubiquitinación de WNK1, mientras que la mutante KLHL3 R528H no tiene efecto sobre WNK1^[96]. **B)** WNK4 se ubiquitina en presencia de KLHL3 WT. Uchida^[97].

Análisis de mutaciones en WNK4 causantes de PHAI1, claramente revelaron cómo interaccionan estas proteínas. Como se mencionó anteriormente, tres de las cuatro mutaciones PHAI1 en WNK4 se encuentran en su dominio ácido, por lo que experimentos realizados en células HEK293 mediante transfección estable de WNK4 WT y las mutantes

WNK4 E562K y Q565E (mutantes PHAII del dominio ácido)^[96] (**Figura 24A**) y experimentos de espectrometría acoplada a fluorescencia, mostraron que la interacción entre KLHL3 y WNK4 es suprimida por mutaciones en WNK4 causantes de PHAII, indicando que el dominio ácido de la cinasas WNK está involucrado en la unión con KLHL3^{[97][98]} (**Figura 24B**).

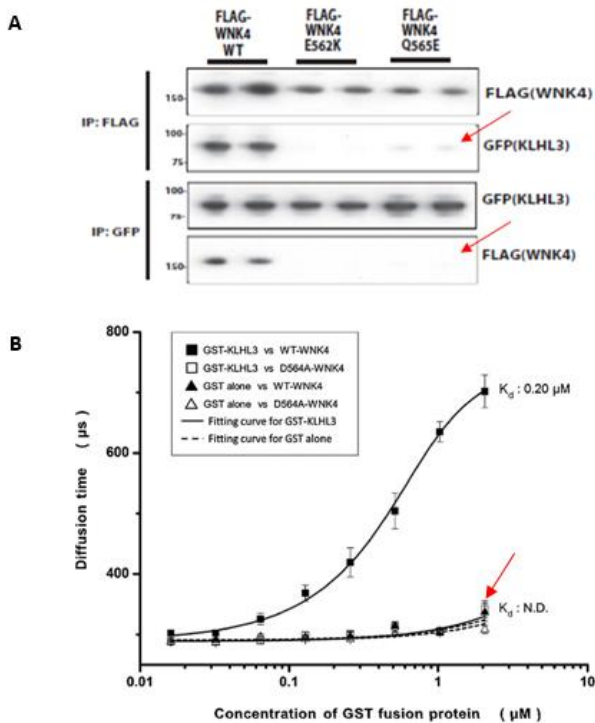


Figura 24. El dominio ácido de WNK4 es el sitio de unión con KLHL3. A) WNK4 WT co-immunoprecipita con KLHL3, mientras que las mutantes WNK4 E562K y Q565E no interactúan con KLHL3^[96]. **B)** Ensayo de FCS donde se observa que el tiempo de difusión del péptido del dominio ácido de WNK4 WT aumenta, en comparación con el control representado por la proteína de fusión GST, indicando interacción con KLHL3. No existen diferencias entre la mutante WNK4 D654A y el control, de tal forma que la mutante WNK4 DA aparentemente no se une a KLHL3^[97].

Con base en los hallazgos previos, se decidió explorar si además de las cinasas WNK1 y WNK4, KLHL3 podía tener como sustratos a otros componentes río abajo de la cascada de señalización WNK-SPAK/OSR1-NCC. Se realizaron experimentos en células HEK293 co-expresando las proteínas KLHL3, WNK4, OSR1, SPAK y NCC y se observó que la interacción con KLHL3 es exclusiva para WNK4 y en ningún caso KLHL3 co-immunoprecipita con las cinasas OSR1, SPAK o NCC^[97] (**Figura 25**). Lo anterior demuestra que el efecto de ligasa de ubiquitina KLHL3 es específico para las cinasas WNK a través de la unión con su dominio ácido.

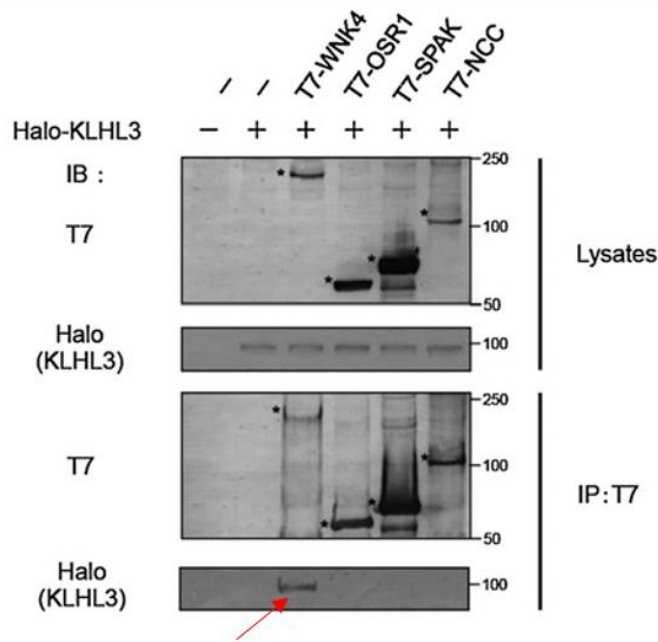


Figura 25. KLHL3 interactúa únicamente con WNK4. Inmunoprecipitación donde se observa que KLHL3 no interactúa con OSR1, SPAK o NCC^[97].

Con el fin de analizar los efectos de las mutantes PHAII *in vivo*, se examinó la expresión proteica y la fosforilación de las componentes que conforman la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC, para lo cual se crearon ratones knock-in WNK4^{D561A/+} y WNK4^{D561A/D561A}, así como KLHL3^{R528H/+} y KLHL3^{R528H/R528H}. Ambos ratones – fueran homocigotos o heterocigotos –, mostraron incremento en los niveles de WNK1 y WNK4, así como un aumento en la fosforilación de OSR1, SPAK y NCC (**Figura 26A y B**). Además, se observó que los niveles de RNAm de WNK1 y WNK4 en los ratones knock-in de KLHL3^{R528H/+} se mantuvieron constantes en comparación con los ratones WT, indicando que el incremento en los niveles de estas cinasas se debe a un efecto post-traduccional que se traduce como la imposibilidad de ubiquitarlas y degradarlas^{[97][100]} (**Figura 26C**).

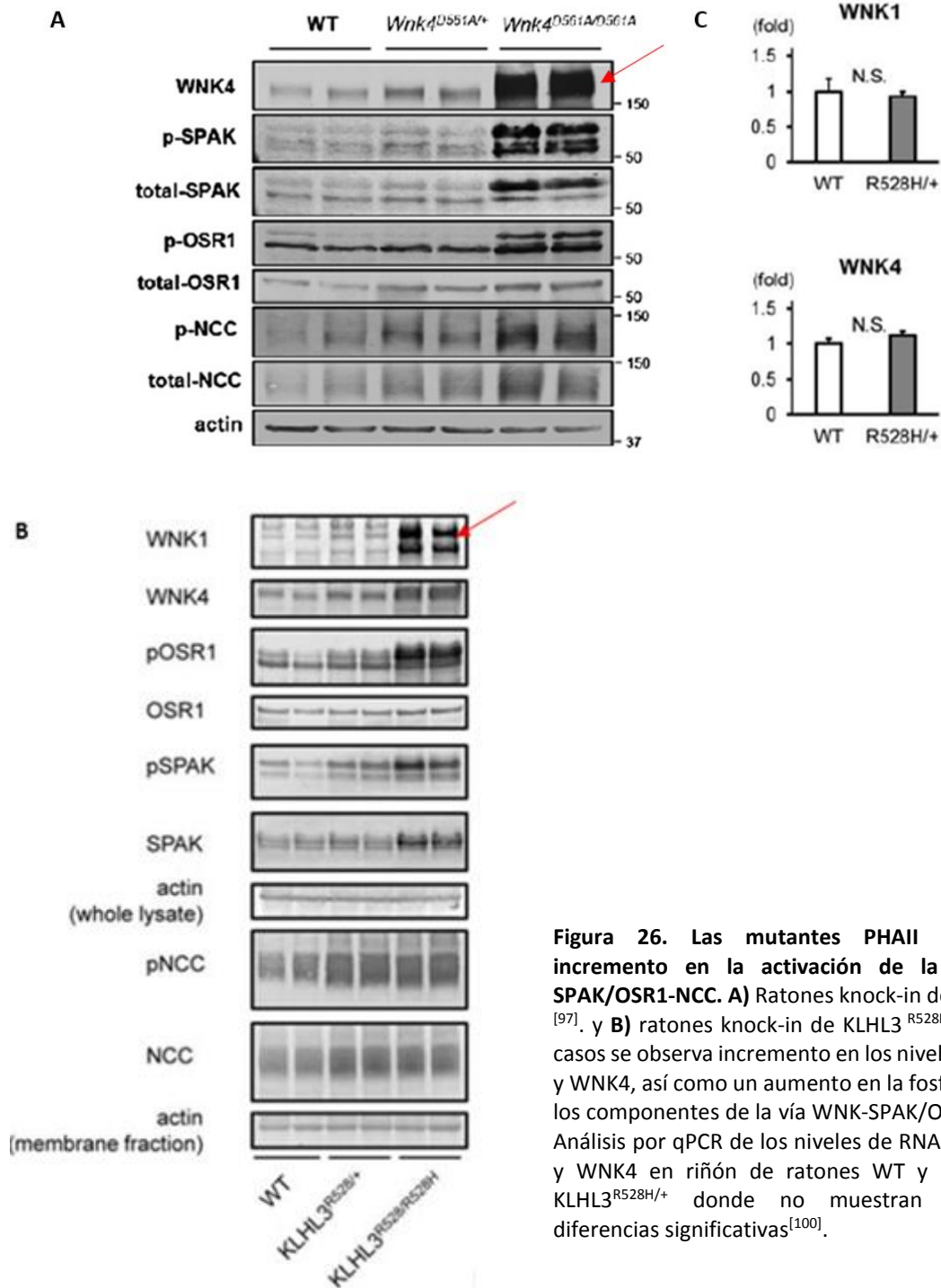


Figura 26. Las mutantes PHaII causan un incremento en la activación de la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC. A) Ratones knock-in de *Wnk4^{D561A}* [97]. **B)** ratones knock-in de *KLHL3^{R528H}*. En ambos casos se observa incremento en los niveles de WNK1 y WNK4, así como un aumento en la fosforilación de los componentes de la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC. **C)** Análisis por qPCR de los niveles de RNAm de WNK1 y WNK4 en riñón de ratones WT y knock-in de *KLHL3^{R528H/+}* donde no muestran diferencias significativas^[100].

Tomando en cuenta todos los hallazgos mostrados previamente, se puede concluir que todas las mutaciones en WNK1, WNK4, KLHL3 y CUL3 causantes de PHAI1 llevan a una consecuencia común: la reducción de la ubiquitinación y degradación de las cinasas WNK y un incremento de las mismas dentro de la célula^{[92][98]}. De tal forma que el aumento de las cinasas WNK1 y WNK4 en el riñón, sobre-activa la cascada de señalización WNK-SPAK/OSR1-NCC y causan el fenotipo de PHAI1 (**Figura 27**).

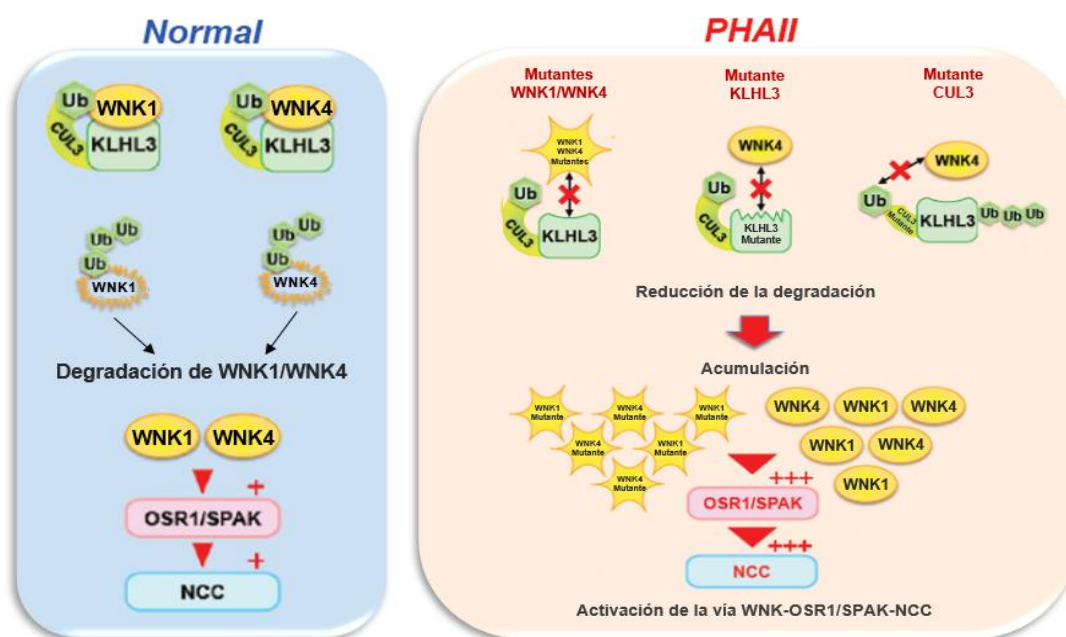
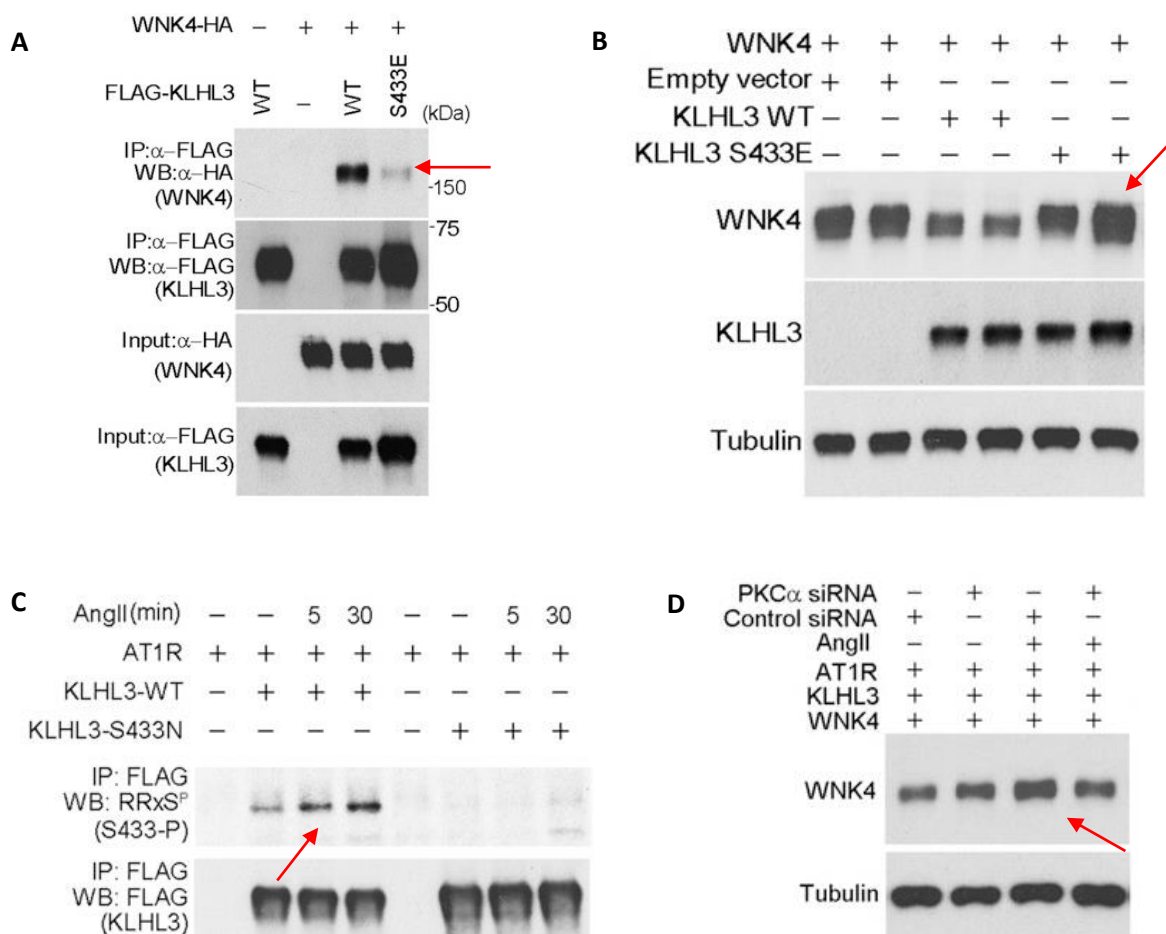


Figura 27. Modelo Normal vs PHAI1. Bajo condiciones normales, la concentración basal de WNK1 y WNK4 se mantiene por su apropiada ubiquitinación y degradación por el complejo KLHL3-CUL3. Las mutaciones causantes de PHAI1 en WNK1, WNK4, KLHL3 y CUL3 afectan la interacción entre ellas, teniendo como resultado la reducción de la degradación de las cinasas WNK y su acumulación intracelular, lo que sobre-activa la vía WNK-OSR1/SPAK-NCC^[92].

