



**Universidad Nacional Autónoma de México**

Plan de Estudios Combinados en Medicina (PECEM)

Facultad de Medicina

**Papel de la isoforma KS-WNK1 en la regulación de la cinasa WNK4 y el  
cotransportador renal de NaCl *in vivo***

Tesis para optar por el grado de:

**Doctor en Medicina**

Presenta:

**Mauricio Ostrosky Frid**

Director de Tesis:

**Dr. Gerardo Gamba Ayala**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Miembros del Comité Tutor:

**Dra. Norma Bobadilla Sandoval**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Dra. María Castañeda Bueno**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, septiembre 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Dedicatoria**

Agradezco y dedico esta tesis a mi esposa y a mi familia que hicieron posible la obtención de mi doctorado y han estado a mi lado durante este camino.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Gerardo Gamba

A la Dra. Norma Bobadilla

A la Dra. María Castañeda Bueno

A la Dra. María Chávez Canales

A la Q.F.B Norma H. Vázquez

A la Dra. Ana Flisser

A mis profesores

A mis tutores

A los coautores del artículo publicado

A todos los integrantes de la Unidad de Fisiología Molecular

Al Plan de Estudios Combinados en Medicina (PECEM)

A la Facultad de Medicina

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

***"Si he visto más lejos, ha sido porque he subido a los hombros de gigantes"***

Isaac Newton

## Índice

<b>Introducción:</b> .....	5
El potasio y la presión arterial .....	6
Anatomía y fisiología renal .....	7
El riñón y la presión arterial .....	9
Fisiología y fisiopatología molecular del túbulo contornado distal .....	10
Cascada de activación de NCC a través de la historia .....	14
WNKs .....	25
Modelo de activación de NCC .....	26
Modelos animales .....	30
<b>Pregunta</b> .....	33
<b>Hipótesis</b> .....	34
<b>Objetivos</b> .....	34
Objetivo general .....	34
Objetivos específicos .....	34
<b>Pregunta</b> .....	34
<b>Hipótesis</b> .....	35
<b>Objetivos</b> .....	35
Objetivo general .....	35
Objetivos específicos .....	35
<b>Métodos</b> .....	35
<b>Resumen de resultados</b> .....	35
Los ratones KLHL3 knockin presentan el fenotipo de hipertensión hiperkalémica familiar .....	36
La cinasa KS-WNK1 es muy sensible a la degradación por la ligasa de ubiquitina CUL3-KLHL3 ..	36
La eliminación de KS-WNK1 no previene el fenotipo de FHHT en los ratones KLHL3 <sup>R528H/R528H</sup> .....	37
Las cinasas KS-WNK1 y L-WNK1 tienen una distinta sensibilidad a la degradación por CUL-3-KLHL-3 .....	37
La región 4a de KS-WNK1 está involucrada en la activación de NCC, así como en la degradación por CUL-3-KLHL-3 .....	37
Las cisteínas de la región 4a son necesarias para la función de KS-WNK1 pero no para la degradación por CUL-3-KLHL-3 .....	38
La región hidrofóbica es necesaria para la función de KS-WNK1 y para la degradación por CUL-3-KLHL-3 .....	39

La Valina 11 y la Valina 13 son necesarias para la degradación por CUL-3-KLHL-3 .....	39
La expresión de KS-WNK 1 se incrementa en una dieta baja en potasio.....	39
<b>Discusión</b> .....	40
<b>Conclusiones</b> .....	42
<b>Perspectivas</b> .....	44
<b>Otros artículos publicados durante mi doctorado</b> .....	46
<b>Otros artículos publicados durante mi estancia en el PECEM</b> .....	46
<b>Referencias</b> .....	47

***“Medicine is both an art and a science. Both are interdependent and inseparable, just like two sides of a coin. The importance of the art of medicine is because we have to deal with a human being, his or her body, mind and soul. To be a good medical practitioner, one has to become a good artist with sufficient scientific knowledge.”<sup>1</sup>***

## **Introducción:**

De los principales intereses de la fisiología humana es el manejo de los fluidos. A través del tiempo, los científicos han propuesto distintas teorías sobre como la dinámica de los fluidos afecta la fisiología y las enfermedades, por ejemplo:

- Hipócrates formuló la teoría que en el cuerpo existen 4 humores (fluidos) sangre, bilis amarilla, bilis negra y flema.
- Claude Bernard explicó que existen 2 tipos de fluidos el extracelular y el intracelular y requieren estar en equilibrio pues un desbalance es patológico.

Gracias a estas observaciones actualmente en medicina el manejo de fluidos es una parte indispensable del tratamiento de pacientes con enfermedades como hipertensión arterial, falla cardiaca, cirrosis y lesión renal aguda. Hasta nuestros días una pregunta de la fisiología muy relevante y no totalmente contestada es el entendimiento de ¿cómo los animales acuáticos al salir del mar lograron retener el agua necesaria dentro del cuerpo?

Cuando hablamos del manejo de fluidos, el órgano responsable es el riñón, quien es el encargado de regular la presión arterial a largo plazo por medio de la reabsorción de sal y agua. Este trabajo se enfocará en como una cinasa que se encuentra desde el celecanto<sup>2</sup> conocida como KS-WNK1 está involucrada en la regulación de la presión arterial.

---

1 Panda S. C. (2006). Medicine: science or art?. Mens sana monographs, 4(1), 127–138.  
<https://doi.org/10.4103/0973-1229.27610>

<sup>2</sup> Celecantos son peces vertebrados que aparecieron hace 360 millones de años y predecesores a los tetrápodos. <https://ocean.si.edu/ocean-life/fish/coelacanth>

## El potasio y la presión arterial

Entender la regulación de la presión arterial es de gran importancia. En México, la hipertensión arterial tiene una prevalencia del 33% en la población adulta (Gutiérrez et al., 2012). La presión arterial depende de factores externos como la dieta y factores internos como la genética. Por muchos años se ha dicho que los alimentos ricos en potasio como las frutas y verduras son saludables a diferencia de los alimentos ricos en sal como los alimentos procesados que provocan un deterioro en la salud. En 2014 dos estudios poblacionales demostraron el beneficio de una dieta alta en potasio (Mente et al., 2014; O'Donnell et al., 2014). Ambos estudios midieron la excreción urinaria de sodio y potasio

como subrogado de la ingesta. O'Donnell et al. en más de 100,000 participantes evaluó la mortalidad asociada a la ingesta de sodio o de potasio. La ingesta de sodio y de potasio es de 4.93 y 2.11 gramos por día (g/d) respectivamente. Una ingesta elevada de sodio >7g/d aumenta la mortalidad y eventos adversos cardiovasculares, sin embargo, este efecto pierde significancia al ser ajustado por la hipertensión

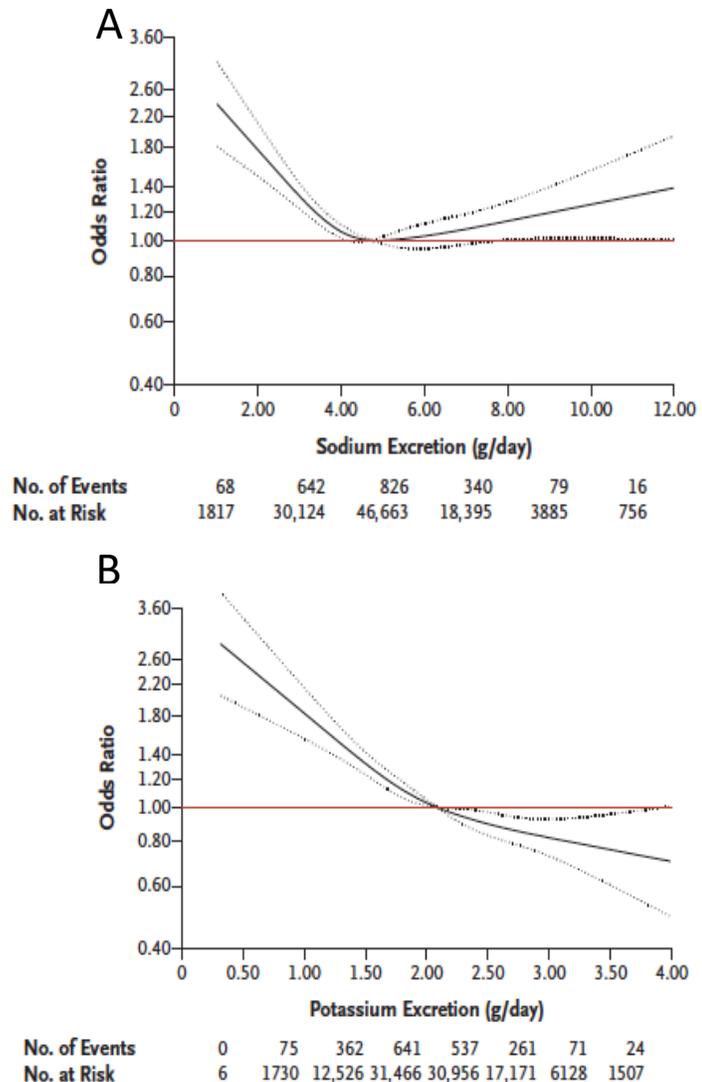


Fig. 1. Asociación entre mortalidad por cualquier causa y la ingesta de (A) Sodio. Una dieta baja en sodio <3g/d o alta en sodio >7g/d están asociados con una mayor mortalidad. (B) Potasio. El incremento en la ingesta de potasio está asociado con una disminución en la mortalidad. Figura tomada y modificada de O'Donnell et al., 2014

arterial. Una ingesta disminuida de sodio (<3g/d) también aumenta la mortalidad y efectos adversos cardiovasculares, estas complicaciones no se previenen al ajustar por hipertensión arterial. En resumen, una dieta alta o baja en sodio está asociada con una mayor mortalidad y su representación gráfica es en forma de “J” (fig. 1A), en contraste, una dieta baja en potasio (<1.5g/d) aumenta el riesgo de mortalidad probablemente por un incremento en la presión arterial y una dieta alta en potasio disminuye la mortalidad. Lo que le da una justificación fisiológica a la campaña de salud “Come frutas y verduras” (Fig 1B) (O'Donnell et al., 2014). El segundo estudio poblacional con más de 100,000 participantes demuestra que independientemente del sodio, una mayor ingesta de potasio está relacionada con una menor presión arterial y viceversa, la menor ingesta con mayor presión arterial (Fig. 2) (Mente et al., 2014). Lo que sugiere que el potasio es capaz de regular a la presión arterial. Para entender como el potasio regula a la presión arterial, hay que entender la anatomía y fisiología renal incluyendo el eje renina-angiotensina-aldosterona y más a fondo la fisiología molecular que se explican a continuación.

### ***Anatomía y fisiología renal***

El riñón es un órgano par que se encuentra en el retroperitoneo, es irrigado por la arteria renal, rama de la arteria aorta y su drenaje venoso es a través de la vena renal. La arteria renal se subdivide hasta formar la arteriola aferente, esta arteriola forma el capilar glomerular donde el plasma se filtra (proceso que se describirá más adelante), posterior al capilar glomerular se encuentra la arteriola eferente que es encargada de irrigar a la siguiente porción de la nefrona.