Se sabe que la dieta alta o baja en sal, disminuye o aumenta respectivamente, la fosforilación de OSR1/SPAK y NCC en el riñón, ajustando la excreción de sal con respecto a la ingesta^{[122][123]}. De igual forma, la aldosterona y la AngII regulan la activación de la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC por diferentes mecanismos^{[44][124]}.

Recientemente se realizaron experimentos que mostraron que la AngII producida en condiciones de hipovolemia –por acción del eje RAA –, induce la fosforilación de la Ser433 de KLHL3, mediada por la proteína cinasa C (PKC), previniendo la degradación de las cinasas WNK y exhibiendo un fenotipo similar al que producen las mutaciones PHAII de KLHL3. Para llegar a esta conclusión se realizaron experimentos transfectando con KLHL3 WT y la mutante fosfomimética KLHL3 S433E en células COS-7 (**Figura 28A**) y HEK293 (**Figura 28B**), así como ensayos de infusión de AngII *in vitro* e *in vivo* y detección de la fosforilación de la S433 de KLHL3 mediante el uso de fosfo-anticuerpo específico (**Figura 28C y E**), demostrando que éste efecto se lleva a cabo a través de la PKC^[125] (**Figura 28D**).



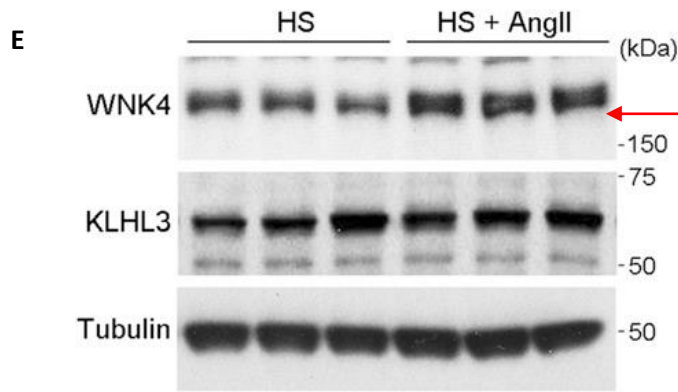


Figura 28. La AngII fosforila a KLHL3 inactivándola. La mutante fosfomimética de KLHL3 S433E previene **A)** la unión y **B)** la degradación de WNK4 en células COS-7. **C)** La infusión de AngII aumenta la fosforilación de la S433 de KLHL3 en células HEK293 **D)** a través de la PKC. **E)** La infusión de AngII incrementa los niveles de WNK4 en ratones alimentados con dieta alta en sal^[125].

Estos hallazgos proponen un nuevo mecanismo mediante el cual la AngII aumenta la concentración de las cinasas WNK y promueve el aumento en la reabsorción renal de sal acoplada a la reducción en la excreción de K^+ ^[125] (**Figura 29**).

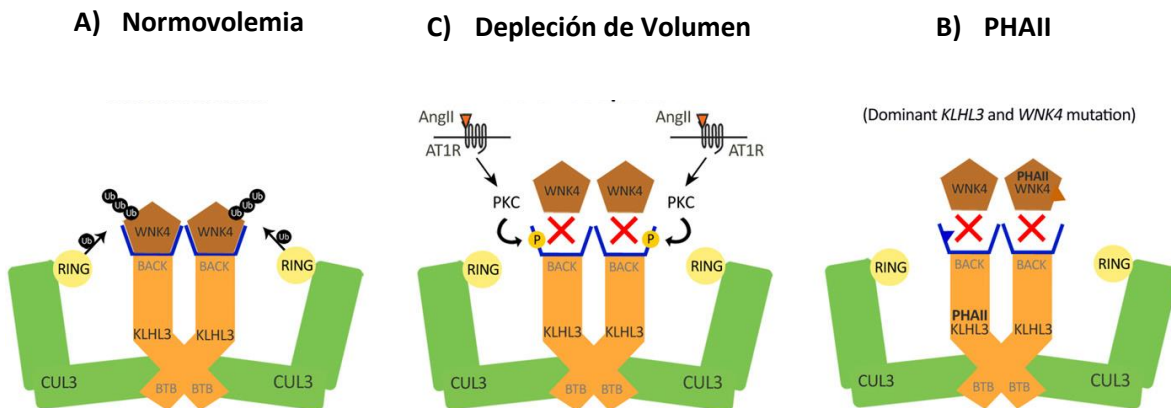


Figura 29. Modelo de regulación de la asociación WNK4-KLHL3 en condiciones de hipovolemia y en PHAII. **A)** En condiciones normales, KLHL3 se une a WNK4 y la degrada. **B)** Durante la depleción de volumen, la AngII vía su receptor AT1 activa a la PKC que fosforila la S433 localizada en las repeticiones Kelch de KLHL3, previniendo la unión y degradación de WNK4. **C)** En PHAII, las mutaciones en las repeticiones Kelch de KLHL3 y en el dominio ácido de WNK4 impiden la interacción entre ellas, imitando el efecto fisiológico de la AngII y aumentando los niveles de WNK4.

En conjunto, la evidencia presentada muestra que la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC es el mecanismo subyacente al desarrollo de PHAI, que se traduce como la sobre-activación de NCC y por tanto, a un aumento en la reabsorción renal de sal aunada a la excreción anormal de K^+ . Sin embargo, el o los mecanismos a través de los cuales se regulan los diferentes componentes de esta cascada de señalización no se han podido esclarecer en su totalidad. El presente trabajo propone dos posibles mecanismos de regulación específicos para las cinasas WNK1 y WNK3.

Planteamiento del Proyecto

Justificación

El co-transportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (NCC) y la regulación de la cascada de señalización que conlleva a su activación (vía WNK-SPAK/OSR1-NCC), son factores claves en la regulación de la presión arterial y el metabolismo de electrolitos. La existencia de mutaciones *missense* en la cinasa WNK1 que producen hipercalemia, con acidosis metabólica pero sin hipertensión, sugieren la existencia de un mecanismo de regulación para NCC en la segunda porción de la nefrona distal - donde la expresión de NCC es limitada -, de tal manera que los cambios en la activación de éste co-transportador no serían suficientes para alterar la presión arterial, lo cual explicaría el fenotipo de hipercalemia sin hipertensión. Dado que la segunda porción de la nefrona distal se considera sensible a aldosterona por la presencia de la enzima $11\beta\text{HSD-2}$, es posible que la síntesis de la cinasa SGK1 tenga efecto sobre la regulación de la cinasa WNK1 y por ende de NCC. Por otra parte, la presencia exclusiva y conservada de un residuo potencialmente fosforilable (Thr541) en el dominio ácido - de unión a KLHL3 -, de la cinasa WNK3 sugiere la existencia de un mecanismo de regulación único para ésta isoforma que conlleve a una modulación fina del co-transportador NCC.

Objetivos

Generales

1. Estudiar el efecto de la cinasa SGK1 sobre la cinasa WNK1.
2. Analizar la importancia funcional de la Thr541 del dominio ácido de la cinasa WNK3.

Particulares

1. Estudiar el efecto de la co-expresión de la cinasa SGK1 y la cinasa WNK1.
 - Analizar el efecto de SGK1 sobre la función de NCC en un sistema de expresión heterólogo.
 - Analizar el efecto de SGK1 sobre la interacción entre KLHL3 y WNK1, WNK3 y WNK4.
2. Determinar si la Thr541 del dominio ácido de la cinasa WNK3 es importante para el reconocimiento y degradación por la ligasa de ubiquitina KLHL3.
 - Analizar el efecto de la mutante fosfoablativa de la Thr541 de WNK3 sobre su interacción con KLHL3.
 - Estudiar la importancia funcional de la Pro561 del dominio ácido de WNK4, que corresponde con la Thr541 del dominio ácido de WNK3.
 - Analizar el efecto de la mutante fosfomimética de la Thr541 de WNK3 sobre su interacción con KLHL3.
 - Analizar el efecto de las mutantes (fosfoablativa y fosfomimética) de WNK3 sobre la función de NCC en un sistema de expresión heterólogo.

Materiales y Métodos

Expresión funcional homóloga y heteróloga

La expresión funcional se basa en la expresión de proteínas en células a través de la transfección o inyección de DNA o RNA complementario (DNA o RNAc) que codifican para dichas proteínas, de manera que la célula experimental lleva a cabo el proceso de transcripción, traducción y síntesis proteica. Se utilizaron los siguientes DNA's en la realización de experimentos:

- NCC – DNA de NCC de rata con epítoto FLAG
- KLHL3 – DNA de KLHL3 de ratón con epítoto FLAG. De esta clona se emplearon las variantes silvestre y la mutante R528H, la cual es una mutación PHAII, localizada en las repeticiones Kelch de unión al sustrato.
- SGK1 – DNA de SGK1 de ratón. Se utilizó la variante catalíticamente activa S422D.
- WNK1, WNK3 y WNK4 – DNA de WNK1 y WNK3 de humano con epítoto MYC y WNK4 de humano con epítoto FLAG. De estas clonas se generaron las mutantes WNK3 T541A, WNK3 T541E y WNK4 P561A.

Mutagénesis sitio dirigida

Para estudiar la importancia de la Thr541 del dominio ácido de WNK3, se realizaron mutaciones puntuales por PCR empleando el QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit de Agilent Technologies. Se realizaron dos mutaciones puntuales generando las clonas WNK3 T541A (fosfoablative) y T541E (fosfomimética). Para analizar el efecto del cambio de aminoácido en la Pro561 de WNK4 – correspondiente a la Thr541 de WNK3 -, se generó la mutante WNK4 P561A. Todas las mutaciones fueron corroboradas mediante secuenciación. Posteriormente se co-inyectaron en ovocitos y/o transfectaron en células HEK293 para evaluar el efecto sobre el transporte funcional de NCC y su interacción con KLHL3, respectivamente.

Ovocitos de *Xenopus laevis*

Para poder estudiar la función del co-transportador NCC se emplearon ovocitos de rana *Xenopus laevis* como sistema de expresión heterólogo. Se ha demostrado que la inyección del RNAc de las proteínas a estudiar, promueve una expresión significativa de las mismas y esto permite medir la actividad de los transportadores. Los ovocitos fueron inyectados con 0.2µg/µl de RNAc de: NCC, WNK1, WNK3, WNK4, KLHL3 y SGK1. Posterior a las 48-72 h de la inyección, se realizaron experimentos de captación de [²²Na⁺], en presencia o ausencia de hidroclorotiazida (diurético tipo tiazida, inhibidor específico de NCC). Los ovocitos se colocaron en una solución de pre-incubación libre de Cl⁻ durante 30 min y posteriormente se transfirieron a una solución de captación de [²²Na⁺] durante 1 h. El promedio de la captación de [²²Na⁺] en presencia de hidroclorotiazida se restó a los valores obtenidos en su ausencia para obtener la captación de [²²Na⁺] sensible a tiazidas – correspondiente a la actividad de NCC -. Cada experimento independiente, contiene al menos 10 ovocitos por grupo y por experimento. Para los estudios de proteína total, 48-72 h posteriores a la inyección se recolectaron y lisaron entre 10-30 ovocitos por grupo con buffer de lisis adicionado con inhibidor de proteasas, empleando los extractos de proteínas totales para evaluar cuantitativamente la expresión de las proteínas de interés mediante Western Blot.

Células HEK293

Para estudiar el efecto de KLHL3 sobre WNK1, WNK3, WNK4 y sus respectivas mutantes, se cultivaron células HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Life Technologies) y 1% de penicilina streptomicina neomicina (Life Technologies) a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Se realizó transfección transitoria con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en placas de cultivo celular de 6 pozos, con una confluencia del 70-90% el día de la transfección. Para cada pozo se empleó una concentración de 2.0 µg/µl de DNA plasmídico de: WNK1, WNK3, WNK4, KLHL3 y SGK1, y 5 µl de lipofectamina en un volumen final de 250 µl de medio Opti-MEM.

Los complejos lípido-DNA se incubaron durante 20-30 min a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron a cada pozo por goteo. Pasado el tiempo de incubación de 24-48 h a 37°C, las células fueron colocadas en hielo, eliminado el medio de cultivo y lavadas con solución PBS a 4°C, posteriormente se lisaron con 100 µl buffer de lisis adicionado con β-mercaptoetanol e inhibidor de proteasas. Se colectaron las células en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C para eliminar los núcleos celulares. Se recolectó el sobrenadante con las proteínas totales y se cuantificaron.

Western Blot

Para inmunodetección de las proteínas de interés, se empleó la técnica de Western Blot; para ello se emplearon proteínas totales extraídas de ovocitos y células HEK293, en concentraciones de 100 µg y 20 µg respectivamente. Se utilizaron geles de SDS-acrilamida al 7.5% y se revelaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-FLAG (1:5000, Sigma), anti-MYC (1:1000, Sigma), anti-NCC (6:1000), anti-pNCC (4:1000), anti-WNK3 (15:1000), anti-Actina (1:2500), anti-ERK1 (1:1000), además del anticuerpo secundario anti-SHEEP (1:5000, Sigma).

Estadística

Todos los resultados se presentan como promedios y fueron analizados mediante una prueba t-student no pareada de dos colas. Las diferencias significativas entre grupos se evaluaron mediante una ANOVA de una vía utilizando la corrección de Dunnet. Los resultados se presentan como la media ± el error estándar. Se consideró estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$.

Resultados

A continuación se presentan los resultados encontrados durante el desarrollo de éste trabajo, que exploran las interrogantes planteadas en el proyecto.

La cinasa SGK1 inhibe el efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3 sobre la cinasa WNK1

Con el fin de estudiar el efecto de la cinasa SGK1 sobre la cinasa WNK1 se realizaron experimentos de expresión funcional de NCC mediante la co-inyección de RNAc de: NCC, WNK1, KLHL3 y SGK1 – en diferentes combinaciones -, en ovocitos de *X. laevis*.

Se muestra el resultado de 6 experimentos independientes (**Figura 30**) en los cuales se midió la actividad de NCC, expresada como la captación de [$^{22}\text{Na}^+$] (pmol/ovocito/h) \pm el error estándar, utilizando como control la inhibición por efecto de la hidroclorotiazida (barras negras). La co-inyección de NCC + WNK1 (4ta barra) aumentó la actividad de NCC a 4951 ± 684 pmol/ovocito/h vs 2741 ± 390 pmol/ovocito/h en ausencia de WNK1 (2da barra) ($p < 0.001$), corroborando el efecto activador de WNK1 sobre NCC previamente reportado. La co-inyección de NCC + WNK1 + KLHL3 (6ta barra) disminuyó el efecto de WNK1 sobre la activación de NCC a 3121 ± 345 pmol/ovocito/h vs 4951 ± 684 pmol/ovocito/h en ausencia de KLHL3 (4ta barra) ($p < 0.01$) y modificó la actividad de NCC a valores similares en ausencia de WNK1 (2da barra) ($p = 0.47$). En estudios previos se ha demostrado que el efecto inhibitorio de KLHL3 observado se debe a la degradación de la cinasa WNK1. La co-inyección de NCC + SGK1 (8va barra) y NCC + WNK1 + SGK1 (10ma barra) mostraron una aparente disminución de la actividad de NCC; sin embargo, esto no fue significativo al comparar contra sus respectivos controles NCC (2da barra) ($p < 0.07$) y NCC + WNK1 (4ta barra) ($p < 0.09$). La co-inyección de NCC + WNK1 + KLHL3 + SGK1 (12va barra) aumentó la actividad de NCC a 5556 ± 602 pmol/ovocito/h vs 3121 ± 345 pmol/ovocito/h en ausencia de SGK1 (6ta barra) ($p < 0.0001$) y recuperó el efecto de WNK1 sobre la activación de NCC a valores cercanos en ausencia de KLHL3 (4ta barra) ($p < 0.5$). La inhibición del efecto de KLHL3 sobre WNK1 en

presencia de SGK1 y la ausencia de efecto de SGK1 sobre NCC y WNK1 sugiere que, la cinasa SGK1 impide la interacción entre la ligasa de ubiquitina KLHL3 y la cinasa WNK1.