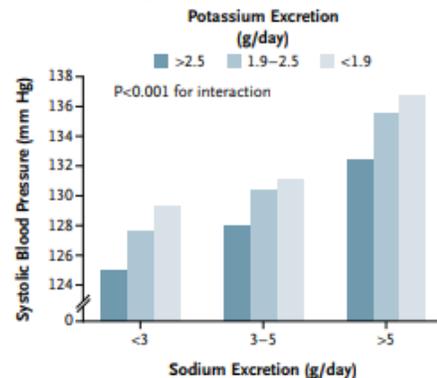


Fig. 2 La presión arterial sistólica disminuye al aumentar la ingesta de potasio y viceversa una menor ingesta incrementa la presión arterial incluso en una dieta alta en sodio. Imagen tomada de Mente et al., 2014

Cada riñón contiene entre 800,000 y 1,200,000 nefronas que están divididas en una región glomerular que es la encargada de filtrar el plasma y una región tubular, formada por el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el conducto colector, que se encargan de reabsorber, secretar y concentrar la orina (fig. 3) (Boron & Boulpaep, 2012).

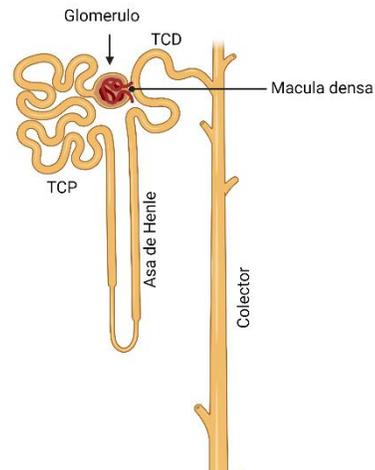


Fig. 3 Nefrona. Unidad funcional del riñón formada por el glomérulo, y la región tubular TCP (túbulo contorneado proximal), Asa de Henle (AH), y TCD (túbulo contorneado distal). La Mácula densa se encuentra posterior al AH y entre la arteriola aferente y la eferente. Creado con BioRender.com

El porcentaje del gasto cardiaco que llega al riñón es 20%. Eso quiere decir que una quinta parte de la sangre expulsada por el corazón cada minuto llega al riñón. Si el corazón expulsa 5 litros de sangre por minuto alrededor de 1 L de sangre llega al riñón. De ese litro cerca del 55% corresponde al plasma (~550 ml) y el resto son células. En el glomérulo cerca del 20% del plasma que llega se filtra, esto quiere decir que sale del capilar glomerular para entrar a la cápsula de Bowman en el glomérulo, en cantidad, la filtración glomerular es de aproximadamente 125 ml/min ó 180 L por día. El 99% del filtrado glomerular se reabsorbe en la porción tubular de la nefrona.

La primera porción tubular conocida como el túbulo contorneado proximal es donde se reabsorbe la mayor parte de las moléculas orgánicas y cerca del 70% de la sal filtrada. La siguiente porción de la nefrona es el de asa de Henle (AH) y es donde se genera la hipertonicidad de la médula renal mediante el mecanismo de contracorriente necesaria para que, posteriormente en el conducto colector se pueda concentrar la orina. El asa de Henle reabsorbe cerca del 25% del sodio filtrado. El túbulo contorneado distal (TCD) se encuentra a continuación de AH y es donde se encuentra el cotransportador renal de NaCl (NCC por sus siglas en inglés)

que se describirá más adelante. Por último, en las células principales del conducto colector se expresa el canal de sodio y el canal de potasio (ENaC y ROMK por sus siglas en inglés respectivamente). En la parte final del AH se encuentra la mácula densa (MD) una región sensible al cloruro que regula la filtración glomerular a través de la secreción de renina (fig. 4) (Boron & Boulpaep, 2012).

### ***El riñón y la presión arterial***

La presión arterial se genera por el gasto cardiaco que depende de la frecuencia cardiaca y de la cantidad de sangre que llega al corazón que se conoce como precarga y por la resistencia que ofrece el sistema vascular al flujo sanguíneo, que se conoce como poscarga. A corto plazo la presión arterial se regula por cambio en las resistencias vasculares periféricas, en la contracción cardiaca y por el sistema neuroendócrino, sin embargo, a largo plazo (semanas a meses) el cuerpo regula la presión arterial por medio del volumen corporal total, este volumen es dinámico y requiere del equilibrio entre la ingesta y eliminación de sal y agua. El aumento del volumen intravascular por ingesta de líquidos y sal genera un aumento en la presión arterial que es sentido por el riñón, este aumento promueve la eliminación de sal y agua por el riñón, proceso que se conoce como diuresis por presión para el agua y natriuresis por presión para la sal. Cuando este modelo se altera el riñón no es capaz de sentir o reaccionar a este cambio. Por ejemplo, en niveles elevados de aldosterona el organismo desarrolla hipertensión arterial y ya que el equilibrio ingesta-excreción es también muy relevante un aumento en la ingesta puede generar hipertensión arterial (Hall & Guyton, 2011).

El eje renina-angiotensina-aldosterona que se explica en el pie de la figura 4 es capaz de regular la presión arterial mediante la filtración glomerular, la reabsorción y la secreción tubular (fig. 4). Para entender a la hipertensión arterial es necesario reconocer que la causa es renal y no cardiaca. Estudios de trasplante renal en ratas nefrectomizadas que reciben un riñón de ratas normotensas tienen cifras de presión arterial más baja que ratas que reciben un riñón de ratas hipertensas (Rettig et al., 1990). Esto también sucede en los humanos. Curtis et al. mostró que en pacientes con hipertensión crónica que causó falla renal y recibieron un trasplante renal, la

función renal mejoró, así como las cifras de presión arterial. (Curtis, Luke, & Dustan, 1983).

Aún más evidencia que muestra que la hipertensión es de causa renal es que la angiotensina II genera hipertensión por sus receptores en el riñón y no en el corazón o las resistencias vasculares periféricas, como previamente se creía. Esto fue mostrado en un modelo de trasplante renal entre ratones silvestres y ratones knockout para el receptor AT1 de angiotensina. Los resultados observados fueron que ratones que no tienen el receptor de angiotensina en el riñón, independientemente si lo tienen en otras partes del cuerpo, no desarrollan hipertensión arterial ante la administración de angiotensina II. En contraste ratones con el receptor de angiotensina II en el riñón, independientemente si lo tienen o no en otras partes del cuerpo, se presentan con hipertensión arterial. (Crowley et al., 2006).

Aparte de los medicamentos que disminuyen la presión arterial a través del eje renina-angiotensina-aldosterona que se comentan en la figura 4, los diuréticos son otra clase de medicamentos que también actúan en el riñón y regulan el volumen y la presión arterial, otro argumento de que la hipertensión arterial es un problema renal. Los diuréticos se han usado para disminuir la presión arterial por más de medio siglo, incluso antes de conocer su mecanismo de acción (Rose, 1991).

### ***Fisiología y fisiopatología molecular del túbulo contornado distal***

La expresión de NCC en el TCD (posterior a la MD) le da un papel fundamental en la regulación de la presión arterial, ya que su función no es regulada por la MD. El NCC es un cotransportador que reabsorbe sal (cloruro de sodio) de la luz tubular del TCD esto evita la pérdida de sal y agua, fue clonado por el Dr. Gamba bajo la tutela del Dr. Hebert (Gamba et al., 1993). El entendimiento de la función y regulación de este cotransportador no ha sido un camino sencillo y ha requerido de muchos modelos animales descritos en (Ostrosky-Frid, Castañeda-Bueno, & Gamba, 2019) así como modelos *in vitro*, estudios genéticos y el estudio de mutaciones puntuales en NCC o en su cascada de activación.

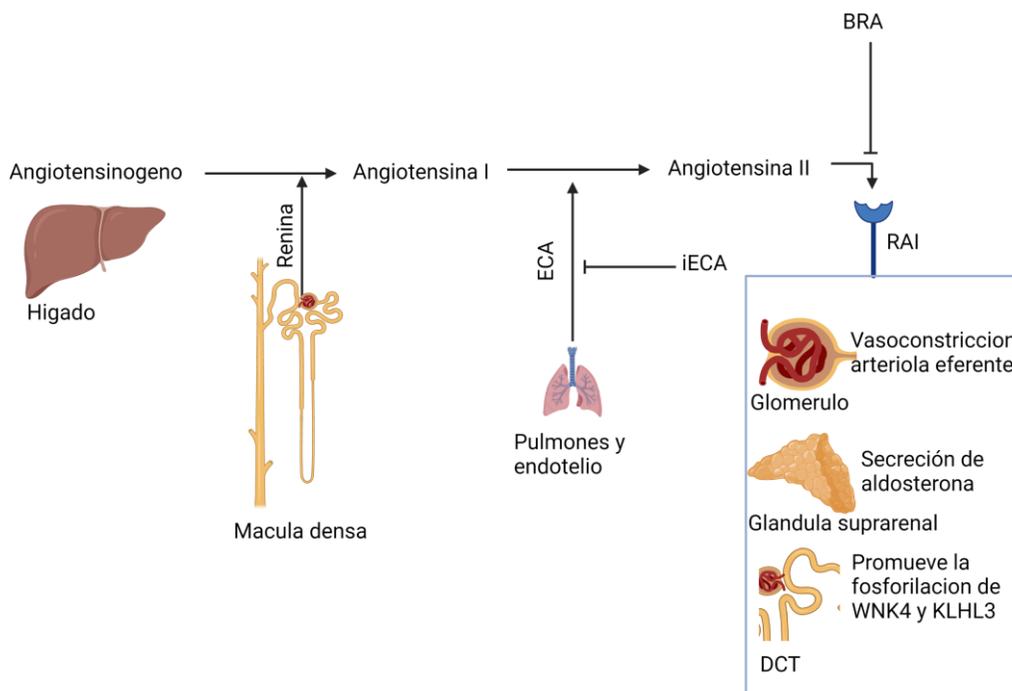


Fig. 4 Eje renina-angiotensina-aldosterona. El hígado secreta angiotensinógeno que se convierte en angiotensina I por la renina secretada por la mácula densa. La angiotensina I a su vez se convierte en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los medicamentos conocidos como inhibidores de la ECA (iECA) que su nombre termina en *pril* inhiben este paso. La angiotensina II se une al receptor de angiotensina II (RAI) y genera una vasoconstricción en la arteriola eferente, un aumento en la secreción de aldosterona y un aumento en la fosforilación de WNK4 y KLHL3 (estas proteínas se explicarán más adelante). La unión la angiotensina II a su receptor se bloquea por los bloqueadores del receptor de angiotensina (BRA) que su nombre termina en *sartan*. Creado con BioRender.com

El túbulo contorneado distal tiene 2 porciones: la primera donde hay una mayor cantidad de NCC donde el sodio se reabsorbe con cloruro por un mecanismo electroneutro y la segunda porción donde además se expresa ENaC y ROMK y una fracción del sodio que no se reabsorbe por NCC se intercambia por potasio. (fig. 5A). La regulación de la reabsorción de sodio, así como su intercambio con el potasio se regulada finamente para mantener niveles adecuados de presión arterial y de potasio. Las mutaciones que modifican la actividad NCC o la expresión o

función de ENaC o Kir4.1 causan cambios en el volumen, presión arterial, y niveles de potasio.

Las mutaciones inactivantes de NCC son las causantes del Síndrome de Gitelman (Vargas-Poussou et al., 2011) y se presentan con hipotensión e hipokalemia (Gitelman, Graham, & Welt, 1966), ya que el sodio no se reabsorbe de manera electroneutra en la primera porción de TCD, lo que ocasiona que llegue una mayor cantidad de sodio a la segunda porción del TCD y al conducto colector. Esto causa un aumento en el intercambio de sodio por potasio y genera hipokalemia. Sin embargo, este mecanismo no es suficiente para compensar a la función de NCC por lo que la pérdida de sal y agua también causan hipotensión arterial (Fig. 5B). Por el contrario, la sobre-activación de NCC causa Hipertensión Hiperkalemica Familiar (FHHT), también conocido como pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAI) o Síndrome de Gordon que, como su nombre lo dice se presentan con hipertensión e hiperkalemia; esto se debe a que NCC reabsorbe una mayor cantidad de sodio que resulta en hipertensión arterial y en una disminución de la cantidad de sodio que llega a la segunda porción del TCD, esto reduce la cantidad de sodio que se intercambia por potasio y genera hiperkalemia (Fig. 5C) (Gordon, 1986).

Un tercer síndrome que aclara la función del TCD y la función del potasio en la regulación de la presión arterial es el Síndrome de EAST (Epilepsia, Ataxia, Sordera sensorineural y Tubulopatía) también conocido como Síndrome de SeSAME (Seizures [convulsiones], Sensorineural deafness [sordera], Ataxia [ataxia], intellectual (Mental) disability [discapacidad intelectual], y Electrolyte imbalance [desbalance de electrolitos]), causado por una mutación en el canal de potasio Kir 4.1 y aparte de tener manifestaciones neurológicas, se presenta como síndrome tipo Gitelman; esto es debido a que el potasio intracelular en el TCD no tiene vía de salida, normalmente el gradiente eléctrico generado por la salida de potasio promueve la salida del cloruro a través de CLCKB, sin embargo, cuando el potasio no tiene vía de salida, el gradiente eléctrico no se genera lo que causa que el cloruro permanezca dentro de la célula e inhibe a NCC que se presenta como una

tubulopatía similar a Síndrome de Gitelman. (Fig. 5D) (Bockenhauer et al., 2009; Cuevas et al., 2017; Scholl et al., 2009).

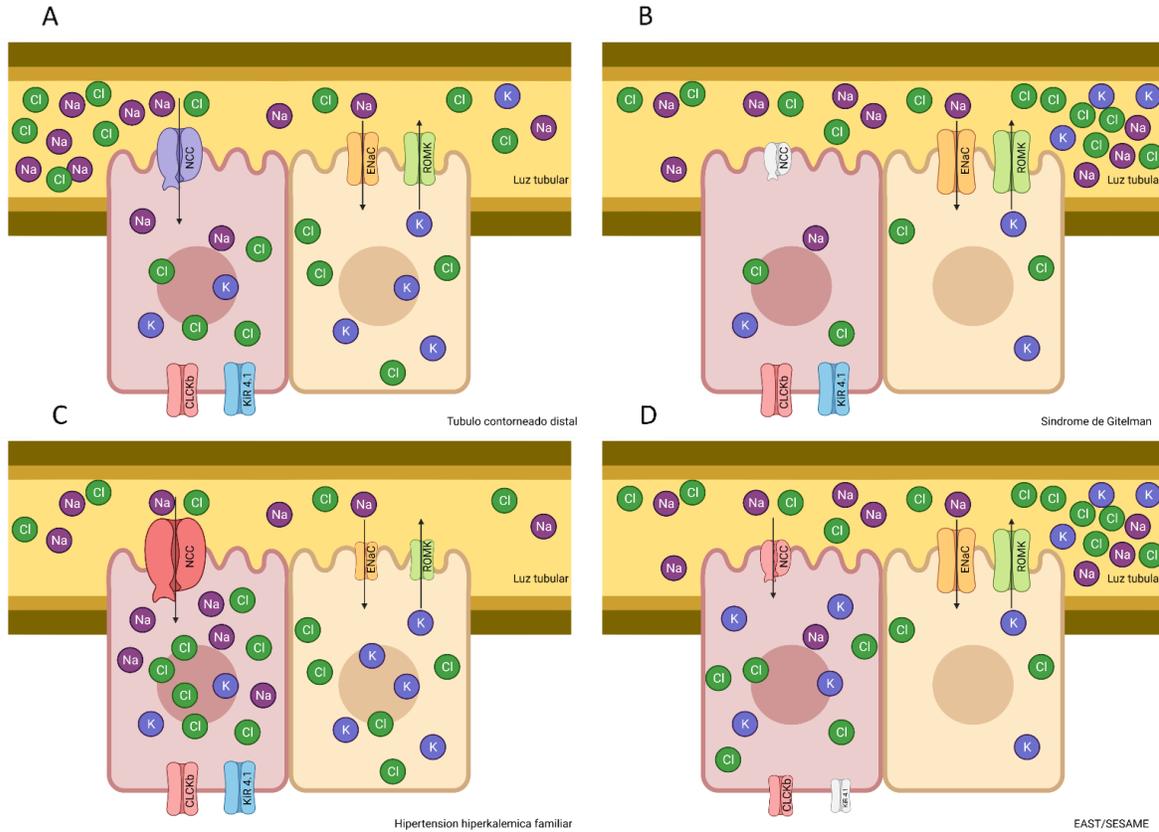


Fig. 5 Túbulo contorneado distal. (A) La primera porción del TCD (representada por la célula rosa) donde principalmente se expresa NCC, en esta porción el sodio se reabsorbe con cloruro de manera electroneutra. Una fracción del sodio que no se reabsorbe se intercambia por potasio en la segunda porción del TCD (representado por la célula amarilla). (B) En el Síndrome de Gitelman NCC no es funcional por lo que la sal no se reabsorbe lo que incrementa el intercambio de Na por K en la segunda porción del TCD, este intercambio ocasiona una pérdida de potasio, así como una depleción de volumen y disminución de la presión arterial. (C) En la hipertensión hiperkalémica familiar NCC se encuentra sobreactivado lo que aumenta la reabsorción de sal y disminuye la cantidad de sodio que se intercambia río abajo por potasio, esto causa un aumento en el volumen y presión arterial y un aumento en el potasio. (D) En EAST/SESAME Kir4.1 no es funcional por lo que el potasio permanece en la célula esto promueve la acumulación de cloruro intracelular ya que no se genera un gradiente eléctrico que promueve la salida de cloruro a través de CLCKb lo que causa una inhibición en NCC como se explicará en el texto y causa un síndrome similar a Gitelman. Creado con BioRender.com

Como se menciona en los párrafos anteriores el Síndrome de Gitelman es causado por mutaciones inactivantes en NCC y el Síndrome EAST/SESAME por mutaciones inactivantes en Kir 4.1. En la FHHT no se han descrito mutaciones que activen NCC. Las mutaciones descritas en esta enfermedad son en 4 distintas proteínas.

La primera mutación descrita en una familia con FHHT fue en la cinasa *With No Lysine (K)* cinasa 1 (WNK1) (Wilson et al., 2001). Las WNKs como su nombre lo indica son una familia de cinasas que carecen de la lisina catalítica en el subdominio II y en su lugar tienen una cisteína (Xu et al., 2000). Estos dos descubrimientos dieron pie al entendimiento de la cascada de activación de NCC.

### ***Cascada de activación de NCC a través de la historia***

El Síndrome FHHT fue descrito en 1986 como un síndrome autosómico dominante que se presenta con niveles elevados de potasio y de presión arterial, pero fue hasta el 2001 que se describió en dos familias que la delección del intrón 1 de WNK1 es causante de este síndrome en algunas familias. Debido a que existen cuatro WNKs reportadas y había familias con FHHT que no tenían una mutación en WNK1 se evaluaron las otras WNKs y se encontró que mutaciones en WNK4 también causan esta enfermedad (Wilson et al., 2001).

En 2012 fueron descritas mutaciones en dos proteínas adicionales Kelch-like (KLHL3) y Cullin 3 (Cul3) que forman el complejo de ubiquitin ligasa CUL-3-KLHL-3 (Boyden et al., 2012). Este complejo es el responsable de ubiquitinar a WNK4 y promover su degradación por vía proteosomal. Las mutaciones en KLHL3 impiden su interacción con Cul3 ó con WNK4 y las mutaciones descritas en WNK4 ocurren en el dominio ácido de la cinasa, y también impiden la interacción con KLHL3 (Ohta et al., 2013; Shibata, Zhang, Puthumana, Stone, & Lifton, 2013; Wakabayashi et al., 2013). Las mutaciones en las cuatro proteínas descritas previamente ayudaron a comprender la cascada de activación de NCC.

La actividad de KLHL3 sobre WNK4 se regula por el potasio y la angiotensina II. La depleción de potasio o el aumento de angiotensina II promueven la fosforilación de la serina 433 por vía de la protein cinasa C (PKC), lo que impide la unión entre

KLHL3 y WNK4. Esto previene la ubiquitinación de WNK4 y por lo tanto su degradación (Ishizawa et al., 2016) (Shibata et al., 2014). En contraste a lo que sucede en niveles basales de potasio donde KLHL3 se une al dominio ácido de WNK4 y promueve su ubiquitinación lo que degrada a WNK4 (Ohta et al., 2013) (Shibata et al., 2013). Mutaciones en el dominio ácido de la WNK4, en KLHL3 ó en Cul3 se presentan como FHHt. (Boyden et al., 2012).

Hasta ahora entendemos que WNK4 se ubiquitina por el complejo CUL3-KLHL3, proceso regulado por el potasio y la angiotensina II. Mutaciones en el dominio ácido de WNK4, en KLHL3 ó en Cul3 previenen la degradación de WNK4, y la mutación en WNK1 es una delección en el intrón 1 que aumenta su expresión (Vidal-Petiot et al., 2013). En resumen, todas las mutaciones descritas previamente están relacionadas con un aumento en la expresión y no en la actividad.

Actualmente sabemos que WNK4 es un activador de NCC pero llegar a esta conclusión fue un camino largo con muchos cambios de paradigma (fig. 6) que se resumen a continuación. En un inicio WNK4 se pensó que era un inhibidor de NCC porque al inyectar WNK4 silvestre en ovocitos de *Xenopus laevis* la expresión de NCC, así como su función, disminuyen (Wilson et al., 2003). Este efecto inhibidor de WNK4 se previno al coinyectarlo con WNK1 y debido a que la inyección de WNK1 no tuvo efecto en NCC en ausencia de WNK4, en el modelo inicial se pensó que WNK4 inhibía a NCC y WNK1 inhibía el efecto inhibidor de WNK4 (C. L. Yang, Angell, Mitchell, & Ellison, 2003).