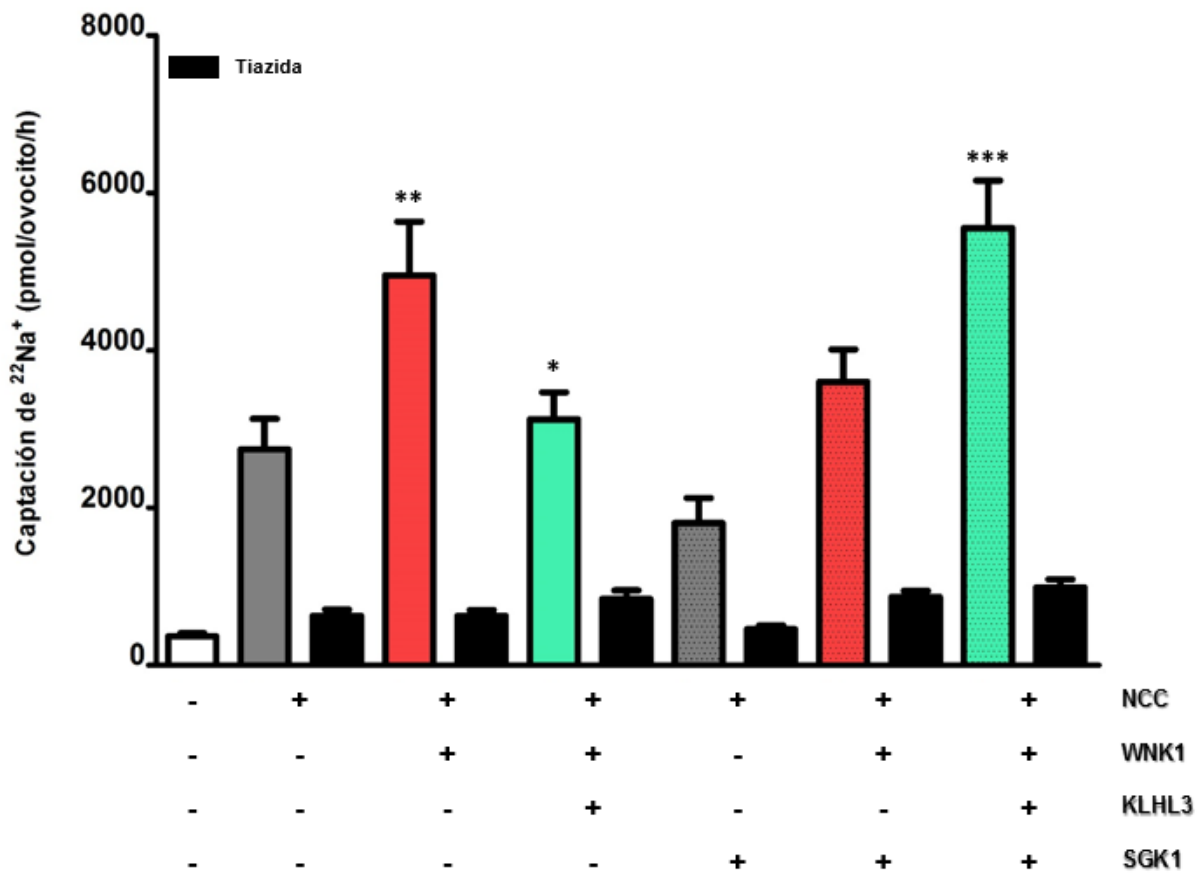


Figura 30. La cinasa SGK1 inhibe el efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3 sobre la cinasa WNK1. Experimento funcional de captación de $[^{22}\text{Na}^+]$ que muestra el efecto activador de WNK1 sobre NCC (4ta barra), el efecto inhibitor de KLHL3 sobre WNK1 (6ta barra) y el efecto inhibitor de SGK1 sobre el efecto de KLHL3 en WNK1 (12va barra). ** $p < 0.001$ vs NCC, * $p < 0.01$ vs NCC + WNK1 y *** $p < 0.0001$ vs NCC + WNK1 + KLHL3.

La inhibición del efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3 por SGK1 es exclusiva para la cinasa WNK1.

Tomando en cuenta el resultado anterior, se decidió analizar si el efecto de la cinasa SGK1 sobre la inhibición de la interacción entre la ligasa de ubiquitina KLHL3 y la cinasa WNK1 era reproducible en las cinasas WNK3 y WNK4. Para esto, se realizaron experimentos de expresión funcional de NCC mediante la co-inyección de RNAc en diferentes combinaciones de: NCC, WNK1, WNK3, WNK4, KLHL3 y SGK1 en ovocitos de *X. laevis*.

Se muestra el resultado de 5 experimentos independientes de captación de [$^{22}\text{Na}^+$] (**Figura 31**) expresados como porcentaje de actividad de NCC \pm el error estándar, tomando la actividad de NCC sensible a hidroclorotiazida como el 100%. La co-inyección de NCC + WNK1 (2da barra), NCC + WNK3 (3ra barra) y NCC + WNK4 (4ta barra) aumentaron la actividad de NCC a $222 \pm 22\%$, $242 \pm 50\%$ y $272 \pm 46\%$ - respectivamente -, vs $100 \pm 13\%$ en ausencia de WNK1, WNK3 o WNK4 (1ra barra) ($p < 0.0001$), exhibiendo su efecto activador sobre NCC reportado con anterioridad. La co-inyección de NCC + WNK1 + KLHL3 (5ta barra), NCC + WNK3 + KLHL3 (6ta barra) y NCC + WNK4 + KLHL3 (7ma barra) disminuyeron el efecto de las cinasas WNK sobre la activación de NCC a $141 \pm 23\%$, $157 \pm 31\%$ y $34 \pm 26\%$ - respectivamente -, vs $222 \pm 22\%$, $242 \pm 50\%$ y $272 \pm 46\%$ en ausencia de KLHL3 (2da, 3ra y 4ta barra, respectivamente). Se observó que el efecto de KLHL3 sobre WNK1 y WNK3 es similar ($p < 0.01$), mientras que para WNK4 fue mucho más potente ($p < 0.0001$), sugiriendo que WNK4 es más afín a la degradación por KLHL3. La co-inyección de NCC + WNK1 + KLHL3 + SGK1 (8va barra) aumentó la actividad de NCC a $292 \pm 36\%$ vs $141 \pm 23\%$ en ausencia de SGK1 (5ta barra) ($p < 0.0001$) y recuperó el efecto de WNK1 sobre la activación de NCC a valores cercanos en ausencia de KLHL3 (2da barra) ($p < 0.11$), lo cual reafirma los resultados mostrados previamente. La co-inyección de NCC + WNK3 + KLHL3 + SGK1 (9na barra) y NCC + WNK4 + KLHL3 + SGK1 (10ma barra) no mostraron cambios significativos sobre la actividad de NCC al compararse con sus respectivos controles NCC + WNK3 + KLHL3 (6ta barra) ($p < 0.32$) y NCC + WNK4 + KLHL3 (7ma barra) ($p < 0.7$). La inhibición del efecto de KLHL3 sobre WNK1 en presencia de SGK1 y la ausencia de efecto de SGK1 sobre la inhibición de KLHL3

en WNK3 y WNK4 indica que, la cinasa SGK1 interactúa con la cinasa WNK1 de manera exclusiva y la protege de la degradación por la ligasa de ubiquitina KLHL3.

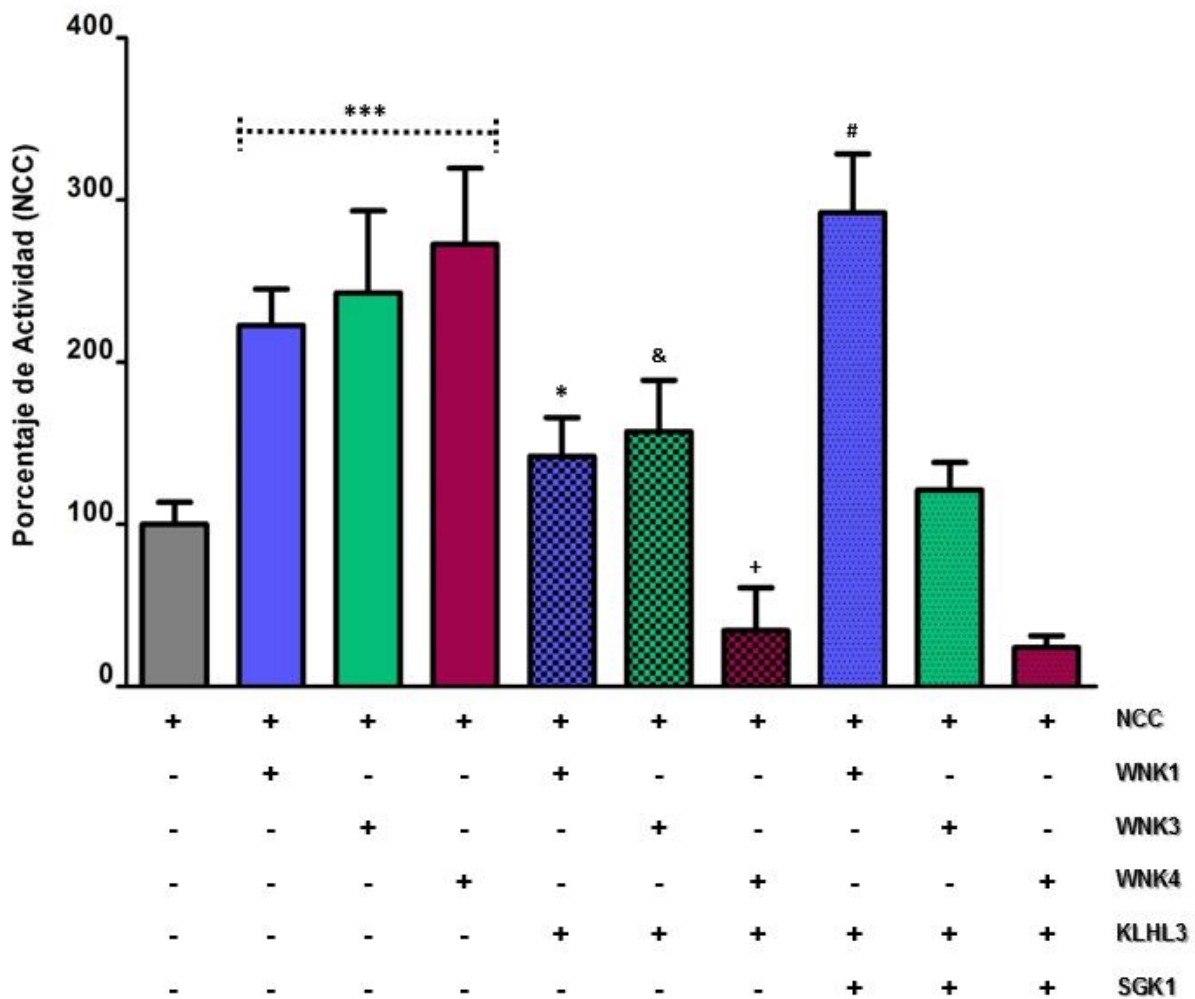


Figura 31. La inhibición del efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3 por SGK1 es exclusiva para la cinasa WNK1. Gráfica de sensibilidad a tiazidas que muestra el efecto activador de WNK1, WNK3 y WNK4 sobre NCC (2da, 3ra y 4ta barra), el efecto inhibitor de KLHL3 sobre WNK1, WNK3 y WNK4 (5ta, 6ta y 7ma barra) y el efecto inhibitor de SGK1 sobre el efecto de KLHL3 exclusivo para WNK1 (8va barra). *** $p < 0.0001$ vs NCC, * $p < 0.01$ vs NCC + WNK1, & $p < 0.01$ vs NCC + WNK3, + $p < 0.0001$ vs NCC + WNK4 y # $p < 0.0001$ vs NCC + WNK1 + KLHL3.

La mutante WNK3 T541A no se degrada por efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3

Con el propósito de determinar la importancia de la Thr541 del dominio ácido de la cinasa WNK3 para su reconocimiento y degradación por la ligasa de ubiquitina KLHL3, se decidió mutar el sitio T541 de WNK3 por una alanina (A, Ala), la cual al ser un aminoácido no polar además de no fosforilable, reduce la electronegatividad del dominio ácido de la cinasa WNK3 y la convierte en la mutante fosfoablata WNK3 T541A. Lo anterior se realizó mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR cambiando el codón ACT que codifica para treonina, por el codón GCT que codifica para alanina (**Figura 32A y B**).

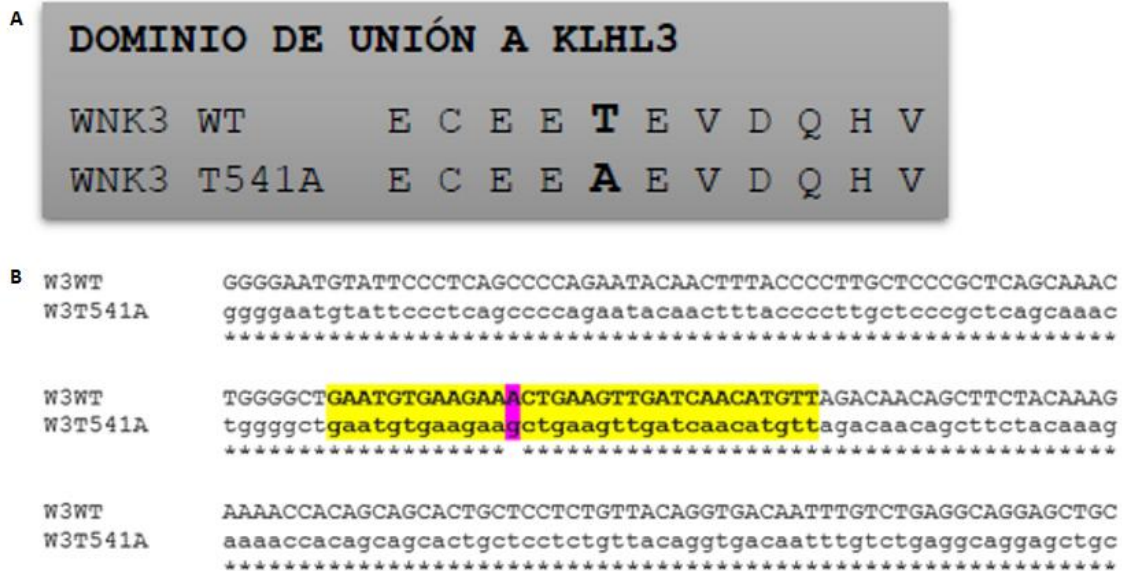


Figura 32. A) Mutación T541A en el dominio ácido de WNK3. **B)** Secuenciación y alineamiento de WNK3 WT con WNK3 T541A.

Para analizar el efecto de la mutante WNK3 T541A sobre su interacción con KLHL3, se co-inyectaron ovocitos de *X. laevis* con RNAc de: WNK3 WT, WNK3 T541A y KLHL3 – en diferentes combinaciones -, con el fin de estudiar los cambios en la expresión de proteínas mediante Western Blot. Se muestra un WB representativo de proteínas totales obtenidas de 3 co-inyecciones independientes, revelado contra α -MYC para WNK3, α -FLAG para KLHL3 y α -ACTINA como control de carga (**Figura 33**). La inyección de H₂O (1er carril) muestra el

lisado de proteínas totales y la ausencia de bandas inespecíficas. La co-inyección de WNK3 WT + KLHL3 (4to y 5to carril) disminuyó la expresión de WNK3 en comparación con su control inyectado en ausencia de KLHL3 (2do y 3er carril), lo que demuestra la degradación de WNK3 WT por efecto de KLHL3. La co-inyección de la mutante WNK3 T541A + KLHL3 (8vo y 9no carril) no mostró cambios en la expresión de WNK3 comparado con su control inyectado en ausencia de KLHL3 (6to y 7mo carril), sin embargo, aumentó la expresión de WNK3 en comparación con el grupo co-inyectado con WNK3 WT + KLHL3 (4to y 5to carril), lo cual demuestra que la mutante fosfoablativa WNK3 T541A se protege de la degradación por KLHL3. La ausencia del efecto de KLHL3 sobre la mutante WNK3 T541A sugiere que, la Thr541 – y la fosforilación -, del dominio ácido de la cinasa WNK3 es necesaria para su reconocimiento y degradación por la ligasa de ubiquitina KLHL3.

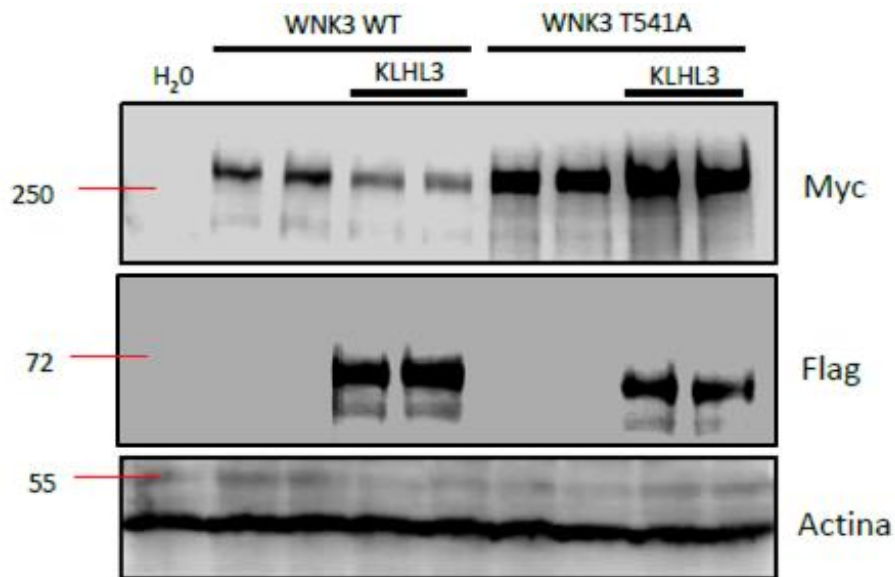


Figura 33. La mutante fosfoablativa WNK3 T541A no se degradada por efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3.