Cuando se pensó que este modelo ya estaba entendido, se encontró que WNK1 tiene un segundo promotor después de la región cinasa (Delaloy et al., 2003) y que genera una isoforma que se expresa únicamente en el riñón, fue descrita y nombrada Kidney specific-WNK1 (KS-WNK1), debido a que es una isoforma más corta que WNK1, WNK1 fue renombrada como long-WNK1 (L-WNK1) (Fig. 7). KS-WNK1 principalmente se encuentra en la corteza renal donde está el TCD y es más corta, ya que su transcripción inicia en un exón 4 alternativo, conocido como el exón 4a, una región de gran importancia que se explica más adelante. La isoforma corta carece de la región cinasa, lo que ha causado polémica en su función. A partir del

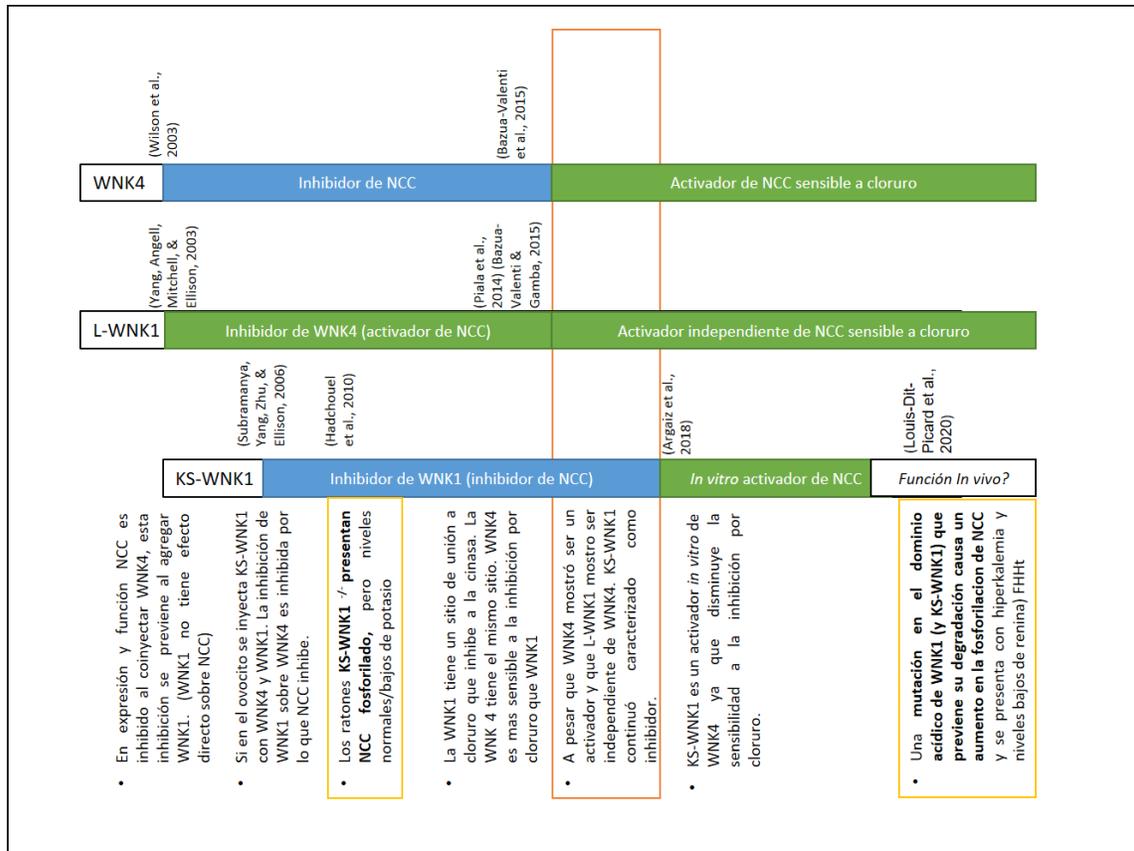


Fig. 6. La interpretación de la función de WNK4, L-WNK1 y KS-WNK1 a través del tiempo. Azul cuando fueron considerados inhibidores, verde cuando fueron considerados activadores. El recuadro naranja muestra un periodo en el que KS-WNK1 continuó como inhibidor a pesar que el modelo de activación de NCC mostro ser incorrecto. En 2018 KS-WNK1 mostro prevenir la inhibición de WNK4 por cloruro intracelular y ser un activador *in vitro* de NCC. En el recuadro amarillo conclusiones de 2 artículos uno con eliminación de KS-WNK1 y otro con aumento en KS-WNK1 ambos con aumento en NCC. En el texto se explica la interpretación de estos resultados.

exón 5 ambas isoformas, L-WNK1 y KS-WNK1, son idénticas (O'Reilly, Marshall, Speirs, & Brown, 2003). Actualmente también se sabe que el RNA de KS-WNK1 en el TCD es 80 veces más abundante que el RNA de L-WNK1 (Vidal-Petiot et al., 2012). La expresión *in vivo* a nivel proteico de KS-WNK1 no ha podido ser evaluada debido a que la región 4a de KS-WNK1 es rica en cisteínas lo que impide la generación de anticuerpos que reconozcan esta región.

Dada la expresión tan particular de KS-WNK1 en el riñón, se intentó demostrar cual podría ser el efecto de esta en la regulación de NCC por la cinasas WNKs. Con este objetivo en mente, Subramanya et al microinyectaron el RNAm de KS-WNK1 en

ovocitos de *Xenopus*, junto con RNAc de NCC, así como en ausencia o presencia de RNAc de WNK1 y/o WNK4, observaron, como muestra la figura 8, que la presencia de KS-WNK1 sola no tuvo ningún efecto sobre la actividad de NCC, sin embargo, en presencia de WNK4 y de L-WNK1 el efecto inhibitorio de L-WNK1 sobre WNK4 se previene. Con estas observaciones se propuso que la KS-WNK1 es un inhibidor de L-WNK1 (Subramanya, Yang, Zhu, & Ellison, 2006), sobre su efecto inhibitorio en WNK4.

La cinasa WNK4 continuó considerándose como inhibidora de NCC por muchos años, hasta que Castañeda-Bueno et al. mostraron que *in vivo* la eliminación de WNK4 disminuye la expresión de NCC, así como la respuesta de NCC a angiotensina II, lo que sugiere que no es un inhibidor (Castaneda-Bueno et al., 2012). Fue gracias al trabajo de Bazua-Valenti junto con la

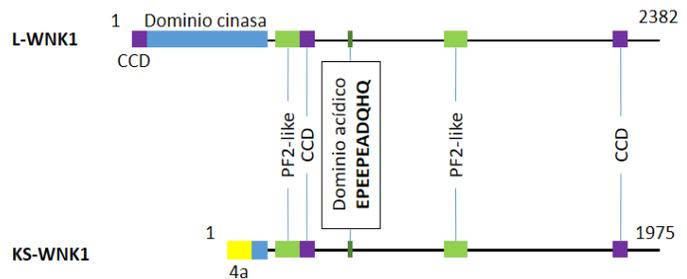


Figura 7 obtenida y modificada de (Ostrosky-Frid et al., 2021). KS-WNK1 y L-WNK1 difieren en la porción amino terminal. Los primeros 30 aminoácidos de KS-WNK1 constituyen la región 4a y los primeros 4 exones de L-WNK1 conforman a la región cinasa. A partir del exón 5 ambas isoformas son idénticas incluyendo el dominio ácido (sitio de unión de KLHL3).

cristalización del dominio cinasa de WNK1 (Piala et al., 2014) cuando se entendió que las WNKs son cinasas activadoras, que se inhiben por cloruro, ya que en la región cinasa existe un sitio de unión a cloruro que, cuando está ocupado por Cl<sup>-</sup> cambia la conformación del dominio cinasa, lo que disminuye su actividad, es decir, el cloruro funciona como un inhibidor de WNK4. Es importante hacer notar que por la alta concentración de cloruro en el ovocito de *Xenopus laevis*, WNK4 se comporta como un inhibidor de NCC, al disminuir la concentración de cloruro intracelular del ovocito WNK4 se comporta como un activador. (Bazua-Valenti et al., 2015).

La sensibilidad de la inhibición por cloruro intracelular no es igual en todas las WNKs. La WNK4 es la más sensible, seguida por la WNK1 y la WNK3 es la menos sensible (Bazua-Valenti & Gamba, 2015), esto cambió el pensamiento y ahora se

sabe que ambas cinasas pueden activar a NCC independientemente, pero deja a KS-WNK1 con una confusa etiqueta de inhibidor, ya que su función analizada con la óptica que WNK4 es un inhibidor y L-WNK1 inhibe a WNK4.

Algo que confunde más la función de KS-WNK1 es el modelo animal, carente de esta cinasa conocido como KS-WNK1<sup>-/-</sup> (Hadchouel et al., 2010). La razón por la

que este modelo ha generado mucha confusión es que la eliminación de esta cinasa incrementa la expresión y fosforilación de NCC. Este hallazgo, analizado bajo la suposición que KS-WNK1 fue inicialmente descrito como un inhibidor *in vitro* hizo que se reportara como inhibidor *in vivo*.

Sin embargo, este modelo no presenta el fenotipo FHHT. Es decir, los ratones no presentan hiperkalemia como otros modelos FHHT lo que nos hace

preguntarnos si realmente es un inhibidor y si únicamente un aumento en NCC es suficiente para describir la función de KS-WNK1. Sabemos que el FHHT se genera por una activación primaria de NCC. Esto aumenta la absorción de sal y disminuye el intercambio de sodio por potasio por ENaC y ROMK (Fig. 5C), lo que causa hiperkalemia e hipertensión.

La depleción de potasio también puede activar a NCC. Inverso a lo que sucede en el Síndrome de EAST/SESAME, la depleción de potasio intracelular genera un gradiente eléctrico que promueve la salida de cloruro de la célula, lo que previene que las WNKs se inhiban por el cloruro. Esto causa un aumento en la fosforilación de WNK4 y a su vez de NCC. La activación de NCC aumenta la reabsorción de sal

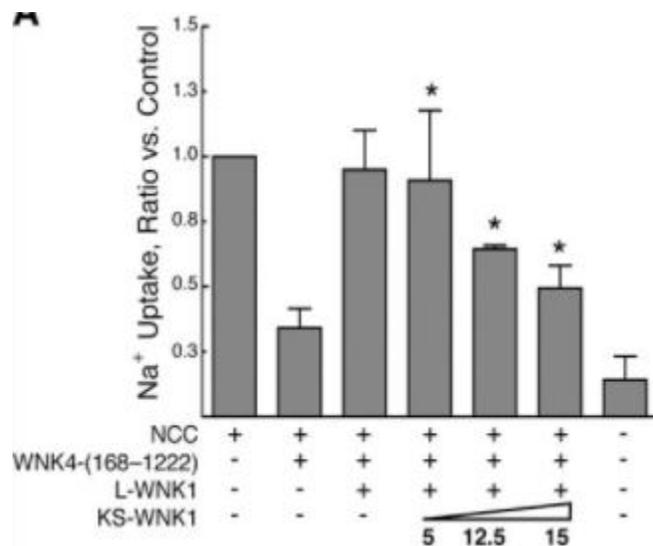


Figura 8. Gracias a estos resultados antes se pensaba que WNK4 inhibía a NCC, L-WNK1 prevenía la inhibición de NCC por WNK4 y KS-WNK1 inhibía a L-WNK1 de manera dosis dependiente. Imagen tomada de Subramanya, Yang, Zhu, & Ellison, 2006

en la primera porción del TCD, lo que disminuye el intercambio de sodio y potasio en la segunda porción del TCD y promueve la retención de potasio y más específico, los niveles séricos de potasio están inversamente relacionados con la fosforilación de NCC (Terker et al., 2016).

Lo que nos hace pensar que si la activación de NCC en los ratones *KS-WNK1<sup>-/-</sup>* es una activación primaria (lo que debería causar FHHT) o secundaria (por los niveles bajos de potasio). A continuación lo explicaré usando a la aldosterona como ejemplo:

La elevación de aldosterona causa hiperaldosteronismo el cual puede ser primario, por una secreción no regulada de la aldosterona, por ejemplo, por un adenoma o hiperplasia suprarrenal que se presentan con hipertensión, o una elevación secundaria en respuesta a niveles bajos de presión arterial, el uso de diuréticos o la cirrosis y se presenta con una presión arterial normal o baja. Ambos casos se presentan con la aldosterona elevada, la primera es patológica, la segunda es una respuesta compensadora al bajo volumen intravascular. (Kasper et al., 2016). Hadchouel et al. argumenta que *KS-WNK1* es un inhibidor de NCC y al eliminarlo NCC se eleva. En contraste, nuevos experimentos descritos en el siguiente párrafo sugieren que la elevación de NCC es secundaria, ya que es para compensar la pérdida de potasio por la falta de *KS-WNK1*, lo que sugiere que *KS-WNK1* es un activador de NCC.