La mutante WNK4 P561A posee el mismo comportamiento que WNK4 WT y se degrada por efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3

El resultado anterior sugirió que la fosforilación de la Thr541 del dominio ácido de la cinasa WNK3 es importante para su reconocimiento por la ligasa de ubiquitina KLHL3, sin embargo, el efecto observado también podría deberse a que el simple cambio de aminoácido en esta posición impide la interacción entre WNK3 y KLHL3. De tal forma que se decidió estudiar la Pro561 del dominio ácido de WNK4, que corresponde con la misma posición de la Thr541 en el dominio ácido de WNK3 (**Figura 15**). Se realizó la misma mutación por el aminoácido alanina en la Pro561 de WNK4, cambiando el codón CCA que codifica para prolina, por el codón GCA que codifica para alanina (**Figura 34A y B**).

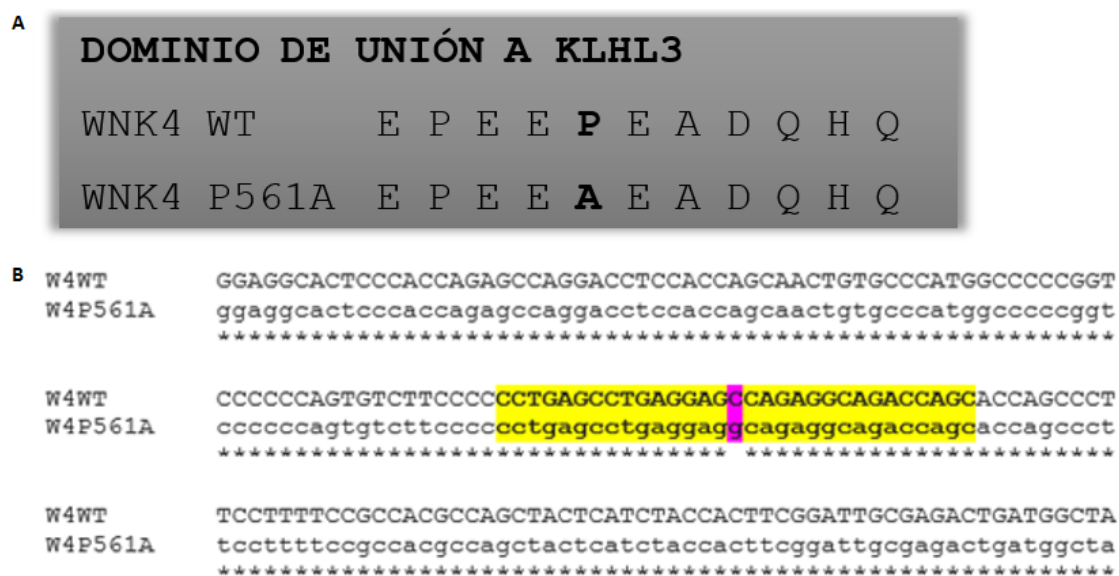


Figura 34. A) Mutación P561A en el dominio ácido de WNK4. **B)** Secuenciación y alineamiento de WNK4 WT con WNK4 P561A.

Para analizar el efecto de la mutante WNK4 P561A sobre su interacción con KLHL3, se transfectaron células HEK293 con diferentes combinaciones de DNA plasmídico de: WNK4 WT, WNK4 P561A y KLHL3, y se estudiaron los cambios en la expresión de proteínas mediante Western Blot. Se muestra un WB representativo de proteínas totales obtenidas

de 6 co-transfecciones independientes, revelado contra α -FLAG para WNK4 WT, WNK4 P561A y KLHL3, y α -ERK1 como control de carga (**Figura 35**). La transfección con un vector vacío (1er carril) muestra el lisado de proteínas totales y la ausencia de bandas inespecíficas. La transfección de KLHL3 (2do carril) se muestra como control. La co-transfección de WNK4 WT + KLHL3 (4to carril) disminuyó la expresión de WNK4, comparado con su control transfectado en ausencia de KLHL3 (3er carril), lo que demuestra la degradación de WNK4 WT por efecto de KLHL3. La co-transfección de la mutante WNK4 P561A + KLHL3 (6to carril) también disminuyó la expresión de WNK4 en comparación con su control transfectado en ausencia de KLHL3 (5to carril), exhibiendo el mismo comportamiento que el grupo co-transfectado con WNK4 WT + KLHL3 (4to carril). La degradación de la mutante WNK4 P561A por efecto de KLHL3 indica que, el cambio de aminoácido por alanina en esta posición del dominio ácido de la cinasa WNK4, por sí mismo, no altera su reconocimiento por la ligasa de ubiquitina KLHL3.

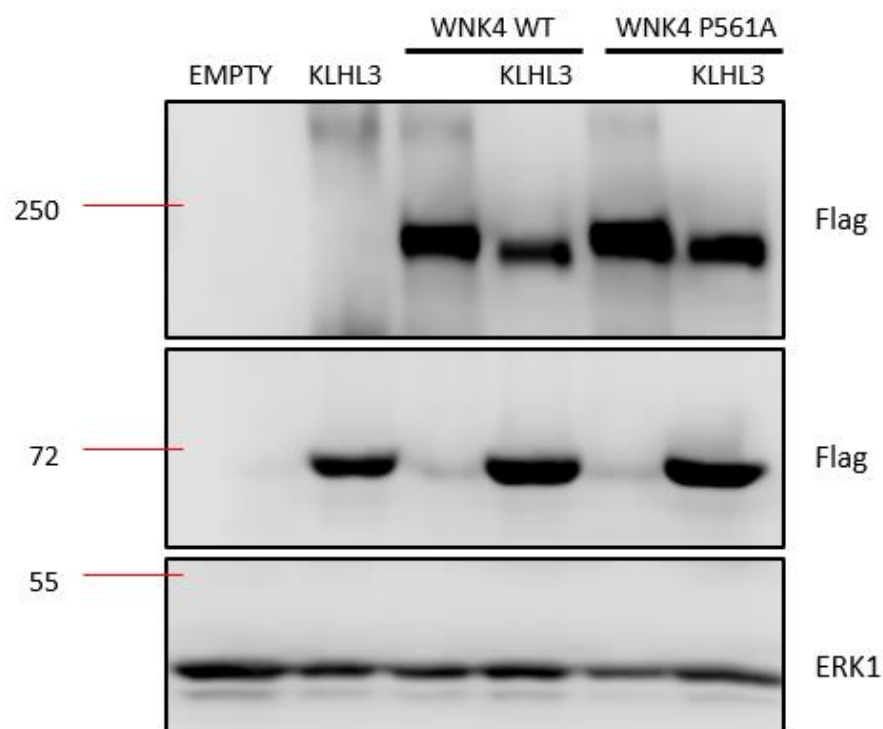


Figura 35. La degradación de la cinasa WNK4 WT por efecto de la ligasa de ubiquitina se mantiene en la mutante WNK4 P561A.

Con el fin de analizar el efecto de las mutantes WNK3 T541A y WNK4 P561A en el mismo ensayo, se transfectaron células HEK293 con DNA plasmídico de: WNK3 WT, WNK3 T541A, WNK4 WT, WNK4 P561A Y KLHL3 en diferentes combinaciones. Se muestra un WB representativo de proteínas totales obtenidas de 3 co-transfecciones independientes, revelado contra α -WNK3 para WNK3 WT y WNK3 T541A, α -FLAG para WNK4 WT, WNK4 P561A y KLHL3, y α -ERK1 como control de carga (**Figura 36**). Las co-transfecciones en estos experimentos mostraron el mismo comportamiento observado previamente. Estos resultados muestran que las mutantes WNK3 T541A y WNK4 P561A poseen efectos opuestos con respecto a su degradación por KLHL3, demostrando que el cambio de aminoácido en esta posición del dominio ácido de las cinasas WNK no es esencial para su reconocimiento por KLHL3, y que en efecto, la Thr541 del dominio ácido de la cinasa WNK3 es necesaria para su reconocimiento específico y degradación por la ligasa de ubiquitina KLHL3.

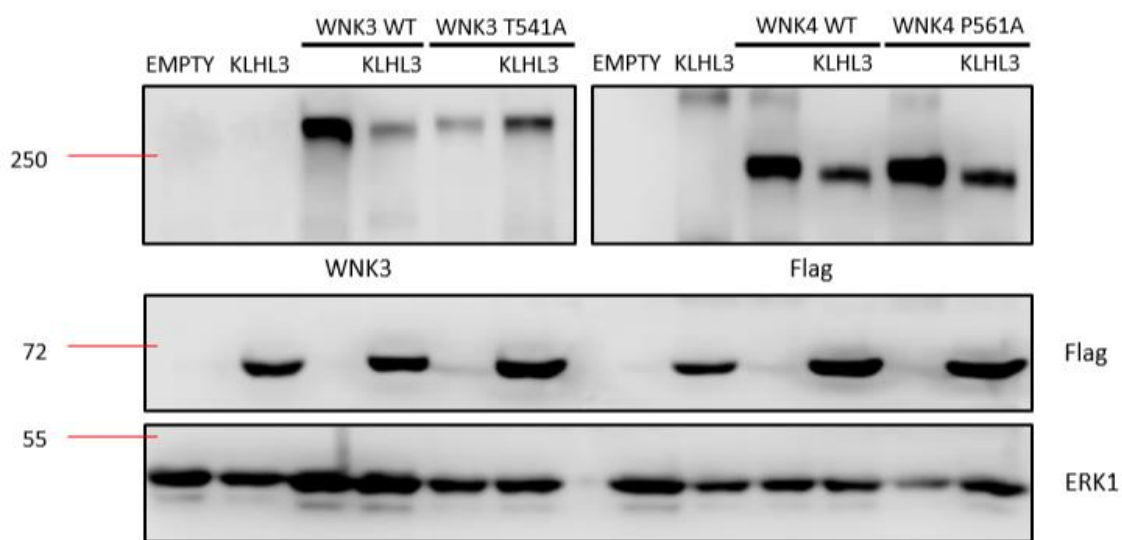


Figura 36. La mutante WNK3 T541A se protege de la degradación por KLHL3, mientras que la mutante WNK4 P561A sigue siendo sustrato de la ligasa de ubiquitina KLHL3.

La mutante fosfomimética WNK3 T541E es más afín a la degradación por la ligasa de ubiquitina KLHL3

Los resultados previos confirmaron que la existencia de la Thr541 del dominio ácido de WNK3 es importante para su reconocimiento por KLHL3 y sugirieron que la fosforilación de este sitio particular podría ser necesaria para que la cinasa WNK3 pueda ser reconocida como sustrato de la ligasa de ubiquitina KLHL3. Por lo anterior, se decidió crear la mutante fosfomimética de WNK3, cambiando el codón ACT que codifica para la Thr541, por el codón GAG que codifica para ácido glutámico (E, Glu), generando la mutante WNK3 T541E (**Figura 37A y B**). La presencia de un ácido glutámico en esta posición simularía el estado fosforilado de la Thr541, debido a la carga negativa de su cadena lateral que además, aumenta la electronegatividad del dominio ácido de la cinasa WNK3, similar a lo que sucedería si un grupo fosfato se añadiera en el mismo sitio.

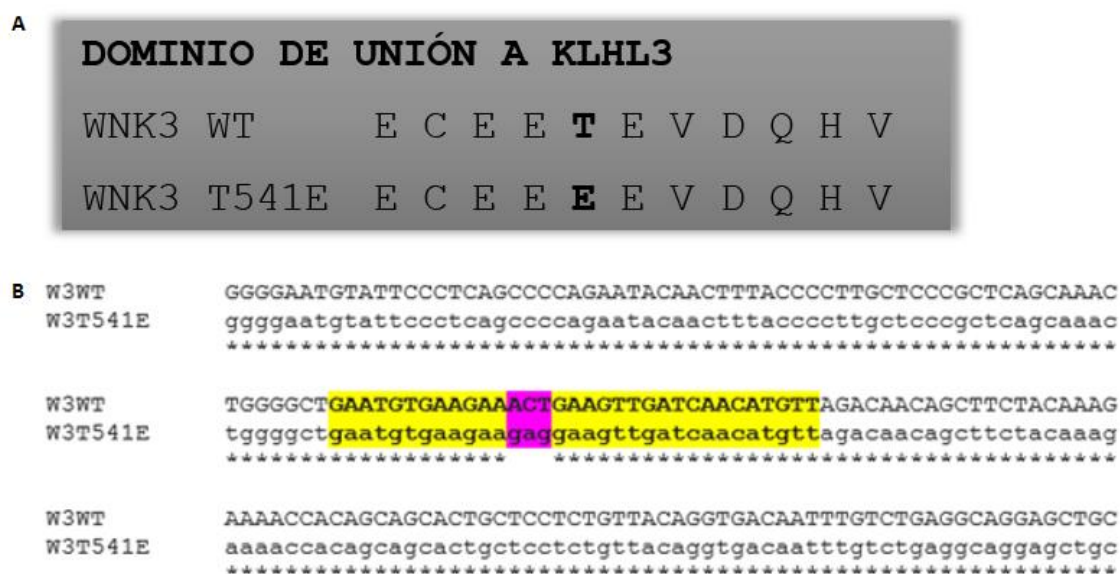


Figura 37. A) Mutación T541E en el dominio ácido de WNK3. **B)** Secuenciación y alineamiento de WNK3 WT con WNK3 T541E.

Para analizar el efecto de la mutante WNK3 T541E sobre su interacción con KLHL3, se transfectaron células HEK293 con DNA plasmídico de: WNK3 WT, WNK3 T541E y KLHL3 –

en diferentes combinaciones -, y se estudiaron los cambios en la expresión de proteínas mediante Western Blot. Se muestra un WB representativo de proteínas totales obtenidas de 4 co-transfecciones independientes, revelado contra α -WNK3 para WNK3 WT y WNK3 T541E, α -FLAG para KLHL3, y α -ERK1 como control de carga (**Figura 38**). La transfección con un vector vacío (1er carril) muestra el lisado de proteínas totales y la ausencia de bandas inespecíficas. La transfección de KLHL3 (2do carril) se muestra como control. La co-transfección de WNK3 WT + KLHL3 (4to carril) disminuyó la expresión de WNK3 comparado con su control transfectado en ausencia de KLHL3 (3er carril), lo que demuestra la degradación de WNK3 WT por efecto de KLHL3 como se había observado en experimentos previos. La co-transfección de la mutante WNK3 T541E + KLHL3 (6to carril) prácticamente eliminó la expresión de WNK3 en comparación con su control transfectado en ausencia de KLHL3 (5to carril) y mostró que es más afín a la degradación por KLHL3 en comparación con el grupo co-transfectado con WNK3 WT + KLHL3 (4to carril). La degradación total de la mutante WNK3 T541E por efecto de KLHL3 apunta a que, en efecto, la fosforilación de la Thr541 del dominio ácido de la cinasa WNK3 es esencial para su reconocimiento y degradación por la ligasa de ubiquitina KLHL3.

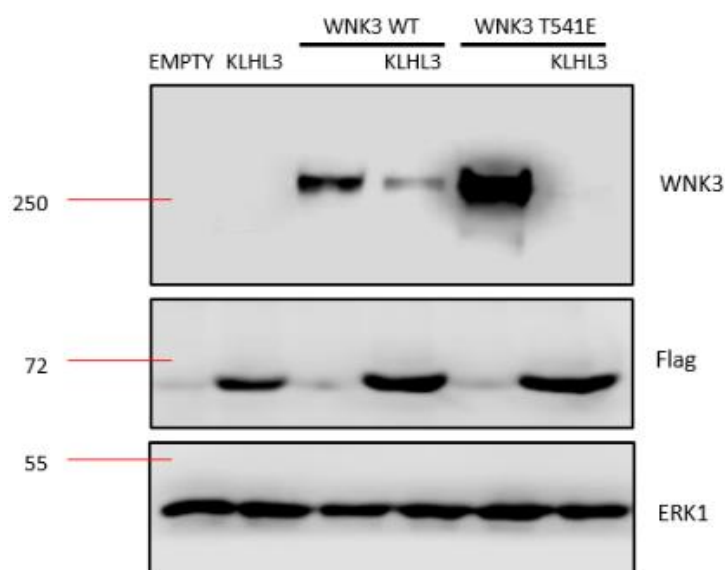


Figura 38. La mutante fosfomimética WNK3 T541E es más afín a la degradación por efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3

Para analizar el efecto de las mutantes WNK3 T541A, WNK3 T541E y WNK4 P561A en el mismo ensayo, se transfectaron células HEK293 con DNA plasmídico de: WNK3 WT, WNK3 T541A, WNK3 T541E, WNK4 WT, WNK4 P561A Y KLHL3 en diferentes combinaciones. Se muestra un WB representativo de proteínas totales obtenidas de 3 co-transfecciones independientes, revelado contra α -WNK3 para WNK3 WT, WNK3 T541A y WNK3 T541E, α -FLAG para WNK4 WT, WNK4 P561A y KLHL3, y α -ERK1 como control de carga (**Figura 39**). Las co-transfecciones en estos experimentos mostraron el mismo comportamiento observado previamente. Estos resultados muestran en resumen, que la ligasa de ubiquitina KLHL3 degrada a las cinasas WNK3 WT, WNK4 WT y la mutante WNK4 P561A de manera similar, que el efecto de KLHL3 sobre la mutante fosfoablativa WNK3 T541A es nulo, y que la mutante fosfomimética WNK3 T541E es la más afín a la degradación por KLHL3.

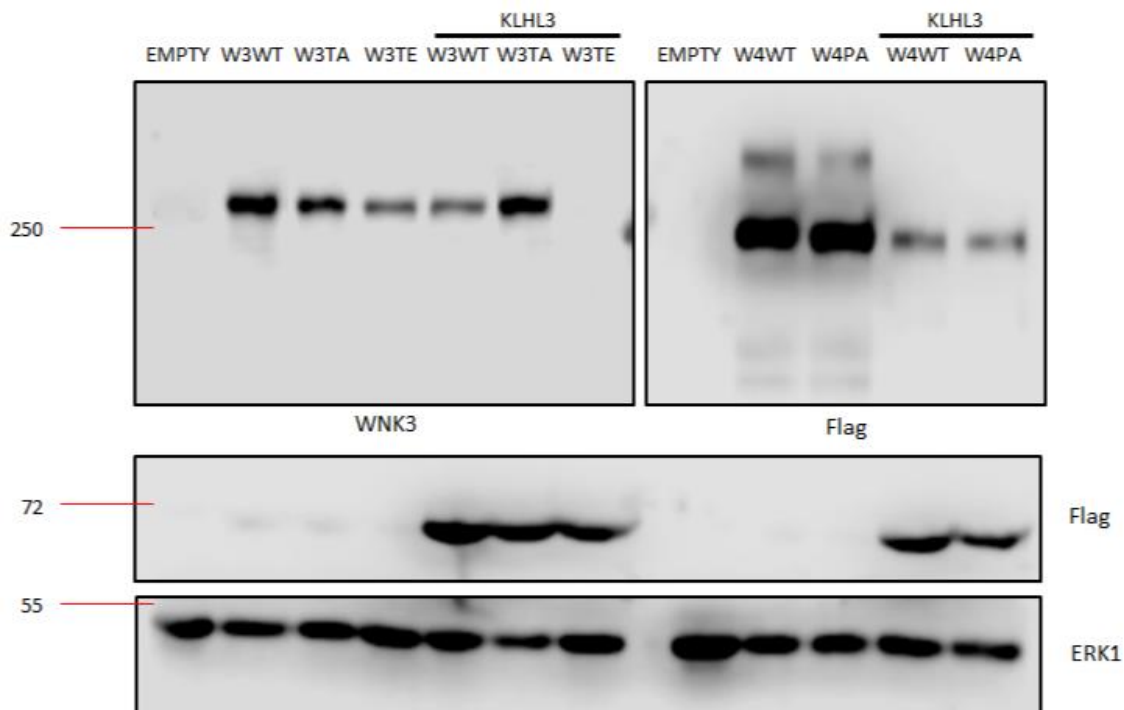


Figura 39. La ligasa de ubiquitina KLHL3 degrada a las mutantes WNK4 P561A y WNK3 T541E, teniendo un efecto más evidente para WNK3 T541E; mientras KLHL3 no tiene efecto sobre la mutante WNK3 T541A.

Con la finalidad de analizar el efecto de las mutantes fosfoablative (WNK3 T541A) y fosfomimética (WNK3 T541E) de la cinasa WNK3 sobre la actividad de NCC, se realizaron experimentos de expresión funcional de NCC mediante la co-inyección diferentes combinaciones de RNAc de: NCC, WNK3 WT, WNK3 T541A, WNK3 T541E y KLHL3 en ovocitos de *X. laevis*.

Se muestra el resultado de 2 experimentos independientes de captación de $^{22}\text{Na}^+$ (**Figura 40**) expresados como porcentaje de actividad de NCC \pm el error estándar, tomando la actividad de NCC sensible a hidrocortiazida como el 100%. La co-inyección de NCC + WNK3 WT (2da barra), NCC + WNK3 T541A (3ra barra) y NCC + WNK3 T541E (4ta barra) aumentan la actividad de NCC a $218 \pm 30\%$, $246 \pm 41\%$ y $221 \pm 47\%$, – respectivamente –, vs $100 \pm 19\%$ en ausencia de WNK3 WT, WNK3 T541A o WNK3 T541E (1ra barra) ($p < 0.001$), exhibiendo el efecto activador de WNK3 sobre NCC. La co-inyección de NCC + WNK3 WT + KLHL3 (5ta barra) disminuyó el efecto de WNK3 sobre la activación de NCC a $105 \pm 24\%$ vs $218 \pm 30\%$ en ausencia de KLHL3 (2da barra) ($p < 0.01$), y regresó la actividad de NCC a valores similares en ausencia de WNK3 (1ra barra) ($p < 0.87$). El efecto inhibitor de KLHL3 se debe a la degradación de la cinasa WNK3, como se observó en los WB previos. La co-inyección de NCC + WNK3 T541A + KLHL3 (6ta barra) no mostró cambios significativos sobre la actividad de NCC al compararse con su control NCC + WNK3 T541A (3ra barra) ($p < 0.76$), demostrando que KLHL3 no tiene efecto sobre la mutante WNK3 T541A y confirmando lo observado en los WB mostrados con anterioridad. La co-inyección de NCC + WNK3 T541E + KLHL3 (7ma barra) eliminó el efecto de WNK3 sobre la activación de NCC a $5 \pm 5\%$ vs $221 \pm 47\%$ en ausencia de KLHL3 (4ta barra) ($p < 0.0001$) y disminuye casi en su totalidad la actividad de NCC a $5 \pm 5\%$ vs $100 \pm 19\%$ en ausencia de WNK3 WT, WNK3 T541A o WNK3 T541E (1ra barra) ($p < 0.0001$). Este resultado apoya fuertemente los hallazgos previos y demuestra que las mutantes WNK3 T541A y WNK3 T541E son funcionales.

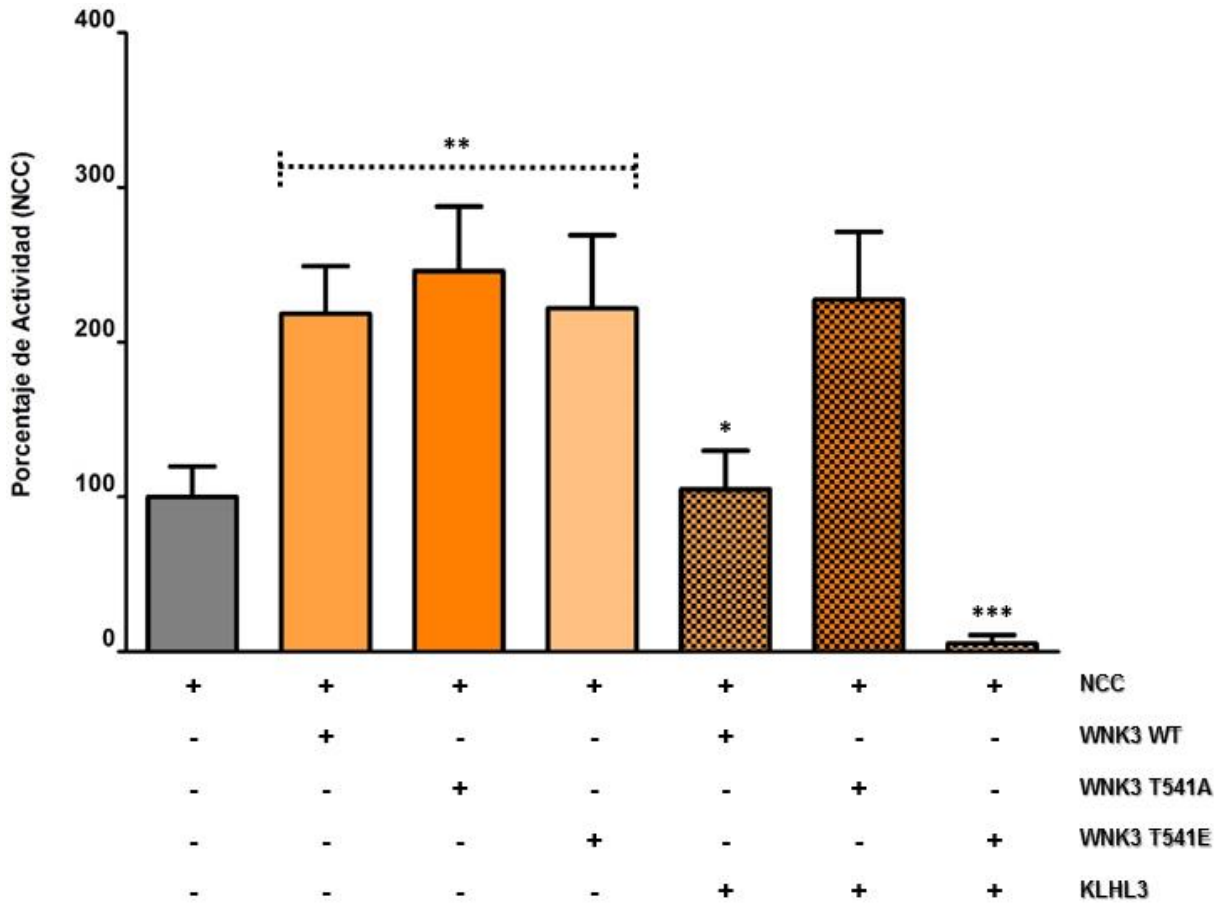


Figura 40. El efecto de la ligasa de ubiquitina KLHL3 es más potente sobre la mutante fosfomimética WNK3 T541E. Gráfica de sensibilidad a tiazidas que muestra el efecto activador de WNK3 WT, WNK3 T541A y WNK3 T541E sobre NCC (2da, 3ra y 4ta barra), el efecto inhibitor de KLHL3 sobre WNK3 WT (5ta barra), el efecto total de KLHL3 sobre WNK3 T541E (7ma barra) y la ausencia del efecto de KLHL3 sobre WNK3 T541A (6ta barra). **p<0.001 vs NCC, *p<0.01 vs NCC + WNK3 WT y ***p<0.0001 vs NCC + WNK3 T541E.

Finalmente, con el fin de corroborar el efecto de KLHL3 observado previamente, se transfectaron células HEK293 con diferentes combinaciones de DNA plasmídico de: WNK3 WT, WNK3 T541A, WNK3 T541E, WNK4 WT, WNK4 P561A, KLHL3 WT y la mutante KLHL3 R528H, la cual es una mutante PHAI1 incapaz de unir a sus sustratos. Se muestra un WB representativo de proteínas totales obtenidas de 2 co-transfecciones independientes, revelado contra α -WNK3 para WNK3 WT, WNK3 T541A y WNK3 T541E, α -FLAG para WNK4 WT, WNK4 P561A, KLHL3 WT y KLHL3 R528H, y α -ERK1 como control de carga (**Figura 41**). Las co-transfecciones en estos experimentos mostraron el mismo comportamiento

observado previamente, pero añaden la ausencia de degradación de WNK3 y sus respectivas mutantes, así como de WNK4 y su respectiva mutante, en presencia de la mutante PHAII KLHL3 R528H. Lo anterior, confirma que el efecto de KLHL3 WT observado previamente es confiable.

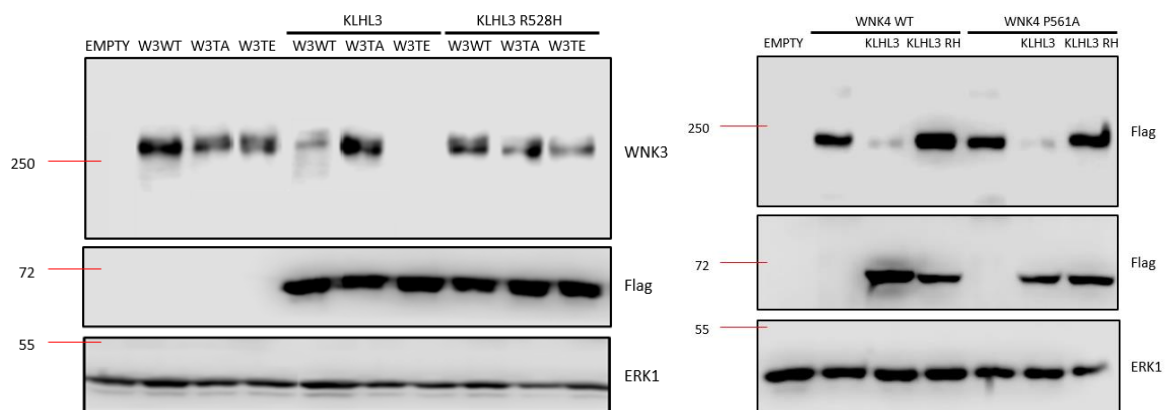


Figura 41. La mutante KLHL3 R528H es incapaz de degradar a las cinasas WNK3 y WNK4, y sus respectivas mutantes.

Discusión

En los últimos años se ha visto que la regulación del co-transportador NCC es un proceso altamente regulado, lo cual resalta la importancia que juega en el mantenimiento de la homeostasis. Los mecanismos a través de los cuales se regula la cascada de señalización WNK-SPAK/OSR1-NCC son complejos, sin embargo, la modulación de las cinasas WNK juega un papel predominante sobre la activación de NCC y sobre la regulación de la reabsorción de sal en la nefrona distal. Los resultados presentados en este trabajo son interesantes, debido a que proponen dos nuevas vías de regulación diferencial para las cinasas WNK1 y WNK3, confirmadas mediante el uso de un modelo funcional de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* y la línea celular HEK293.

Para el caso de WNK1, la evidencia presentada muestra que el efecto activador de WNK1 sobre NCC es inhibido de manera significativa por KLHL3, pero en presencia de SGK1 la activación de NCC por WNK1 se recupera mediante la inhibición del efecto de KLHL3.

Se ha descrito ampliamente que SGK1 inhibe la degradación de ENaC y NCC mediante la inactivación de la ligasa de ubiquitina Nedd4-2, como consecuencia de la fosforilación de su S328^{[25][31][37][41][43][44][45]}. Además existen otros reportes en donde se demostró que WNK1 activa a SGK1 mediante la fosforilación de su Thr256 de forma no dependiente de cinasa, y esto a su vez, conlleva a la inactivación de Nedd4-2^{[126][127][128]}. Ambos mecanismos resultan en el aumento de la expresión en membrana de ENaC y NCC. La diferencia entre los mecanismos anteriores y el propuesto en este trabajo, radica en que en los dos primeros el efecto se explica por la interacción entre SGK1 y la ligasa de ubiquitina Nedd4-2, mientras que en el nuestro, el efecto de SGK1 se debe a la interacción exclusiva con la cinasa WNK1 y no con la ligasa de ubiquitina KLHL3. Estos resultados en conjunto sugieren que los efectos de SGK1 sobre a) la inactivación de Nedd4-2 y b) la inhibición de la degradación de WNK1 por KLHL3, tendrían un efecto sinérgico en promover la retención renal de Na⁺ en la nefrona distal sensible a aldosterona mediante a) el aumento en la expresión de membrana y b) la activación de NCC, respectivamente.

Es importante resaltar que tanto la mutante de WNK1 $\Delta 1$, – que aumenta la expresión de WNK1 WT^[88] –, como las mutantes *missense* del dominio ácido de WNK1, – que probablemente no puedan unirse y degradarse por KLHL3 –, deberían tener como resultado un aumento en la concentración de la cinasa WNK1 en todas las porciones de la nefrona distal y por tanto causar la sobre-activación de NCC y un aumento en la presión arterial causando el fenotipo clásico de PHAI. Sin embargo, existen reportes que han sugerido que el efecto de la mutante PHAI WNK1 $\Delta 1$ no se debe a la sobre-activación por sí misma de NCC, sino que consiste en un efecto indirecto en donde el exceso de WNK1 libera la inhibición que ejerce WNK4 sobre NCC^{[129][130]} y de esta manera, aumenta la activación de NCC y la reabsorción renal de NaCl, generando el fenotipo PHAI.

Por otra parte, también hay evidencia de que WNK1 reduce la expresión en membrana del canal ROMK, – encargado de la excreción de K⁺ en la nefrona distal –, mediante un proceso dependiente de clatrina y causando la endocitosis del mismo^{[131][132]}; sin embargo, el o los mecanismos mediante los cuales la cinasa WNK1 promueve la endocitosis de ROMK son desconocidos.

Los resultados presentados en este trabajo, aunados al hallazgo de que las mutaciones *missense* de WNK1 causan hipercalemia pero no hipertensión y tomando en cuenta los antecedentes mencionados, nos hacen pensar que el rol fisiológico de WNK1 es promover la reabsorción de NaCl en la segunda porción de la nefrona distal. Ya que es en esta porción donde la aldosterona tiene efecto a través de SGK1 y donde la expresión de NCC es mucho menos que en TCD2, la sobre-activación de NCC por WNK1 no causaría hipertensión, al mismo tiempo que la inhibición de ROMK causaría hipercalemia.