*WNK1* siempre fue considerado activador y su efecto se pensaba que era a través de la inhibición de *WNK4* (que inhibía a NCC) y no directamente activando a NCC (Subramanya et al., 2006). Actualmente

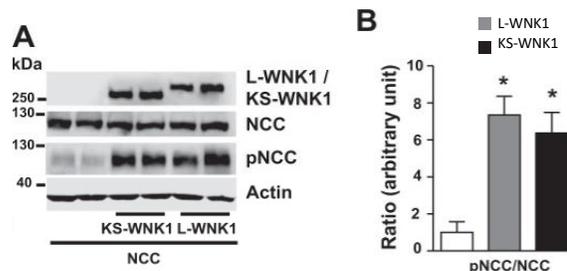


Fig. 9 A. *L-WNK1* y *KS-WNK1* en el ovocito de *Xenopus laevis* son activadores de NCC. NCC se fosforila (pNCC) al ser coinyectado con *L-WNK1* ó *KS-WNK1*. B Densitometría mostrando el ratio pNCC/NCC. Imagen tomada y modificada de Argaiz et al 2018

sabemos que L-WNK1 es un activador independiente de WNK4. El mecanismo de activación como lo entendemos hoy en días fue mostrado por Chavez-Canales et al. Ellos reportan dos hallazgos importantes: El primero que la clona de cDNA de L-WNK1 que se utilizaba en ovocitos tenía una mutación (G2120S) que prevenía su actividad. Esta mutación se detectó mediante secuenciación y comparación con el DNA de rata y al corregirla mostro ser un activador. También muestran que al eliminar WNK4 en los ratones que tienen la mutación de WNK1 FHHT el fenotipo FHHT no se previene lo que sugiere que WNK1 activa NCC independientemente de WNK4. Este hallazgo se explicará más adelante en la sección de modelos animales (Chavez-Canales et al., 2014). El trabajo en el laboratorio del Dr. Gamba ha mostrado que al eliminar esta misma mutación en KS-WNK1 esta isoforma también se convierte en una activadora.

Hasta ahora hemos hablado de la historia de KS-WNK1 desde el punto de vista de un inhibidor, pero KS-WNK1 requiere ser reestudiado bajo la óptica que las WNKs son sensibles a cloruro y que el modelo está basado en la clona de L-WNK1 G2120S. Al ser estudiado bajo la nueva óptica KS-WNK1 mostró ser un activador de NCC (fig. 9). Sin embargo, KS-WNK1 no tiene dominio cinasa (fig.7) por lo que no es capaz

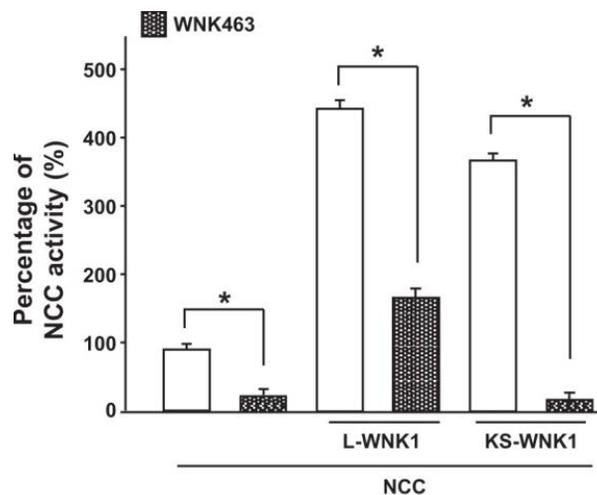


Fig. 10. WNK 463 inhibe a las WNKs endógenas en el ovocito esto se muestra al disminuir la actividad basal de NCC. También se muestra que al inhibir a las WNKs endógenas el efecto activador de KS-WNK1 se pierde lo que sugiere que KS-WNK1 depende de su interacción con ellas. L-WNK1 también se inhibe por WNK463 aunque su efecto es menor probablemente porque hay una mayor cantidad de sustrato que puede ser inhibido por WNK463 por lo que requiere una mayor dosis. Imagen tomada de Argai et al 2018

de activar a NCC independientemente. Se sabe que KS-WNK1 tiene una región conocida como HQ que le permite interactuar con otras WNKs, esto se explicará detalladamente más adelante (Thastrup et al., 2012). El ovocito de *Xenopus laevis* tiene WNKs endógenas que pueden interactuar con KS-WNK1. Para mostrar si el efecto de KS-WNK1 es a través de las WNKs

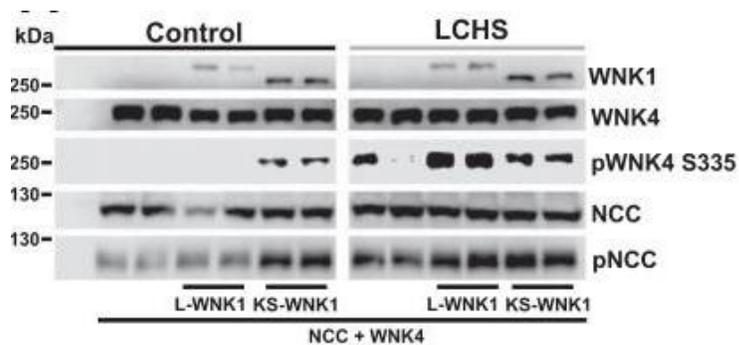


Fig 11. En ovocitos de *X. laevis* se inyectó NCC con WNK4 y L-WNK1 ó KS-WNK1 ó nada y se comparó en una solución control vs. una solución hipotónica baja en cloro (LCHS). La coinyección de KS-WNK1 promueve la fosforilación de WNK4 (pWNK4 S335) aun en una solución control. Lo que sugiere que disminuye su sensibilidad a la inhibición por cloruro. (En el artículo original se muestra que los niveles de cloruro permanecen estables en el ovocito) Imagen tomada y modificada de Argaiz et al 2018

endógenas R Argaiz et al utilizaron un nuevo inhibidor específico de WNKs (WNK463) que se une a la región cinasa (Yamada et al., 2016) para evaluar si el efecto de KS-WNK1 se pierde al inhibir las WNKs endógenas (fig. 10). Al mostrar que al inhibir a las WNKs endógenas con WNK463 se pierde el efecto activador de KS-WNK1 sobre NCC decidieron coinyectar KS-WNK1 con WNK4 y evaluar si existe alguna interacción entre ellas.

WNK4 se inhibe por cloruro como se comentó anteriormente, y el ovocito de *Xenopus laevis* tiene una concentración elevada de cloruro por lo que al inyectar WNK4 con NCC en el ovocito no se observa su efecto activador. Para observar el efecto activador es necesario incubar a los ovocitos en una solución baja en cloruro (Bazua-Valenti et al., 2015). KS-WNK1 requiere de la interacción con otra WNK para activar a NCC y R Argaiz mostró que su manera de hacerlo es modificando la sensibilidad a cloruro (fig. 11) WNK4 se encuentra fosforilada (activa) en una solución hipotónica baja en cloro (LCHS) y también en una solución control únicamente al ser coinyectada con KS-WNK1. Lo que sugiere que KS-WNK1

disminuye la sensibilidad a la inhibición por cloruro de WNK4 y hace que WNK4 se mantenga activa incluso en condiciones elevadas de cloro. (Argaiz et al., 2018), de esta observación derivó mi pregunta de investigación sobre ¿cuál es la función de KS-WNK1 *in vivo*?

Durante el tiempo que realicé el doctorado se terminó un trabajo colaborativo de varios grupos internacionales, incluyendo el laboratorio del Dr. Gamba. Este trabajo describe una nueva mutación en familias con FHHt L-WNK1 A634T o KS-WNK1 A227T (misma mutación, pero la isoforma KS-WNK 1 es más corta), esta mutación es en el dominio ácido (sitio de unión a KLHL) pero de WNK1 y no de WNK4 (Louis-Dit-Picard et al., 2020). Por lo tanto, en estas familias lo que debe aumentar es la expresión de

WNK1, sin embargo, el artículo muestra que KS-WNK1 es muy sensible a la degradación por KLHL3 y que L-WNK1 no es sensible (esto fue de hecho parte de la contribución de nuestro grupo al trabajo mencionado) (fig. 12), por lo que sugiere que esta mutación disminuye preferentemente la degradación de KS-WNK1. Este resultado llama la atención, ya que

como se comentó, ambas isoformas son iguales a partir del exón 5, lo que quiere decir que ambas contienen el sitio de unión a KLHL3 (Louis-Dit-Picard et al., 2020).

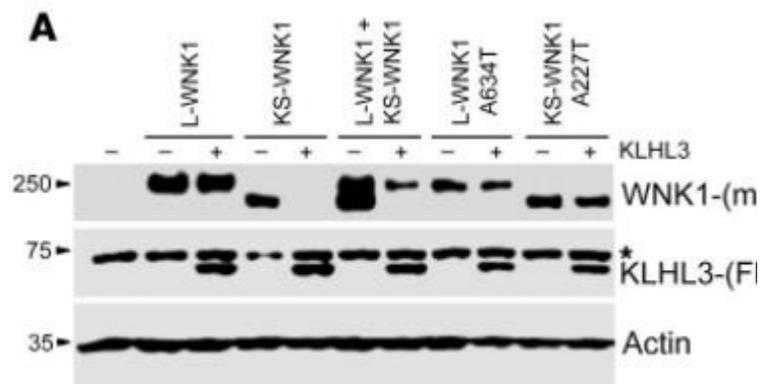


Fig 12. L-WNK1, KS-WNK1, L-WNK1 y KS-WNK1, L-WNK1 A634T o KS-WNK1 A227T se inyectaron con o sin KLHL3. KS-WNK1 es muy sensible a la degradación regulada por KLHL. Incluso al coinyectar L-WNK1 y KS-WNK1 con KLHL3 únicamente KS-WNK1 se degrada. La mutación reportada en L-WNK1 A634T no tiene un efecto en su degradación ya que la isoforma silvestre no es sensible a KLHL3 en contraste la mutación A227T previene la degradación de KS-WNK1. Imagen tomada y modificada de Louis-Dit-Picard et al., 2020

La diferente sensibilidad a la degradación mediada por KLHL de L-WNK1 y KS-WNK1 nos pareció muy interesante y también la estudié como parte de mi proyecto doctoral. El trabajo de Louis-Dit-Picard et al. es clave para entender la función de KS-WNK1 ya que como anteriormente se menciona esta mutación parece no afectar a L-WNK1 lo que sugiere que únicamente aumenta la expresión de KS-WNK1 al disminuir su degradación.

En el trabajo de Louis-Dit-Picard et al. también reportan una familia donde siete individuos de trece tienen una mutación en el dominio ácido de WNK1. Al encontrar esta mutación los autores decidieron secuenciar a otros 26 individuos no relacionados con FHHT donde la mutación causal no había sido encontrada y en 8 de estos individuos, encontraron mutaciones en el dominio ácido de WNK1. Estos individuos se presentan con hiperkalemia pero no con hipertensión, lo que sugiere que el fenotipo de esta mutación es menos agresivo.

Con el fin de evaluar este fenotipo se intentó generar esta mutación en ratones, sin embargo, la mutación resultó en una deleción (*Wnk1<sup>+/-delE631</sup>*) en el dominio ácido y este modelo se utilizó para el análisis. Igual que en los humanos los ratones presentaron hiperkalemia y acidosis y aunque no presentaron hipertensión arterial sus niveles de renina estaban disminuidos lo que sugiere que el ratón se encuentra en un estado hipovolémico.

A nivel molecular los ratones muestran una activación de NCC y SPAK (cinasa que activa a NCC explicada más adelante) (fig. 13). Este hallazgo confirma lo anteriormente dicho que la fosforilación de NCC vista en los ratones KS-WNK1 <sup>-/-</sup> debe ser una elevación secundaria por la pérdida de potasio, ya que un exceso de KS-WNK1 se presenta con un fenotipo FHHT.

Es decir, es la forma más leve de FHH con hiperkalemia, sin hipertensión. NCC también se encuentra más fosforilado, lo que muestra la paradoja en modelos transgénicos que tanto el aumento (Louis-Dit-Picard et al., 2020) como la disminución (Hadchouel et al., 2010) de KS-WNK1 causan un aumento en la fosforilación de NCC. A diferencia del ratón KS-WNK1-KO de Hadchouel et al., en

este caso del ratón  $Wnk1^{-+/delE631}$  tiene hiperkalemia, lo que sugiere que el aumento en NCC es primario, suficiente para generar hiperkalemia y con evidencia de retención de sal (actividad plasmática de renina baja), pero no lo suficiente como para llegar a hipertensión.

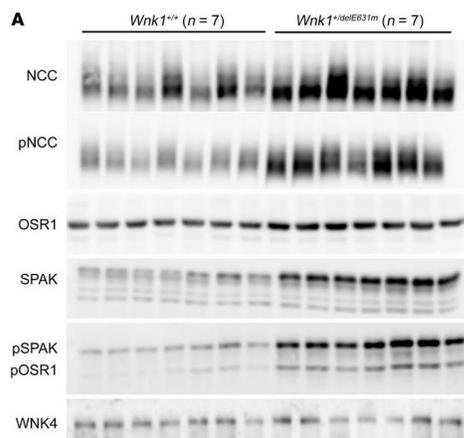


Fig 13 Ratones con una mutación en el dominio ácido de WNK1 ( $Wnk1^{+/delE631}$ ) la fosforilación de NCC y de SPAK se encuentran aumentadas comparadas con ratones silvestres

Una segunda vía de activación de WNK4 es por PKC (Castaneda-Bueno et al., 2017) estimulado por la angiotensina II (AngII) (Castaneda-Bueno et al., 2012) o por el calcio (Bazúa-Valenti et al., 2018)

Como se muestra en la figura 4 la formación de la AngII requiere de renina para convertir el angiotensinógeno en angiotensina I (AngI) y de la enzima convertidora de angiotensina para convertir la AngI en AngII. La renina se secreta por la MD cuando hay una disminución en el flujo esto genera un aumento en la generación de

AngI que es convertida en AngII, por el contrario en cuando el flujo aumenta hay una disminución en la renina lo que disminuye la AngII. (Boron & Boulpaep, 2012). La AngII es el sustrato del receptor I de angiotensina II, cuando el receptor es estimulado promueve la vía de PKC y este a su vez fosforila a WNK4 en sus sitios RRXS que activa la cinasa<sup>3</sup> (Castaneda-Bueno et al., 2017) (fig. 14). De esta vía es importante tomar en cuenta que WNK4 es dependiente lo que quiere decir que la eliminación de WNK4 previene el efecto de la AngII en NCC (Castaneda-Bueno et al., 2012) y también que en hipertensión sensible a volumen (como FHHT) la renina se encuentra disminuida, por lo que se piensa que la AngII esta disminuida y no fosforila a WNK4 en este síndrome.

<sup>3</sup> No se conoce como el sitio RRXS fosforila a la región cinasa de WNK4

## **WNKs**

Como se describió anteriormente las WNKs son una familia de cinasas que forman parte de la cascada de activación de NCC. WNK2 y WNK3 no se encuentran en el DCT (Chen, Chou, & Knepper, 2021) por lo que no hablaremos de ellas. WNK1 contiene dos isoformas: L-WNK1 que contiene una región cinasa en los primeros cuatro exones y KS-WNK1 que contiene un exón 4 alternativo de 30 aminoácidos.

A partir del exón 5 ambas isoformas son iguales y tienen similitudes a WNK4. En este párrafo hablaremos sobre dos de los dominios similares de estas tres cinasas. Primero, el dominio ácido. Este sitio representado en la figura 7 también está presente en WNK4, es el sitio de interacción con KLHL3 (Ohta et al., 2013; Shibata et al., 2013) y una mutación en este sitio impide la degradación de la cinasa involucrada (Louis-Dit-Picard et al., 2020; Wilson et al., 2001).

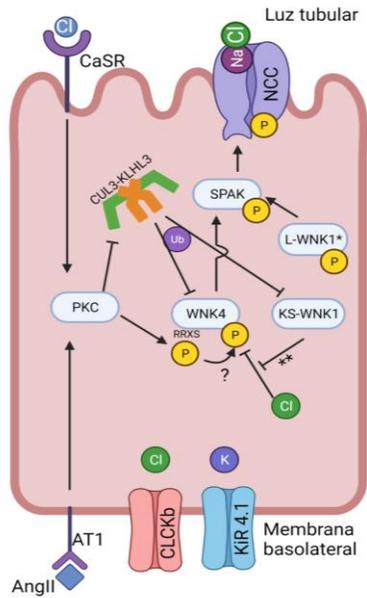


Fig. 14 Modelo actual de la regulación de NCC. AT1: Receptor 1 de angiotensina II, AngII: Angiotensina II, CaSR: Receptor sensor de calcio. PKC: Fosfocinasa C, P: fosforilación, RRXS: sitio de fosforilación por PKC, Ub: Ubiquitina, \*L-WNK1 solo se expresa en el TCD en situaciones patológicas. \*\* Efecto mostrado *in vitro* Creado con BioRender.com

El segundo sitio permite a las WNKs formar hetero-dímeros y homo-dímeros y es gracias a un sitio HQ que les permite interactuar entre ellas. (Thastrup et al., 2012). La eliminación de este sitio impide la interacción entre ellas esto es de suma relevancia ya que se ha mostrado que *In vitro* la WNK4 forma homo-dímeros o hetero-dímeros con KS-WNK1 y los homo-dímeros no se encuentran fosforilados en el ovocito de *Xenopus laevis*, a menos que sean incubados en una solución baja en cloruro. En contraste en los hetero-dímeros WNK4-KS-WNK1, WNK4 se encuentra fosforilada, independientemente de la concentración de cloruro, lo que sugiere que la interacción entre estas dos cinasas es lo que disminuye la inhibición por cloruro de WNK4 (Argaiz et al., 2018).

### Modelo de activación de NCC

El modelo actual de activación de NCC se representa en la figura 14. Como se describió anteriormente WNK4 se activa por una depleción en el cloruro intracelular (Bazua-Valenti et al., 2015) o por el aumento de fosfocinasa C (PKC) secundaria al aumento en la angiotensina II (Castaneda-Bueno et al., 2017; Castaneda-Bueno & Gamba, 2012) o el calcio en la luz tubular (Bazúa-Valenti et al., 2018). WNK4 a su vez fosforila a SPS1-related proline/alanine-rich serine-threonine kinase (SPAK) quien fosforila a NCC (Richardson et al., 2008; Vitari, Deak, Morrice, & Alessi, 2005). NCC al fosforilarse se activa y promueve la reabsorción de sal en el TCD (Pacheco-Alvarez et al., 2006). WNK4 y KS-WNK1 se regulan en cantidad por el complejo ubiquitin ligasa CUL-3-KLHL-3. Este complejo es fosforila (inhibe) por

PKC y no tiene efecto sobre L-WNK1 quien únicamente se expresa en el TCD en situaciones patológicas. (Chen et al., 2021; Louis-Dit-Picard et al., 2020; Shibata et al., 2013).

En el momento actual sabemos que L-WNK1 no se expresa en el TCD, con base a las siguientes observaciones:

1. Existen varios modelos animales que se presentan con FHHT descritos en (Ostrosky-Frid et al., 2019) y en todos los modelos que se han cruzado con un modelo WNK4 knockout, el fenotipo se previene. La única excepción es el modelo generado por una mutación en el intron 1 de *WNK1* (Chavez-Canales et al., 2014) en el que se presenta con FHHT, a pesar de no tener WNK4, lo que sugiere que la activación de NCC por L-WNK1 es independiente a WNK4<sup>4</sup>

2. WNK4 es más sensible a la inhibición por cloruro intracelular que L-WNK1 (Bazua-Valenti & Gamba, 2015), lo que le da la capacidad de regular más finamente a NCC previniendo una sobreactivación. Si L-WNK1 estuviese presente en el TCD causaría que NCC se mantenga activo aún en niveles de cloruro que inhiben a WNK4 y causaría hipervolemia, hipertensión e hiperkalemia. Lo que sucede cuando se expresa patológicamente en el TCD.

3. L-WNK1 no es degradado a través de la señalización de KLHL3 a diferencia de KS-WNK1 (Louis-Dit-Picard et al., 2020) por lo que L-WNK1 no se regula en cantidad por KLHL3, lo que mantendría activo a NCC continuamente causado FHHT.<sup>5</sup>

---

<sup>4</sup> Existe un modelo de SPAK constitutivamente activo (Grimm, Coleman, Delpire, & Welling, 2017) que genera FHHT, este modelo no se ha estudiado con WNK4 knock out pero probablemente tampoco se prevenga el fenotipo ya que SPAK es río abajo de WNK4.

<sup>5</sup> Esta conclusión se saca extrapolando las familias con delección del intron 1 de WNK1 donde que aumenta la expresión de esta cinasa a nivel renal y se presenta FHHT. (Wilson et al., 2001).

4. En el TCD hay 80 veces más mRNA de KS-WNK1 que de L-WNK1. Este estudio se realizó por microdissección lo que podría generar contaminación de las muestras por los segmentos aledaños (Vidal-Petiot et al., 2012).

5. El resultado confirmatorio se encuentra en un reciente reporte de secuenciación de mRNA de célula única que muestra que WNK2 y WNK3 no se co-expresan con NCC, WNK4 si se expresa y WNK1 se expresa 10 veces más que en otros segmentos de la nefrona. La única isoforma de WNK1 en este segmento es KS-WNK1 (Chen et al., 2021).

Ahora que sabemos que KS-WNK1 es la única isoforma de WNK1 que se expresa en el TCD y su cantidad es 10 veces más abundante que en otras porciones de la nefrona surge la pregunta ¿Por qué no ha sido posible visualizarla a nivel proteico *in vivo*?

La falta de anticuerpos específicos para KS-WNK1 ha sido un impedimento para poder evaluar a KS-WNK1. Esto ocurre porque la única región distinta a L-WNK1 es la región 4a que tiene un alto contenido de cisteínas, por lo que no ha sido posible generar un anticuerpo que la reconozca. L-WNK1 no se expresa en el TCD, pero si se encuentra en el riñón, por lo que todos los anticuerpos que se podrían utilizar para reconocer a KS-WNK1 en su región COOH terminal también reconocen a L-WNK1. Esto ha evitado que KS-WNK1 pueda ser evaluado a nivel proteico.