De esta manera, las mutaciones *missense* en el dominio ácido de WNK1 incapaces de unirse y degradarse por KLHL3, simularían el efecto fisiológico de la aldosterona - en condiciones de hipovolemia, – en la nefrona distal, donde la estimulación de la secreción de SGK1 impide la degradación de WNK1 por efecto de KLHL3 y aumenta la reabsorción de NaCl.

Desafortunadamente, los efectos opuestos que se atribuyen a la acción de la aldosterona complican el panorama. La paradoja de la aldosterona (como se le conoce comúnmente) consiste en que: a) en condiciones de hipovolemia, la aldosterona promueve la retención renal de Na⁺ sin cambios en la excreción de K⁺, y b) en condiciones de hipercalemia, la aldosterona promueve la excreción de K⁺ sin cambios en la reabsorción renal de Na⁺ [133]. Actualmente se desconocen los mecanismos mediante los cuales, la aldosterona lleva a cabo estas dos funciones simultáneamente.

Los resultados mostrados en este trabajo indican que SGK1 interactúa con WNK1 pero no exploran de qué forma sucede esta interacción ni si existe otra proteína que medie el proceso. Debido a evidencia que muestra que el dominio cinasa de WNK1 no se requiere para la interacción y activación de SGK1, y que los primeros 220 aminoácidos del N-terminal de WNK1 son necesarios y suficientes para llevar a cabo ésta activación^[127], además de un reporte que demostró que SGK1 fosforila a WNK1 en la Thr60^[134]; resulta evidente pensar que este residuo (T60) o alguno otro localizado en el N-terminal de WNK1 son los responsables del efecto observado en nuestro experimentos. Tampoco se analizó cómo es que la interacción entre SGK1 y WNK1 inhibe el efecto de KLHL3. Suponiendo que la interacción entre WNK1 y SGK1 se lleve a cabo a través del N-terminal de WNK1, como se mencionó previamente, el dominio ácido de WNK1 aun quedaría libre para el reconocimiento por KLHL3, a menos que el complejo WNK1-SGK1 por sí mismo impida espacialmente la interacción con KLHL3. Estas dos interrogantes aún deben ser motivo de estudios futuros.

Con respecto a WNK3, nuestros resultados apuntan a que la Thr541 del dominio ácido de esta cinasa es importante para su regulación, indicando que la fosforilación de este sitio particular modula su afinidad por KLHL3.

WNK3 se expresa a lo largo de toda la nefrona y se ha descrito como un potente activador de NCC^[108]; sin embargo, en experimentos en donde se eliminó la expresión de WNK3 en un modelo de ratón knock-out, no se observaron consecuencias aparentes o un fenotipo específico. Más aún, este modelo mostró un aumento en la expresión de la cinasa WNK1

como respuesta compensatoria^[135]. Hasta el momento poco se ha estudiado acerca de las condiciones específicas en las que se requiera activar a NCC mediante WNK3, lo que dificulta un mejor análisis de su regulación.

Lo que sí se sabe es que las cinasas WNK1 y WNK4 responden a cambios en la concentración de Cl⁻ intracelular, mediante un sitio de unión a cloro localizado en su dominio cinasa^[136]. En condiciones de depleción de Cl⁻, el efecto activador de WNK1 sobre NCC se potencia, mientras que WNK4 pasa de tener un efecto inhibitor a un efecto activador potente sobre NCC. Por su parte, WNK3 no muestra cambios con respecto a la activación de NCC en estas condiciones, conservando su efecto basal^[137]. Debido a que todas las isoformas de las cinasas WNK presentan este sitio de unión a Cl⁻, es razonable pensar que todas pueden ser moduladas por la concentración intracelular de este ion pero con diferente afinidad, lo que señala que todas poseen una función específica con respecto a la reabsorción de Na⁺ y Cl⁻.

Otros resultados apuntan a que WNK3 posee funciones más relacionadas con el mantenimiento del volumen celular pero a través de otros procesos. Diferentes trabajos han demostrado que WNK3 co-localiza con los co-transportadores NKCC1 (encargado de la reabsorción de Na⁺, K⁺ y 2Cl⁻, y de la regulación del volumen intracelular) y KCC's (encargados de la excreción de K⁺ y 2Cl⁻) en diversos epitelios incluido el renal^[108]. Estos co-transportadores están fuertemente regulados por la tonicidad extracelular, de tal manera que; en condiciones hipertónicas se activa NKCC1 y se inhibe KCC1, mientras que en condiciones hipotónicas se obtiene el efecto opuesto. Se ha descrito que WNK3 funciona como activador del co-transportador NKCC1 y como inhibidor de los co-transportadores KCC1 y KCC2 al fosforilarlos^{[108][138][139]}, indicando que WNK3 tiene la capacidad de modular los niveles de Cl⁻ intracelular mediante acciones opuestas sobre las vías de salida y entrada de este ion a la célula. Tomando en cuenta que el mecanismo predominante mediante el cual se mantiene el volumen intracelular en las células epiteliales como respuesta a cambios en la tonicidad extracelular, es el aumento o disminución de la concentración de Cl⁻ intracelular, se cree que WNK3 es parte importante del mecanismo sensor de Cl⁻/volumen necesario para el mantenimiento del volumen durante estrés osmótico.

Otros estudios realizados en aorta y células de músculo vascular liso de ratón, muestran que WNK3 se relaciona con la activación de NKCC1 en este epitelio y causa vasoconstricción generalizada por efecto de la AngII^[140]. En células de músculo vascular liso, NKCC1 juega un papel esencial en la regulación del tono vascular^{[141][142]}. Experimentos posteriores; demostraron que KLHL3 no se expresa en éste epitelio, pero sí KLHL2 (el homólogo más cercano a KLHL3) y funciona como el mayor regulador de WNK3. Debido a que la activación del eje RAA es el componente central en la regulación de la presión arterial, la presencia de AngII promueve la auto-degradación de KLHL2, y de esta forma aumentan los niveles de WNK3 que permiten la fosforilación y activación de NKCC1, y el consecuente aumento del tono vascular^[143]; de tal manera que la activación de NKCC1 por WNK3 sucede en condiciones donde la RPT y la TA disminuyen.

La importancia de la Thr451 del dominio ácido de WNK3 radica en que es única para esta variante y en que se encuentra altamente conservada entre especies, lo que indica que debe tener un rol fisiológico importante. Tomando en cuenta los reportes previos, sería interesante analizar el efecto de las mutantes fosfoablative y fosfomimética (creadas en éste trabajo) con respecto a la interacción con KLHL2 en células de músculo vascular liso y observar si se presenta los mismos cambios en la afinidad por ésta ligasa de ubiquitina. Tal vez; la fosforilación de la Thr541 sólo suceda en la nefrona distal para regular el efecto de KLHL3, y de esta manera modular sutilmente a NCC y no a otros co-transportadores como NKCC1 y KCC's, lo cual reiteraría la importancia de nuestros resultados y esclarecería un poco el panorama con respecto a la regulación de NCC por WNK3.

Con respecto a la fosforilación de la Thr541 se suponen tres escenarios: a) que la fosforilación de la Thr541 del dominio ácido de WNK3 tenga lugar para aumentar su degradación por KLHL3 como respuesta a una condición en la que se requiera disminuir la actividad de NCC y por ende, la reabsorción de NaCl, b) que la fosforilación del dominio ácido de WNK3 suceda en condiciones en las que se requiera inhibir el efecto de WNK3 y permitir la actividad exclusiva de otra cinasa WNK, o c) que en condiciones normales la Thr541 de WNK3 esté fosforilada y que en presencia de algún estímulo específico, se defosforile, provocando un aumento en la reabsorción de NaCl por NCC. Todas estas

suposiciones deben ser analizadas para poder llegar a un mejor entendimiento del fenómeno observado.

Nuestro trabajo propone que la fosforilación del dominio ácido de WNK3 altera su afinidad por KLHL3, aumentándola; sin embargo, no se analizó cuál o cuáles pueden ser los efectores de ésta fosforilación; y tampoco se realizaron estudios *in vivo* que serían esenciales para comprobar si el efecto observado sucede en condiciones fisiológicas. También resulta tentador especular que WNK3 por sí mismo pueda regularse a través de modificaciones post-traduccionales que cambien su afinidad por KLHL3 y a su vez se promueva o inhiba la activación de sus blancos.

Dos antecedentes mencionados proponen que la AngII regula a las ligasas de ubiquitina KLHL2 y KLHL3. En células de músculo vascular liso la AngII promueve la auto-degradación de KLHL2, mientras que en la nefrona distal la AngII fosforila a KLHL3 a través de la PKC. Ambos mecanismos tienen el mismo efecto final: impedir la unión y degradación de cualquiera de sus sustratos, de tal forma que el aumento intracelular de todas las cinasas (WNK1, WNK3 y WNK4) asegura la activación de NKCC1 o NCC, – según sea el caso –, y por tanto, aumenta la reabsorción de Na⁺ y Cl⁻.

A diferencia del efecto general de la AngII sobre la regulación de todas las cinasas WNK, nuestros resultados proponen dos nuevas vías de regulación diferencial para WNK1 y WNK3, que apoyan la idea de que la presencia de distintas isoformas que funcionan como activadoras de NCC deben poseer diferentes mecanismos de regulación que respondan a condiciones fisiológicas diferentes.

Para WNK1 se propone que: el efecto de la aldosterona a través de SGK1, responde a la necesidad de aumentar la reabsorción de NaCl únicamente en la segunda porción de la nefrona distal mediante la inhibición exclusiva de la degradación de WNK1 por KLHL3. Para WNK3 se propone que: el estado de fosforilación de la Thr541 del dominio ácido de WNK3 (única para ésta isoforma) modula su afinidad y degradación por KLHL3.

En ambos casos, el resultado sería el aumento específico de la cinasa en cuestión y por tanto, la activación sutil y altamente regulada de NCC.

Conclusiones

Con base en los resultados presentados en este trabajo, podemos proponer dos esquemas funcionales pero aún incompletos de la regulación de NCC por las cinasas WNK1 y WNK3. Los mecanismos exactos aún quedan pendientes de elucidar.

Regulación de WNK1 por SGK1 en TCD2 (Figura 42). En condiciones normales, KLHL3 ubiquitina y degrada a WNK1 a través de la interacción con su dominio cinasa, previniendo la activación de la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC y disminuyendo la actividad de NCC. En la nefrona distal sensible a aldosterona (TCD2), la presencia de aldosterona promueve la síntesis de SGK1 que interactúa con WNK1 por un mecanismo aún desconocido e impide su reconocimiento y degradación por KLHL3, ocasionando la activación de la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC y aumentando la actividad de NCC.

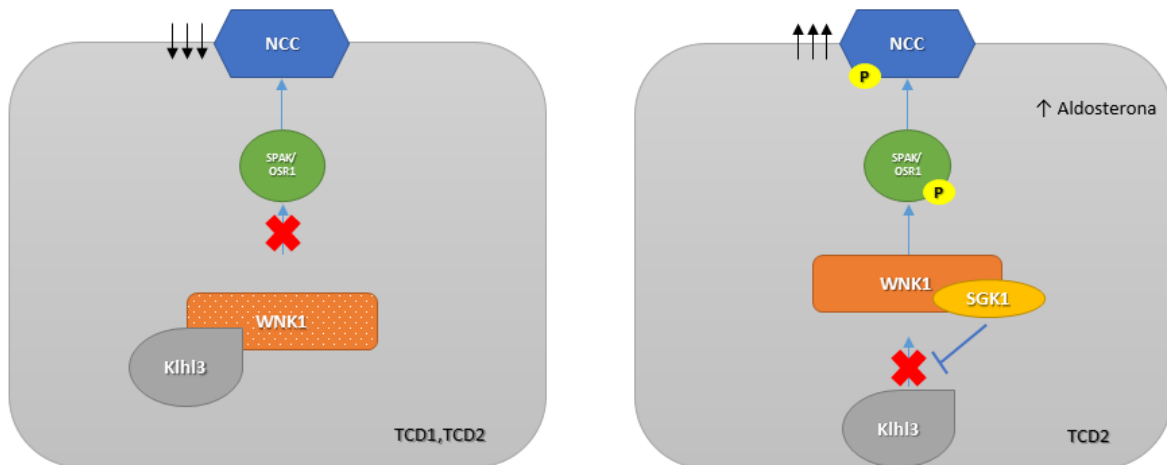


Figura 42. Regulación de WNK1 por SGK1 en TCD2.

La fosforilación de la Thr541 del dominio ácido de WNK3 modula su afinidad por KLHL3 (Figura 43). Bajo un estímulo específico desconocido, la Thr541 del dominio ácido de WNK3 se fosforila y aumenta su afinidad de unión y degradación por KLHL3, previniendo la activación de la vía WNK-SPAK/OSR1-NCC y disminuyendo la actividad de NCC.

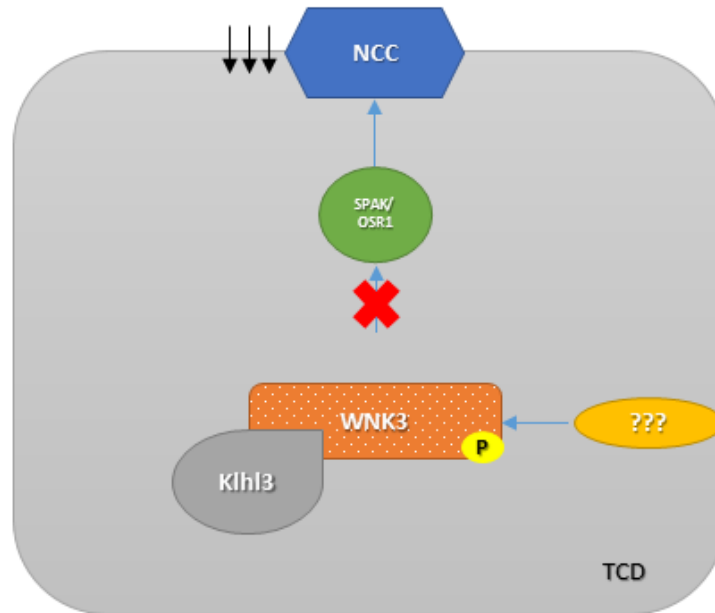


Figura 43. La fosforilación de la Thr541 del dominio ácido de WNK3 modula su afinidad por KLHL3.

Perspectivas

Los resultados presentados en este trabajo, acerca de la regulación específica de las cinasas WNK1 y WNK3, son prometedores y sirven como preámbulo para estudios posteriores que lleven a un entendimiento más profundo y completo de su funcionamiento.

Con respecto al efecto de SGK1 sobre WNK1, es necesario realizar estudios que clarifiquen la manera en que interactúan estas dos proteínas, ya sea por motivos de aminoácidos o por una proteína adaptadora que media la interacción. Se propone como primer paso, analizar la Thr60 del N-terminal de WNK1 como sitio de fosforilación de SGK1 mediante la creación de las mutantes T60A y T60D/E, para estudiar el efecto sobre la interacción con KLHL3 y posteriormente, si los resultados son positivos, analizar el estado de fosforilación de este sitio en un modelo *in vivo* mediante el empleo de fosfo-anticuerpos específicos.

Para el caso de WNK3, se propone la creación de la mutante WNK4 P561E para analizar si la fosforilación de este sitio posee el mismo efecto en otra cinasa, lo cual corroboraría lo observado en el caso de WNK3. Adicionalmente, es necesario estudiar la fosforilación de la Thr541 de WNK3 en modelos *in vivo* de ratón knock-out de KLHL3 mediante la utilización de fosfo-anticuerpos específicos. El ratón knock-out de KLHL3 permitiría observar a WNK3 fosforilada, de lo contrario, la degradación de WNK3 por KLHL3 impediría su detección; y finalmente, analizar cuál podría ser la molécula efectora que fosforila a WNK3 y explique su función fisiológica.

Referencias

- [1] J. A. Kumar V., Abul K., Abbas, Nelson Fausto, "Hipertensive vascular disease," in *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th ed., Saunders (Elsevier), 2009.
- [2] C. K. Dreisbach Albert W, Sat Sharma, *Nephrology: Hypertension and the kidney*. 2010.
- [3] M. Katori and M. Majima, "A missing link between a high salt intake and blood pressure increase.," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 100, no. 5, pp. 370–90, Jan. 2006.
- [4] "Anatomía de los Riñones," *Anatomía 2013*. .
- [5] B. W. Boulpaep EL, *Medical Physiology Cellular and Molecular Approach*. Saunders (Elsevier), 2009.
- [6] G. A. Hall JE, *Textbook of Medical Physiology*. Saunders (Elsevier), 2009.
- [7] R. F. Reilly and D. H. Ellison, "Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy.," *Physiol. Rev.*, vol. 80, no. 1, pp. 277–313, Jan. 2000.
- [8] H. L. Biner, M.-P. Arpin-Bott, J. Loffing, X. Wang, M. Knepper, S. C. Hebert, and B. Kaissling, "Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 13, no. 4, pp. 836–47, Apr. 2002.
- [9] J. Loffing, D. Loffing-Cueni, V. Valderrabano, L. Kläusli, S. C. Hebert, B. C. Rossier, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, and B. Kaissling, "Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 281, no. 6, pp. F1021–7, Dec. 2001.
- [10] J. Loffing and B. Kaissling, "Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 284, no. 4, pp. F628–43, Apr. 2003.
- [11] P. Meneton, J. Loffing, and D. G. Warnock, "Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 287, no. 4, pp. F593–601, Oct. 2004.
- [12] N. B. Pedersen, M. V Hofmeister, L. L. Rosenbaek, J. Nielsen, and R. A. Fenton, "Vasopressin induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter in the distal convoluted tubule.," *Kidney Int.*, vol. 78, no. 2, pp. 160–9, Jul. 2010.
- [13] K. Mutig, T. Saritas, S. Uchida, T. Kahl, T. Borowski, A. Paliege, A. Böhlick, M. Bleich, Q. Shan, and S. Bachmann, "Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by

vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 298, no. 3, pp. F502–9, Mar. 2010.

- [14] H. Kobori, M. Nangaku, L. G. Navar, and A. Nishiyama, "The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 251–87, Sep. 2007.
- [15] A. C. Guyton, "Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids.," *Science*, vol. 252, no. 5014, pp. 1813–6, Jun. 1991.
- [16] J. E. Hall, A. C. Guyton, M. J. Smith, and T. G. Coleman, "Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role of angiotensin.," *Am. J. Physiol.*, vol. 239, no. 3, pp. F271–80, Sep. 1980.
- [17] T. M. Coffman and S. D. Crowley, "Kidney in hypertension: guyton redux.," *Hypertension*, vol. 51, no. 4, pp. 811–6, Apr. 2008.
- [18] M. Huang, R. L. Hester, T. G. Coleman, M. J. Smith, and A. C. Guyton, "Development of hypertension in animals with reduced total peripheral resistance.," *Hypertension*, vol. 20, no. 6, pp. 828–33, Dec. 1992.
- [19] M. E. Olsen, J. E. Hall, J. P. Montani, A. C. Guyton, H. G. Langford, and J. E. Cornell, "Mechanisms of angiotensin II natriuresis and antinatriuresis.," *Am. J. Physiol.*, vol. 249, no. 2 Pt 2, pp. F299–307, Aug. 1985.
- [20] R. E. Booth, J. P. Johnson, and J. D. Stockand, "Aldosterone.," *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 26, no. 1–4, pp. 8–20, Dec. 2002.
- [21] K. K. Griendling, T. J. Murphy, and R. W. Alexander, "Molecular biology of the renin-angiotensin system.," *Circulation*, vol. 87, no. 6, pp. 1816–28, Jun. 1993.
- [22] A. C. Simões e Silva and J. T. Flynn, "The renin–angiotensin–aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 27, no. 10, pp. 1835–1845, Sep. 2011.
- [23] I. A. Reid, "The renin-angiotensin system and body function.," *Arch. Intern. Med.*, vol. 145, no. 8, pp. 1475–9, Aug. 1985.
- [24] R. N. Re, "The renin-angiotensin systems.," *Med. Clin. North Am.*, vol. 71, no. 5, pp. 877–95, Sep. 1987.
- [25] S. Y. Chen, A. Bhargava, L. Mastroberardino, O. C. Meijer, J. Wang, P. Buse, G. L. Firestone, F. Verrey, and D. Pearce, "Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 5, pp. 2514–9, Mar. 1999.
- [26] J. W. Funder, "The nongenomic actions of aldosterone.," *Endocr. Rev.*, vol. 26, no. 3, pp. 313–21, May 2005.

- [27] G. G., "Aldosterone," in *Endocrine Regulation of Water and Electrolyte Balance*, HM Goodman., Oxford University Press, 2000, pp. 156–227.
- [28] F. Verrey, "Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport.," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 3 Pt 2, pp. F319–27, Sep. 1999.
- [29] M. Wehling, "Specific, nongenomic actions of steroid hormones.," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 59, pp. 365–93, Jan. 1997.
- [30] F. Verrey, "Early aldosterone effects.," *Exp. Nephrol.*, vol. 6, no. 4, pp. 294–301, Jan. .
- [31] J. Loffing, M. Zecevic, E. Féraille, B. Kaissling, C. Asher, B. C. Rossier, G. L. Firestone, D. Pearce, and F. Verrey, "Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 280, no. 4, pp. F675–82, Apr. 2001.
- [32] J. W. Funder, P. T. Pearce, R. Smith, and A. I. Smith, "Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated.," *Science*, vol. 242, no. 4878, pp. 583–5, Oct. 1988.
- [33] S. Kenouch, N. Alfaidy, J. P. Bonvalet, and N. Farman, "Expression of 11 beta-OHSD along the nephron of mammals and humans.," *Steroids*, vol. 59, no. 2, pp. 100–4, Feb. 1994.
- [34] J. P. Bonvalet, I. Doignon, M. Blot-Chabaud, P. Pradelles, and N. Farman, "Distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase along the rabbit nephron.," *J. Clin. Invest.*, vol. 86, no. 3, pp. 832–7, Sep. 1990.
- [35] M. Bostanjoglo, W. B. Reeves, R. F. Reilly, H. Velázquez, N. Robertson, G. Litwack, P. Morsing, J. Dørup, S. Bachmann, D. H. Ellison, and M. Bostonjoglo, "11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor, and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 9, no. 8, pp. 1347–58, Aug. 1998.
- [36] B. Spindler and F. Verrey, "Aldosterone action: induction of p21(ras) and fra-2 and transcription-independent decrease in myc, jun, and fos.," *Am. J. Physiol.*, vol. 276, no. 5 Pt 1, pp. C1154–61, May 1999.
- [37] S. Masilamani, G. H. Kim, C. Mitchell, J. B. Wade, and M. A. Knepper, "Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney.," *J. Clin. Invest.*, vol. 104, no. 7, pp. R19–23, Oct. 1999.
- [38] A. Náray-Fejes-Tóth, C. Canessa, E. S. Cleaveland, G. Aldrich, and G. Fejes-Tóth, "sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na⁺ channels.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 24, pp. 16973–8, Jun. 1999.
- [39] J. P. Arroyo, D. Lagnaz, C. Ronzaud, N. Vázquez, B. S. Ko, L. Moddes, D. Ruffieux-Daidié, P. Hausel, R. Koesters, B. Yang, J. B. Stokes, R. S. Hoover, G. Gamba, and O. Staub, "Nedd4-2

modulates renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter via the aldosterone-SGK1-Nedd4-2 pathway.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 22, no. 9, pp. 1707–19, Sep. 2011.

- [40] H. Abriel, J. Loffing, J. F. Rebhun, J. H. Pratt, L. Schild, J. D. Horisberger, D. Rotin, and O. Staub, "Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome.," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 5, pp. 667–73, Mar. 1999.
- [41] J. G. Abdallah, R. W. Schrier, C. Edelstein, S. D. Jennings, B. Wyse, and D. H. Ellison, "Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive Na(+)/Cl(-)-cotransporter abundance: role of aldosterone.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 12, no. 7, pp. 1335–41, Jul. 2001.
- [42] H. Abriel and O. Staub, "Ubiquitylation of ion channels.," *Physiology (Bethesda)*, vol. 20, pp. 398–407, Dec. 2005.
- [43] O. Staub and D. Rotin, "Role of ubiquitylation in cellular membrane transport.," *Physiol. Rev.*, vol. 86, no. 2, pp. 669–707, Apr. 2006.
- [44] G. Moreno, A. Merino, A. Mercado, J. P. Herrera, J. González-Salazar, R. Correa-Rotter, S. C. Hebert, and G. Gamba, "Electroneutral Na-coupled cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism.," *Hypertension*, vol. 31, no. 4, pp. 1002–6, Apr. 1998.
- [45] H. Wald, O. Goldstein, C. Asher, Y. Yagil, and H. Garty, "Aldosterone induction and epithelial distribution of CHIF.," *Am. J. Physiol.*, vol. 271, no. 2 Pt 2, pp. F322–9, Aug. 1996.
- [46] D. J. Rozansky, "The role of aldosterone in renal sodium transport.," *Semin. Nephrol.*, vol. 26, no. 2, pp. 173–81, Mar. 2006.
- [47] G. Gamba, A. Miyanoshita, M. Lombardi, J. Lytton, W. S. Lee, M. A. Hediger, and S. C. Hebert, "Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 26, pp. 17713–22, Jul. 1994.
- [48] G. Gamba, "Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters.," *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 2, pp. 423–493, 2005.
- [49] J. C. Xu, C. Lytle, T. T. Zhu, J. A. Payne, E. Benz, and B. Forbush, "Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 6, pp. 2201–5, Mar. 1994.
- [50] E. Delpire, M. I. Rauchman, D. R. Beier, S. C. Hebert, and S. R. Gullans, "Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 41, pp. 25677–83, Oct. 1994.
- [51] G. Gamba, S. N. Saltzberg, M. Lombardi, A. Miyanoshita, J. Lytton, M. A. Hediger, B. M. Brenner, and S. C. Hebert, "Primary structure and functional expression of a cDNA encoding

the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 7, pp. 2749–53, Apr. 1993.

- [52] D. B. Simon, C. Nelson-Williams, M. J. Bia, D. Ellison, F. E. Karet, A. M. Molina, I. Vaara, F. Iwata, H. M. Cushner, M. Koolen, F. J. Gainza, H. J. Gitleman, and R. P. Lifton, "Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter.," *Nat. Genet.*, vol. 12, no. 1, pp. 24–30, Jan. 1996.
- [53] N. C. Adragna, M. Di Fulvio, and P. K. Lauf, "Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes.," *J. Membr. Biol.*, vol. 201, no. 3, pp. 109–37, Oct. 2004.
- [54] N. C. Adragna, C. M. Ferrell, J. Zhang, M. Di Fulvio, C. F. Temprana, A. Sharma, R. E. W. Fyffe, D. R. Cool, and P. K. Lauf, "Signal transduction mechanisms of K+-Cl- cotransport regulation and relationship to disease.," *Acta Physiol. (Oxf)*, vol. 187, no. 1–2, pp. 125–39, Jan. .
- [55] C. M. Gillen, S. Brill, J. A. Payne, and B. Forbush, "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.*, vol. 271, no. 27, pp. 16237–44, Jul. 1996.
- [56] J. A. Payne, "Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K+]o regulation.," *Am. J. Physiol.*, vol. 273, no. 5 Pt 1, pp. C1516–25, Nov. 1997.
- [57] D. B. Mount, A. Mercado, L. Song, J. Xu, A. L. George, E. Delpire, and G. Gamba, "Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 23, pp. 16355–62, Jun. 1999.
- [58] J. Kyte and R. F. Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.," *J. Mol. Biol.*, vol. 157, no. 1, pp. 105–32, May 1982.
- [59] C. De Rouffignac, A. Di Stefano, M. Wittner, N. Roinel, and J. M. Elalouf, "Consequences of differential effects of ADH and other peptide hormones on thick ascending limb of mammalian kidney.," *Am. J. Physiol.*, vol. 260, no. 6 Pt 2, pp. R1023–35, Jun. 1991.
- [60] R. Gunaratne, D. W. W. Braucht, M. M. Rinschen, C.-L. Chou, J. D. Hoffert, T. Pisitkun, and M. A. Knepper, "Quantitative phosphoproteomic analysis reveals cAMP/vasopressin-dependent signaling pathways in native renal thick ascending limb cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 35, pp. 15653–15658, Aug. 2010.
- [61] H. Dimke, A. Flyvbjerg, S. Bourgeois, K. Thomsen, J. Frøkiaer, P. Houillier, S. Nielsen, and S. Frische, "Acute growth hormone administration induces antidiuretic and antinatriuretic effects and increases phosphorylation of NKCC2.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 292, no. 2, pp. F723–35, Feb. 2007.
- [62] M. B. Sandberg, A. D. M. Riquier, K. Pihakaski-Maunsbach, A. A. McDonough, and A. B. Maunsbach, "ANG II provokes acute trafficking of distal tubule Na+-Cl(-) cotransporter to apical membrane.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 293, no. 3, pp. F662–9, Sep. 2007.

- [63] P. San-Cristobal, D. Pacheco-Alvarez, C. Richardson, A. M. Ring, N. Vazquez, F. H. Rafiqi, D. Chari, K. T. Kahle, Q. Leng, N. A. Bobadilla, S. C. Hebert, D. R. Alessi, R. P. Lifton, and G. Gamba, "Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 11, pp. 4384–9, Mar. 2009.
- [64] N. van der Lubbe, C. H. Lim, R. A. Fenton, M. E. Meima, A. H. Jan Danser, R. Zietse, and E. J. Hoorn, "Angiotensin II induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter independent of aldosterone.," *Kidney Int.*, vol. 79, no. 1, pp. 66–76, Jan. 2011.
- [65] G. H. Kim, S. Masilamani, R. Turner, C. Mitchell, J. B. Wade, and M. A. Knepper, "The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 24, pp. 14552–7, Nov. 1998.
- [66] G. Gamba, "The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 297, no. 4, pp. F838–48, Oct. 2009.
- [67] J. L. Renfro, "Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*.," *Am. J. Physiol.*, vol. 228, no. 1, pp. 52–61, Jan. 1975.
- [68] J. L. Renfro, "Interdependence of Active Na⁺ and Cl⁻ transport by the isolated urinary bladder of the teleost, *Pseudopleuronectes americanus*.," *J. Exp. Zool.*, vol. 199, no. 3, pp. 383–90, Mar. 1977.
- [69] J. B. Stokes, "Sodium chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system.," *J. Clin. Invest.*, vol. 74, no. 1, pp. 7–16, Jul. 1984.
- [70] J. M. Tran, M. A. Farrell, and D. D. Fanestil, "Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane.," *Am. J. Physiol.*, vol. 258, no. 4 Pt 2, pp. F908–15, Apr. 1990.
- [71] L. K. Miller RR, Bardach JE, *Ichthyology*. New York Willey, 1962.
- [72] S. Kunchaparty, M. Palcso, J. Berkman, H. Velázquez, G. V Desir, P. Bernstein, R. F. Reilly, and D. H. Ellison, "Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome.," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 4 Pt 2, pp. F643–9, Oct. 1999.
- [73] N. Mastroianni, M. De Fusco, M. Zollo, G. Arrigo, O. Zuffardi, A. Bettinelli, A. Ballabio, and G. Casari, "Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3).," *Genomics*, vol. 35, no. 3, pp. 486–93, Aug. 1996.

- [74] S. Bachmann, M. Bostanjoglo, R. Schmitt, and D. H. Ellison, "Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects.," *Anat. Embryol. (Berl.)*, vol. 200, no. 5, pp. 447–68, Nov. 1999.
- [75] H. Belge, P. Gailly, B. Schwaller, J. Loffing, H. Debaix, E. Riveira-Munoz, R. Beauwens, J.-P. Devogelaer, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, and O. Devuyst, "Renal expression of parvalbumin is critical for NaCl handling and response to diuretics.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 37, pp. 14849–54, Sep. 2007.
- [76] S. Bachmann, H. Velázquez, N. Obermüller, R. F. Reilly, D. Moser, and D. H. Ellison, "Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells.," *J. Clin. Invest.*, vol. 96, no. 5, pp. 2510–4, Nov. 1995.
- [77] V. Câmpean, J. Kricke, D. Ellison, F. C. Luft, and S. Bachmann, "Localization of thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransport and associated gene products in mouse DCT.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 281, no. 6, pp. F1028–35, Dec. 2001.
- [78] H. J. Gitelman, J. B. Graham, and L. G. Welt, "A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia.," *Trans. Assoc. Am. Physicians*, vol. 79, pp. 221–35, Jan. 1966.
- [79] D. B. Simon and R. P. Lifton, "The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes.," *Am. J. Physiol.*, vol. 271, no. 5 Pt 2, pp. F961–6, Nov. 1996.
- [80] P. J. Schultheis, J. N. Lorenz, P. Meneton, M. L. Nieman, T. M. Riddle, M. Flagella, J. J. Duffy, T. Doetschman, M. L. Miller, and G. E. Shull, "Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺-Cl⁻ cotransporter of the distal convoluted tubule.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 44, pp. 29150–5, Oct. 1998.
- [81] S.-S. Yang, Y.-F. Lo, I.-S. Yu, S.-W. Lin, T.-H. Chang, Y.-J. Hsu, T.-K. Chao, H.-K. Sytwu, S. Uchida, S. Sasaki, and S.-H. Lin, "Generation and analysis of the thiazide-sensitive Na⁺ -Cl⁻ cotransporter (Ncc/Slc12a3) Ser707X knockin mouse as a model of Gitelman syndrome.," *Hum. Mutat.*, vol. 31, no. 12, pp. 1304–15, Dec. 2010.
- [82] C. A. Roccella EJ, Wright JT Jr., Opadil S, Matterson BJ, Johns DW, Izzo JL Jr., Green LA, Cushman WC, Black HR, Bakris GL, "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure - PubMed - NCBI," *JNC 7 Rep.*, vol. 289, pp. 2560–71, 2003.
- [83] R. D. Gordon and G. P. Hodsmen, "The syndrome of hypertension and hyperkalemia without renal failure: long term correction by thiazide diuretic.," *Scott. Med. J.*, vol. 31, no. 1, pp. 43–4, Jan. 1986.
- [84] R. D. Gordon, "Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate.," *Hypertension*, vol. 8, no. 2, pp. 93–102, Feb. 1986.