Otra probable respuesta es su sensibilidad a la degradación mediada por KLHL3. Al extrapolar los resultados de la expresión *in vitro* podemos concluir que la expresión y actividad de KLHL3 regula a KS-WNK1. El ovocito de *Xenopus laevis* no expresa KLHL3 (Karimi et al., 2018) por lo que KS-WNK1 ha podido ser evaluado en este modelo. La coinyección en los ovocitos de KS-WNK con KLHL3 previene la visualización KS-WNK1. (Louis-Dit-Picard et al., 2020). En contraste, en las células HEK 293 que si expresan KLHL3 constitutivamente (Uhlen et al., 2015) KS-WNK1 no se expresa.<sup>6</sup> *In vivo* en el TCD se expresa KLHL3 en mayor cantidad

---

<sup>6</sup> En experimentos en nuestro laboratorio no se ha podido expresar KS-WNK1 en las células HEK-293 probablemente por la expresión endógena de KLHL3. Boyd-Shuvarski muestra la formación de puntos de KS-WNK1 en células HEK-293. No está reportado en el artículo pero probablemente utilizó una solución baja en

(Louis-Dit-Picard et al., 2012), lo que probablemente cause una degradación continua de KS-WNK1 y haga que la regulación de la actividad de KLHL3 regule la expresión de KS-WNK1. El balance entre la expresión y degradación de KS-WNK1 requiere una constante síntesis de mRNA. Sin embargo, esto no explica la diferencia entre la sensibilidad a la degradación por KLHL3 de KS-WNK1 y L-WNK1. En esta tesis se muestra la importancia en el exón 4a de KS-WNK1 en la sensibilidad a KLHL3.

El exón 4a de KS-WNK1 es una región conservada desde los coacervados, contiene 30 aminoácidos, de los cuales 6 son cisteínas y también posee un motivo de 5 aminoácidos hidrofóbicos (fig. 6a del artículo). KS-WNK1 *in vitro e in vivo* en situaciones de hipokalemia toma una conformación de puntos donde interactúa con otras cinasas como SPAK y WNK4. Esta formación de puntos desaparece en condiciones de potasio normales, o al eliminar KS-WNK1. Que estos puntos que se formen en hipokalemia y se asocien con WNK4 y SPAK sugiere que existe un mecanismo por el cual KS-WNK1 promueve la retención de potasio. Aunque no se ha mostrado el mecanismo probablemente involucra la activación de NCC, por lo que se piensa que la formación de puntos en KS-WNK1 es un subrogado de su actividad. (Boyd-Shiwarski et al., 2018; Thomson et al., 2020).

Boyd-Shiwarski et al. también mostraron que la región 4a de KS-WNK1 es necesaria para la formación de puntos al igual que algunos de los motivos conservados. Para mostrar esto las células HEK 293 se transfectaron con KS-WNK1 ó con 5 distintas clonas descritas en el siguiente párrafo y después evaluaron la formación de puntos de cada clona por medio de inmunofluorescencia (fig. 15).

Las mutaciones que se realizaron en KS-WNK1 en la región 4a fueron las siguientes. La eliminación del exón 4a ( $\Delta 30$ ) que como se observa en la figura 15, hace que se pierda la formación de puntos. La siguiente modificación fue mutar las 6 cisteínas por serinas. Esto también impide la formación de puntos, en contraste la formación de puntos no se ve afectada con la tercera clona en donde únicamente

---

potasio para promover la formación de puntos. Como se explica anteriormente la depleción de potasio causa una inhibición (fosforilación de KLHL3) y esto probablemente le permitió expresar a KS-WNK1.

se mutó a las 2 cisteínas periféricas por serinas. La mutación de las 4 serinas centrales tuvo un efecto modesto en la formación de puntos y por último la mutación del dominio ácido por glutaminas también impidió la formación de puntos (Boyd-Shiwerski et al., 2018). La función de estas clonas no ha sido explorada ni su degradación por lo que decidimos hacerlo como parte de mi proyecto doctoral.

Por último, este proyecto derivó de la observación que los pacientes con FHHT se presentan con hiperkalemia y como se explica anteriormente, la elevación del potasio intracelular promueve la acumulación de cloruro intracelular lo que debería inhibir a WNK4. Los pacientes con FHHT también se presentan con hipertensión sensible a volumen lo que quiere decir que su renina y angiotensina II se encuentran disminuidas, un segundo estímulo para que WNK4 este inactiva, a pesar de tener hiperkalemia y niveles bajos de Angiotensina II. Sin embargo, NCC en los pacientes con Síndrome de FHHT permanece activo.

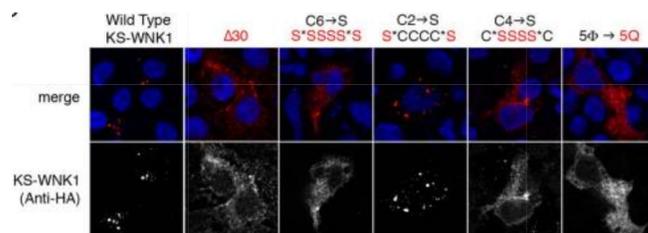


Fig 15. El papel de la región 4a y de los motivos conservados en esta región (cisteínas y aminoácidos hidrofóbicos). Como se describe en el texto la eliminación del exón 4a ( $\Delta 30$ ) la mutación de las seis cisteínas (C) por serinas (S) y la mutación de los 5 aminoácidos hidrofóbicos ( $\Phi$ ) por glutaminas (Q) previene la formación de puntos. La mutación de las 4 (C) centrales por (S) tiene un efecto moderado y la mutación de las 2 (C) periféricas por (S) no previene la formación de puntos. Figura tomada de Boyd-Shiwerski et al 2018.

Una probable respuesta a esta incógnita es KS-WNK1 (Kidney Specific-WNK1): que como se describió anteriormente disminuye *in vitro* la sensibilidad de WNK4 al cloruro intracelular, sin embargo, *in vivo* no se conoce su función (Argaiz et al., 2018).

### **Modelos animales**

Aparte del modelo KS-WNK1<sup>-/-</sup> descrito anteriormente hecho por Hadchouel et al, existe otro modelo KS-WNK1<sup>-/-</sup>, nombrado KS-WNK1-4a-KO. En este modelo eliminaron el exón 4a para prevenir la expresión de KS-WNK1. Ambos modelos presentan un aumento en la fosforilación de NCC, pero un potasio disminuido y aunque no de

manera significativa. La hipokalemia sucede aún en una dieta alta en potasio. Como se mencionó anteriormente la activación primaria de NCC (FHHT) causa hiperkalemia (Modelo WNK1-+/delE631), pero el potasio bajo también eleva NCC para evitar una hipokalemia más severa (lo que sucede en ambos modelos donde KS-WNK1 fue eliminado). Por ello basarse únicamente en la activación de NCC como subrogado de la función de KS-WNK1 puede llevar a conclusiones erróneas (Cheng, Truong, Baum, & Huang, 2012; Hadchouel et al., 2010; Liu et al., 2011).

A parte de los modelos de KS-WNK1 utilizamos otros dos modelos. Al inicio de mi proyecto doctoral obtuvimos el modelo de Lalioti et al (Lalioti et al., 2006) en el que se insertaron 2 copias del gen WNK4 con la mutación Q562E en el dominio ácido (WNK4<sup>PHAll</sup>), por lo que el ratón tiene un total de 4 copias del gen de WNK4 (2 silvestres y 2 mutadas) y presenta el fenotipo FHHT. En el trabajo original a estos ratones los cruzaron con ratones que carecen de NCC (Schultheis et al., 1998) con lo que se previno por completo el fenotipo FHHT (Lalioti et al., 2006; S. S. Yang et al., 2007).

El plan inicial fue cruzar los ratones WNK4<sup>PHAll</sup> generados por Lalioti et al (Lalioti et al., 2006) y con los ratones KS-WNK1<sup>-/-</sup> generados por Hadchouel et al, descritos anteriormente. Durante el proyecto existieron algunos factores que nos hicieron cambiar de modelo, el primero es que los modelos tienen hiperkalemia y actualmente se sabe que la hiperkalemia promueve la actividad de KLHL3 y como se mostrará más adelante esto causaría un aumento en la degradación de KS-WNK1 lo que dificultaría la evaluación de un fenotipo doble transgénico WNK4-PHAll+KS-WNK1<sup>-/-</sup> que no expresa KS-WNK1 al compararlo con un fenotipo WNK4-PHAll que si expresa KS-WNK1 pero que se degradó por la activación de KLHL3. La segunda razón fue que la genotipación de este modelo resultó ser muy complicada ya que requeríamos distinguir si tienen 2, 3 ó 4 copias del gen para distinguir silvestre, heterocigoto (HetWNK4<sup>PHAll</sup>) u homocigoto (TgWNK4<sup>PHAll</sup>).

Con el fin de resolver este problema se estandarizó el genotipaje por medio de la enzima de restricción BSP1286i ya que las copias PHAll contienen un sitio de restricción para esta enzima, como se describe en el artículo original. Sin embargo,

esta prueba no diferencia entre los HetWNK4<sup>PHAI</sup> de los TgWNK4<sup>PHAI</sup>, por lo que realizamos una PCR y el fragmento amplificado se secuenció y se analizó el electroferograma (fig. 16), para poder diferenciar HetWNK4<sup>PHAI</sup> de los TgWNK4<sup>PHAI</sup> (Lalioti et al., 2006)

Simultáneamente decidimos cruzar los ratones KS-WNK1<sup>-/-</sup> con ratones KLHL<sup>R528H/R528H</sup>, enviados por el Dr. Alessi al laboratorio del Dr. Gamba para evaluar su fenotipo. El modelo KLHL<sup>R528H/R528H</sup> fue previamente reportado por Susa et al. Esta mutación impide la unión de KLHL3 con el dominio ácido de WNK4 lo que evita la degradación de esta cinasa. Los ratones KLHL<sup>R528H/R528H</sup> se presentan con hipertensión en una dieta alta en sal, hiperkalemia, hipercloremia, acidosis metabólica y al cruzarlos con ratones WNK4<sup>-/-</sup> se previene este fenotipo, (Susa et al., 2014; Susa et al., 2017) lo que significa que KLHL3 degrada a WNK4 y cuando la actividad de KLHL3 se afecta la cantidad de WNK4 aumenta y eso es lo que causa FHHT. Este modelo tiene 2 ventajas, la mutación en KLHL3 también previene la degradación de KS-WNK1, lo que no sucede con el WNK4-<sup>PHAI</sup> y es un modelo que puede ser genotipado de una manera más rápida y precisa por medio de una PCR.

Los ratones KLHL<sup>R528H/R528H</sup> enviados por el Dr. Alessi se hicieron por medio de recombinación homóloga por TactonicArtemis. El vector se construyó de genoma de ratón y el sitio que contiene la mutación deseada, los sitios de recombinación y los sitios de selección positiva y negativa se insertaron. El vector se transfeció en células embrionarias de ratones TaconicArtemis C57BL/N Tac. Las clonas con recombinación homóloga se aislaron por medio de selección positiva con (PuroR) [Casete de resistencia a Puromicina] y negativa con (TK) [Timidina kinasa]. Los blastocistos se tomaron de úteros de ratones embarazadas BALB/c el día 3.5 post coito y se inyectaron con 10-15 células con recombinación homóloga, ocho blastocistos fueron inyectados en cada cuerno uterino 2.5 días post coito en ratas Naval Medical Research Institute (NMRI) pseudoembarazadas. El quimerismo se evaluó en la primera generación y los ratones con un alto nivel de quimerismo se cruzaron con ratones C57BL/6-Tg(CAG-FIpe)<sup>2</sup> Arte para eliminar el casete de

resistencia de puromisina. Esto produjo ratones que expresan constitutivamente la mutación en la proteína KLHL3. El sitio FRT quedó localizado en una región no codificante del genoma y es de aproximadamente 80 pares de bases por lo que la genotipificación de los ratones se realiza con una PCR utilizando los primer 1 (5'-GATACCCACTGGCATTGG-3') and primer 2 (5'-GGTAAGGGCAGCATTACTGG-3'). El alelo silvestre genera un producto de 308 pares de bases y el alelo mutado de 383 pares de bases (figura suplementaria 1 del artículo).