- [85] S. A. Klemm, R. D. Gordon, T. J. Tunny, and W. L. Finn, "Biochemical correction in the syndrome of hypertension and hyperkalaemia by severe dietary salt restriction suggests renin-aldosterone suppression critical in pathophysiology.," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 191–5, Mar. 1990.
- [86] H. Mayan, I. Vered, M. Mouallem, M. Tzadok-Witkon, R. Pauzner, and Z. Farfel, "Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 7, pp. 3248–54, Jul. 2002.
- [87] S. D. Lifton R P, Tucci J, Bia M, Ellison D, Farfel Z, "Examination of the thiazide-sensitive Na-Cl co-transporter as a candidate gene in Gordon's syndrome," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 6, no. 632, 1995.
- [88] F. H. Wilson, S. Disse-Nicodème, K. A. Choate, K. Ishikawa, C. Nelson-Williams, I. Desitter, M. Gunel, D. V Milford, G. W. Lipkin, J. M. Achard, M. P. Feely, B. Dussol, Y. Berland, R. J. Unwin, H. Mayan, D. B. Simon, Z. Farfel, X. Jeunemaitre, and R. P. Lifton, "Human hypertension caused by mutations in WNK kinases.," *Science*, vol. 293, no. 5532, pp. 1107–12, Aug. 2001.
- [89] T. Moriguchi, S. Urushiyama, N. Hisamoto, S. Iemura, S. Uchida, T. Natsume, K. Matsumoto, and H. Shibuya, "WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 52, pp. 42685–93, Dec. 2005.
- [90] A. C. Vitari, M. Deak, N. A. Morrice, and D. R. Alessi, "The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases," *Biochem. J.*, vol. 391, no. 1, p. 17, Oct. 2005.
- [91] D. Pacheco-Alvarez, P. S. Cristobal, P. Meade, E. Moreno, N. Vazquez, E. Munoz, A. Diaz, M. E. Juarez, I. Gimenez, and G. Gamba, "The Na⁺:Cl⁻ Cotransporter Is Activated and Phosphorylated at the Amino-terminal Domain upon Intracellular Chloride Depletion," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 39, pp. 28755–28763, Aug. 2006.
- [92] S. Uchida, E. Sohara, T. Rai, and S. Sasaki, "Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins.," *Biol. Cell*, vol. 106, no. 2, pp. 45–56, Feb. 2014.
- [93] L. Boyden, M. Choi, K. Choate, C. Nelson-Williams, A. Farhi, H. Toka, I. Tikhonova, R. Bjornson, S. Mane, G. Colussi, M. Lebel, R. Gordon, B. Semmekrot, A. Poujol, M. Välimäki, M. De Ferrari, S. Sanjad, M. Gutkin, F. Karet, Tucci, Stockigt, K. Keppler-Noreuil, C. Porter, S. Anand, M. Whiteford, I. Davis, S. Dewar, A. Bettinelli, J. Fadrowski, C. Belsha, T. Hunley, R. Nelson, H. Trachtman, T. Cole, M. Pinsk, D. Bockenhauer, M. Shenoy, P. Vaidyanathan, J. Foreman, M. Rasoulpour, F. Thameem, H. Al-Shahrouri, J. Radhakrishnan, A. Gharavi, B. Goilav, and R. Lifton, "Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, pp. 1–6, 2012.
- [94] H. Louis-Dit-Picard, J. Barc, D. Trujillano, S. Miserey-Lenkei, N. Bouatia-Naji, O. Pylypenko, G. Beaurain, A. Bonnefond, O. Sand, C. Simian, E. Vidal-Petiot, C. Soukaseum, C. Mandet, F. Broux, O. Chabre, M. Delahousse, V. Esnault, B. Fiquet, P. Houillier, C. I. Bagnis, J. Koenig, M.

- Konrad, P. Landais, C. Mourani, P. Niaudet, V. Probst, C. Thauvin, R. J. Unwin, S. D. Soroka, G. Ehret, S. Ossowski, M. Caulfield, P. Bruneval, X. Estivill, P. Froguel, J. Hadchouel, J.-J. Schott, and X. Jeunemaitre, "KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron," *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 4, pp. 456–60, S1–3, Apr. 2012.
- [95] S. Shibata, J. Zhang, J. Puthumana, K. L. Stone, and R. P. Lifton, "Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 19, pp. 7838–43, May 2013.
- [96] A. Ohta, F.-R. Schumacher, Y. Mehellou, C. Johnson, A. Knebel, T. J. Macartney, N. T. Wood, D. R. Alessi, and T. Kurz, "The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms: disease-causing mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction.," *Biochem. J.*, vol. 451, no. 1, pp. 111–22, 2013.
- [97] M. Wakabayashi, T. Mori, K. Isobe, E. Sohara, K. Susa, Y. Araki, M. Chiga, E. Kikuchi, N. Nomura, Y. Mori, H. Matsuo, T. Murata, S. Nomura, T. Asano, H. Kawaguchi, S. Nonoyama, T. Rai, S. Sasaki, and S. Uchida, "Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension," *Cell Rep.*, vol. 3, no. 3, pp. 858–868, 2013.
- [98] Y. Mori, M. Wakabayashi, T. Mori, Y. Araki, E. Sohara, T. Rai, S. Sasaki, and S. Uchida, "Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 439, no. 1, pp. 30–4, Sep. 2013.
- [99] G. Wu and J. Bin Peng, "Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation," *FEBS Lett.*, vol. 587, no. 12, pp. 1717–1722, 2013.
- [100] K. Susa, E. Sohara, T. Rai, M. Zeniya, Y. Mori, T. Mori, M. Chiga, N. Nomura, H. Nishida, D. Takahashi, K. Isobe, Y. Inoue, K. Takeishi, N. Takeda, S. Sasaki, and S. Uchida, "Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice.," *Human molecular genetics*. 2014.
- [101] B. Xu, J. M. English, J. L. Wilsbacher, S. Stippec, E. J. Goldsmith, and M. H. Cobb, "WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 16795–801, Jun. 2000.
- [102] J. A. McCormick and D. H. Ellison, "The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions.," *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 1, pp. 177–219, Jan. 2011.
- [103] P. San-Cristobal, P. de los Heros, J. Ponce-Coria, E. Moreno, and G. Gamba, "WNK Kinases, Renal Ion Transport and Hypertension," *Am. J. Nephrol.*, vol. 28, no. 5, pp. 860–870, Jan. 2008.
- [104] K. A. Choate, K. T. Kahle, F. H. Wilson, C. Nelson-Williams, and R. P. Lifton, "WNK1, a kinase mutated in inherited hypertension with hyperkalemia, localizes to diverse Cl⁻-transporting epithelia.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 2, pp. 663–8, Jan. 2003.

- [105] C. Delaloy, J. Lu, A.-M. Houot, S. Disse-Nicodeme, J.-M. Gasc, P. Corvol, and X. Jeunemaitre, "Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 24, pp. 9208–21, Dec. 2003.
- [106] A. Naray-Fejes-Toth, P. M. Snyder, and G. Fejes-Toth, "The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 50, pp. 17434–17439, Dec. 2004.
- [107] J. Rinehart, N. Vázquez, K. T. Kahle, C. A. Hodson, A. M. Ring, E. E. Gulcicek, A. Louvi, N. A. Bobadilla, G. Gamba, and R. P. Lifton, "WNK2 kinase is a novel regulator of essential neuronal cation-chloride cotransporters.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 34, pp. 30171–80, Aug. 2011.
- [108] J. Rinehart, K. T. Kahle, P. de Los Heros, N. Vazquez, P. Meade, F. H. Wilson, S. C. Hebert, I. Gimenez, G. Gamba, and R. P. Lifton, "WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 46, pp. 16777–16782, 2005.
- [109] B. F. X. Dowd and B. Forbush, "PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1).," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 30, pp. 27347–53, Jul. 2003.
- [110] S.-S. Yang, T. Morimoto, T. Rai, M. Chiga, E. Sohara, M. Ohno, K. Uchida, S.-H. Lin, T. Moriguchi, H. Shibuya, Y. Kondo, S. Sasaki, and S. Uchida, "Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model.," *Cell Metab.*, vol. 5, no. 5, pp. 331–44, May 2007.
- [111] K. Piechotta, J. Lu, and E. Delpire, "Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1).," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 52, pp. 50812–9, Dec. 2002.
- [112] K. Piechotta, N. Garbarini, R. England, and E. Delpire, "Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 52, pp. 52848–56, Dec. 2003.
- [113] A. W. Flemmer, I. Gimenez, B. F. X. Dowd, R. B. Darman, and B. Forbush, "Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 40, pp. 37551–8, Oct. 2002.
- [114] B. S. Dhanoa, T. Cogliati, A. G. Satish, E. A. Bruford, and J. S. Friedman, "Update on the Kelch-like (KLHL) gene family," *Hum. Genomics*, vol. 7, no. 1, p. 13, Jan. 2013.
- [115] S. Zollman, D. Godt, G. G. Privé, J. L. Couderc, and F. A. Laski, "The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 22, pp. 10717–21, Oct. 1994.

- [116] J. S. Friedman, J. W. Ray, N. Waseem, K. Johnson, M. J. Brooks, T. Hugosson, D. Breuer, K. E. Branham, D. S. Krauth, S. J. Bowne, L. S. Sullivan, V. Ponjavic, L. Gränse, R. Khanna, E. H. Trager, L. M. Gieser, D. Hughbanks-Wheaton, R. I. Cojocar, N. M. Ghiasvand, C. F. Chakarova, M. Abrahamson, H. H. H. Göring, A. R. Webster, D. G. Birch, G. R. Abecasis, Y. Fann, S. S. Bhattacharya, S. P. Daiger, J. R. Heckenlively, S. Andréasson, and A. Swaroop, "Mutations in a BTB-Kelch Protein, KLHL7, Cause Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 84, no. 6, pp. 792–800, Jun. 2009.
- [117] Y. Kigoshi, F. Tsuruta, and T. Chiba, "Ubiquitin ligase activity of Cul3-KLHL7 protein is attenuated by autosomal dominant retinitis pigmentosa causative mutation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 38, pp. 33613–21, Sep. 2011.
- [118] S. Cirak, F. von Deimling, S. Sachdev, W. J. Errington, R. Herrmann, C. Bonnemann, K. Brockmann, S. Hinderlich, T. H. Lindner, A. Steinbrecher, K. Hoffmann, G. G. Prive, M. Hannink, P. Nurnberg, and T. Voit, "Kelch-like homologue 9 mutation is associated with an early onset autosomal dominant distal myopathy," *Brain*, vol. 133, no. 7, pp. 2123–2135, Jun. 2010.
- [119] A. Hershko and A. Ciechanover, "The ubiquitin system.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, pp. 425–79, Jan. 1998.
- [120] A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, and I. A. Rose, "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, no. 4, pp. 1783–6, Apr. 1980.
- [121] J. A. McCormick, C.-L. Yang, C. Zhang, B. Davidge, K. I. Blankenstein, A. S. Terker, B. Yarbrough, N. P. Meermeier, H. J. Park, B. McCully, M. West, A. Borschewski, N. Himmerkus, M. Bleich, S. Bachmann, K. Mutig, E. R. Argáiz, G. Gamba, J. D. Singer, and D. H. Ellison, "Hyperkalemic hypertension-associated cullin 3 promotes WNK signaling by degrading KLHL3," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 11, pp. 4723–4736, Sep. 2014.
- [122] M. Chiga, T. Rai, S.-S. Yang, A. Ohta, T. Takizawa, S. Sasaki, and S. Uchida, "Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone.," *Kidney Int.*, vol. 74, no. 11, pp. 1403–9, Dec. 2008.
- [123] V. Vallon, J. Schroth, F. Lang, D. Kuhl, and S. Uchida, "Expression and phosphorylation of the Na⁺-Cl⁻ cotransporter NCC in vivo is regulated by dietary salt, potassium, and SGK1.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 297, no. 3, pp. F704–12, Sep. 2009.
- [124] H. Velázquez, A. Bartiss, P. Bernstein, and D. H. Ellison, "Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by rat renal distal tubules.," *Am. J. Physiol.*, vol. 270, no. 1 Pt 2, pp. F211–9, Jan. 1996.
- [125] S. Shibata, J. P. Arroyo, M. Castaneda-Bueno, J. Puthumana, J. Zhang, S. Uchida, K. L. Stone, T. T. Lam, and R. P. Lifton, "Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch-like 3, preventing WNK4 degradation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 43, pp. 15556–15561, Oct. 2014.

- [126] B. Xu, S. Stippec, P.-Y. Chu, A. Lazrak, X.-J. Li, B.-H. Lee, J. M. English, B. Ortega, C.-L. Huang, and M. H. Cobb, "WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 29, pp. 10315–10320, 2005.
- [127] B. E. Xu, S. Stippec, A. Lazrak, C. L. Huang, and M. H. Cobb, "WNK1 activates SGK1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and non-catalytic mechanism," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 40, pp. 34218–34223, 2005.
- [128] C. J. Heise, B. E. Xu, S. L. Deaton, S. K. Cha, C. J. Cheng, S. Earnest, S. Sengupta, Y. C. Juang, S. Stippec, Y. Xu, Y. Zhao, C. L. Huang, and M. H. Cobb, "Serum and Glucocorticoid-induced Kinase (SGK) 1 and the epithelial sodium channel are regulated by multiple with no lysine (WNK) family members," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25161–25167, 2010.
- [129] C. L. Yang, J. Angell, R. Mitchell, and D. H. Ellison, "WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 7, pp. 1039–1045, 2003.
- [130] C.-L. Yang, X. Zhu, Z. Wang, A. R. Subramanya, and D. H. Ellison, "Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport.," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1379–87, May 2005.
- [131] A. Lazrak, Z. Liu, and C.-L. Huang, "Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 5, pp. 1615–20, Jan. 2006.
- [132] G. He, H.-R. Wang, S.-K. Huang, and C.-L. Huang, "Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1.," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 4, pp. 1078–87, Apr. 2007.
- [133] J. P. Arroyo, C. Ronzaud, D. Lagnaz, O. Staub, and G. Gamba, "Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron.," *Physiology (Bethesda)*, vol. 26, no. 2, pp. 115–123, 2011.
- [134] A. C. Vitari, M. Deak, B. J. Collins, N. Morrice, A. R. Prescott, A. Phelan, S. Humphreys, and D. R. Alessi, "WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate.," *Biochem. J.*, vol. 378, no. Pt 1, pp. 257–268, 2004.
- [135] K. Oi, E. Sohara, T. Rai, M. Misawa, M. Chiga, D. R. Alessi, S. Sasaki, and S. Uchida, "A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo," *Biol. Open*, vol. 1, no. 2, pp. 120–127, 2012.
- [136] A. T. Pinal, T. M. Moon, R. Akella, H. He, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith, "Chloride Sensing by WNK1 Involves Inhibition of Autophosphorylation," *Sci. Signal.*, vol. 7, no. 324, pp. ra41–ra41, May 2014.
- [137] S. Bazúa-Valenti, M. Chávez-Canales, L. Rojas-Vega, X. González-Rodríguez, N. Vázquez, A. Rodríguez-Gama, E. R. Argáiz, Z. Melo, C. Plata, D. H. Ellison, J. García-Valdés, J. Hadchouel,

and G. Gamba, "The Effect of WNK4 on the Na⁺-Cl⁻ Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, Dec. 2014.

- [138] K. T. Kahle, J. Rinehart, P. de Los Heros, A. Louvi, P. Meade, N. Vazquez, S. C. Hebert, G. Gamba, I. Gimenez, and R. P. Lifton, "WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 46, pp. 16783–16788, 2005.
- [139] P. de Los Heros, K. T. Kahle, J. Rinehart, N. A. Bobadilla, N. Vázquez, P. San Cristobal, D. B. Mount, R. P. Lifton, S. C. Hebert, and G. Gamba, "WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 6, pp. 1976–81, Feb. 2006.
- [140] M. Zeniya, E. Sohara, S. Kita, T. Iwamoto, K. Susa, T. Mori, K. Oi, M. Chiga, D. Takahashi, S. Sen Yang, S. H. Lin, T. Rai, S. Sasaki, and S. Uchida, "Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II," *Hypertension*, vol. 62, no. 5, pp. 872–878, 2013.
- [141] F. Akar, G. Jiang, R. J. Paul, and W. C. O'Neill, "Contractile regulation of the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter in vascular smooth muscle.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 281, no. 2, pp. C579–84, Aug. 2001.
- [142] J. W. Meyer, M. Flagella, R. L. Sutliff, J. N. Lorenz, M. L. Nieman, C. S. Weber, R. J. Paul, and G. E. Shull, "Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 283, no. 5, pp. H1846–55, Nov. 2002.
- [143] M. Zeniya, N. Morimoto, D. Takahashi, Y. Mori, T. Mori, F. Ando, Y. Araki, Y. Yoshizaki, Y. Inoue, K. Isobe, N. Nomura, K. Oi, H. Nishida, S. Sasaki, E. Sohara, T. Rai, and S. Uchida, "Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II-With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus," *J. Am. Soc. Nephrol.*, Jan. 2015.