La tabla 1 y la figura 1 y 2 del artículo presentado como proyecto doctoral caracterizan este modelo.

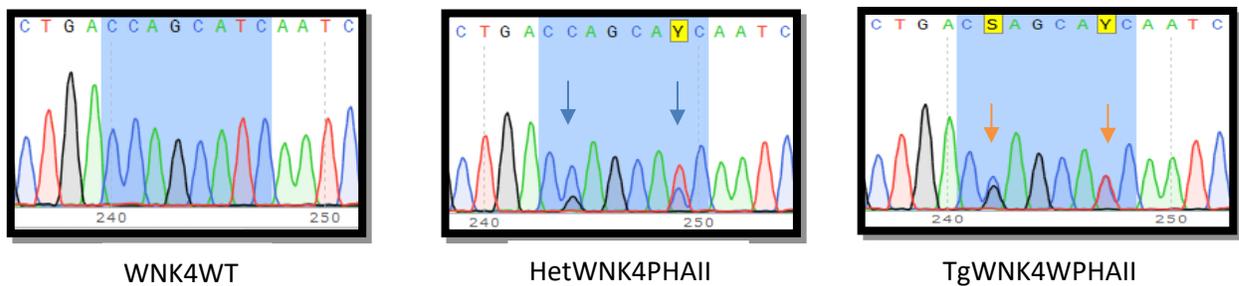


Fig 16. El genotipaje por secuenciación es útil para distinguir los genotipos de WNK4. En el ratón silvestre (WT) se puede observar que solamente existe una curva de señal, en el TgWNK4PHAI se observan 2 curvas de señal en el mismo nivel (flecha naranja) y los HetWNK4PHAI muestran 2 curvas de señal, pero desfasadas (flecha azul).

Nota: Como parte de mi doctorado el proyecto se dividió en dos partes ambas relacionados con la función de KS-WNK1 la primera parte es la función de KS-WNK1 *in vivo* y la segunda es la degradación de KS-WNK1 *in vitro* y la función del exón 4a. Cada parte del proyecto tiene un enfoque diferente por lo que cada una tiene una pregunta, hipótesis y objetivos distintos que se presentan a continuación.

### Pregunta

¿Cuál es el papel de la isoforma KS-WNK1 en la regulación de la cinasa WNK4 y el cotransportador renal de NaCl *in vivo*?

## Hipótesis

La presencia de la isoforma KS-WNK1 en el túbulo contorneado distal es necesaria para que la cinasa WNK4 se mantenga activa en FHHt a pesar de los niveles elevados de potasio (y cloruro intracelular) y los niveles disminuidos de angiotensina II.

## Objetivos

### **Objetivo general**

Entender el efecto de KS-WNK1 sobre NCC y WNK4 *in vivo* utilizando un modelo de hipertensión hiperkalémica familiar.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar si el efecto activador de KS-WNK1 sobre NCC se debe a la interacción con WNK4 como ha sido mostrado *in vitro*.
- Analizar el fenotipo de los ratones TgWnk4 PHAI1, KLHL<sup>R528H/R528H</sup> y KS-WNK1<sup>-/-</sup>.
- Cruzar a los ratones KLHL<sup>R528H/R528H</sup> con los ratones KS-WNK1<sup>-/-</sup>, para obtener el doble transgénico y analizar su fenotipo.
- Medir valores bioquímicos en los ratones KLHL<sup>R528H/R528H</sup> -KS-WNK1<sup>-/-</sup> y compararlos con los valores de los ratones silvestres, KLHL<sup>R528H/R528H</sup> y KS-WNK1<sup>-/-</sup>.
- Analiza la expresión de KS-WNK1 en una dieta baja en potasio

## Pregunta

¿Por qué a pesar de que L-WNK1 y KS-WNK1 tienen el mismo sitio de unión a KLHL3, KS-WNK1 si es sensible a la degradación mediada por KLHL3 en contraste con L-WNK1?

## **Hipótesis**

El exón 4a de KS-WNK1 es una región conservada desde el celacanto hasta el humano que no se encuentra en L-WNK1 y permite que KS-WNK1 sea sensible a la degradación mediada por KLHL3.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Evaluar la causa de la distinta sensibilidad a KLHL3 de KS-WNK1 comparada con L-WNK1

### ***Objetivos específicos***

- Evaluar el papel del exón 4a en la degradación mediada por KLHL3
- Evaluar el rol del exón 4a en la actividad de KS-WNK1
- Evaluar los motivos conservados de la región 4a de KS-WNK1 en la función y en la degradación de KS-WNK1
- Comparar la función de las mutantes de KS-WNK1 con la formación de puntos publicados por Boyd-Shiwarski et al. y Thomson et al.
- Evaluar la función del exón 4a de KS-WNK1 así como de las cisteínas y del motivo hidrofóbico presente en esta región en la degradación mediada por KLHL3 mediante expresión de proteína y experimentos de captación.

## **Métodos**

Los métodos utilizados para la publicación están descritos en (Ostrosky-Frid et al., 2021)

## **Resumen de resultados**

Todos los resultados que se presentan ya fueron publicados en (Ostrosky-Frid et al., 2021), a continuación, un resumen de ellos.

### ***Los ratones KLHL3 knockin presentan el fenotipo de hipertensión hiperkalémica familiar.***

Los ratones KLHL3 knockin generados por TaconicArtemis que contienen la mutación KLHL-R528H, (mutación previamente descrita (Susa et al., 2014)) fueron analizados en condiciones basales. Dichos ratones presentan un fenotipo FHHT con hiperkalemia, acidosis metabólica, e hipercloremia (tabla 1 del artículo). También por medio de western blot evaluamos la cantidad y fosforilación de WNK4, NCC, SPAK e ENaC en ratones silvestres (WT), comparado con KLHL3<sup>+/+</sup>, heterocigotos KLHL3<sup>+/R528H</sup> y homocigotos KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>. Como se esperaba WNK4 y NCC se encuentran aumentados en los heterocigotos y aún más en los homocigotos. El incremento en la cantidad de SPAK comparado con los silvestres únicamente se aprecia en los homocigotos, pero el aumento en la fosforilación es evidente tanto en los heterocigotos como en los homocigotos. Alpha-ENaC se encuentra disminuido en los heterocigotos y en los homocigotos (figura 1 del artículo).

Para finalizar con la caracterización de los ratones se realizó una inmunofluorescencia con SPAK, fosfoSPAK (pSPAK) y alpha ENaC, similar a la figura 1 SPAK y pSPAK se encuentran aumentados en los modelos heterocigoto y homocigoto y Alpha-ENaC se encuentra disminuido. Este resultado es más evidente en la corteza renal que en la médula (figura 2 del artículo).

### ***La cinasa KS-WNK1 es muy sensible a la degradación por la ligasa de ubiquitina CUL3-KLHL3.***

Con el fin de evaluar la función de KLHL3 sobre WNK1 *in vivo* lisamos y evaluamos mediante western blot riñones de ratones silvestres, KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>, KS-WNK1<sup>-/-</sup> y dobles mutantes KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>;KS-WNK1<sup>-/-</sup>. Utilizamos un anticuerpo que reconoce la región COOH de la WNK1. Esto quiere decir que reconoce ambas isoformas. En este experimento pudimos observar en los ratones KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> una banda de un peso esperado para KS-WNK1, que desaparece en los ratones dobles mutantes, lo que sugiere que esa banda es KS-WNK1. También observamos que esta banda no se expresa en condiciones basales lo que puede explicar porque KS-WNK1 no ha sido vista. En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se

observa KS-WNK1 a nivel proteico *in vivo*. En este mismo experimento se utilizó también un anticuerpo que reconoce WNK4 y como es esperado, los ratones que son KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> independientemente de la presencia de KS-WNK1, WNK4 se encuentra elevado (figura 3 del artículo).

### ***La eliminación de KS-WNK1 no previene el fenotipo de FHht en los ratones KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>***

Los valores séricos de electrolitos en ratones silvestres, KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>, KS-WNK1<sup>-/-</sup> y KLHL3<sup>R528H/R528H</sup>; KS-WNK1<sup>-/-</sup> se midieron. Los ratones con la mutación KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> independientemente de la presencia de KS-WNK1 muestran el fenotipo FHht con niveles séricos de potasio y cloruro elevados, así como niveles disminuidos de bicarbonato. Lo que sugiere que KS-WNK1 no tiene un papel fundamental en la patogénesis de FHht (tabla 2 del artículo).

### ***Las cinasas KS-WNK1 y L-WNK1 tienen una distinta sensibilidad a la degradación por CUL-3-KLHL-3***

Como se mostró previamente (Louis-Dit-Picard et al., 2020) KS-WNK1 al expresarse en ovocitos de *Xenopus laevis* con KLHL3 se degrada lo que impide su visualización. En contraste, L-WNK1 es resistente a esta degradación, pero debido a que ambas isoformas muestran el mismo sitio de unión decidimos explorar más esta observación. Iniciamos con un ensayo de captación donde coinyectamos NCC con las cinasas en estudio. Si NCC se activa aumenta la captación de sodio radioactivo al interior del ovocito y esto puede ser medido por un contador de centelleo (figura 4a del artículo).

### ***La región 4a de KS-WNK1 está involucrada en la activación de NCC, así como en la degradación por CUL-3-KLHL-3***

En la figura 4 A mostramos que L-WNK1 y KS-WNK1 activan a NCC y al coinyectar L-WNK1 con KLHL3 esta activación continua. Por el contrario, la activación generada por KS-WNK1 se previene cuando KLHL3 se coinyecta. Esto es similar al western blot publicado en Louis-Dit-Picard et al., 2020 donde KLHL3 únicamente degrada a KS-WNK1, incluso al coinyectar L-WNK1 y KS-WNK1 simultáneamente

con KLHL3. Todas las WNKs contienen una región acídica donde KLHL-3 se une por lo que decidimos evaluar la sensibilidad de cada una de las WNKs a KLHL3. Inyectamos L-WNK1, KS-WNK1, WNK3 y WNK4 con y sin KLHL3. L-WNK1 no se degrada por KLHL3 a pesar de tener el dominio acídico y ser idéntica a KS-WNK1 a partir del exon 5 (Fig 4B del artículo).

Para evaluar la diferencia en la sensibilidad de L-WNK1 y KS-WNK1 a KLHL3 eliminamos el exon 4a de KS-WNK1. Como se muestra en la figura 5 del artículo la eliminación de estos 30 aminoácidos (KS-WNK1-Δ4a) previene la función activadora de KS-WNK1 sobre NCC. Esto se muestra mediante un experimento de captación. En el western blot de la misma figura se ve que KS-WNK1-Δ4a es menos sensible a la degradación mediada por KLHL3 (Fig 5B del artículo) y en la figura 5C del artículo se muestra un análisis densitométrico que resume 4 distintos experimentos.

***Las cisteínas de la región 4a son necesarias para la función de KS-WNK1 pero no para la degradación por CUL-3-KLHL-3***

Al observar que al eliminar la región 4a de KS-WNK1 se previene su función y su degradación decidimos evaluar cada uno de los motivos conservados en la región. Iniciamos con las cisteínas, que mutamos por dos serinas (KS-WNK1-2CxS). La mutación fue en las 2 serinas periféricas posición 9 y 27 y la (KS-WNK1-6CxS) donde mutamos las 6 cisteínas de la región. Todas las mutaciones generadas se presentan en la figura 6A.

La eliminación de las 6 cisteínas (KS-WNK1-6CxS) previene el efecto activador de KS-WNK1 sobre NCC pero no modifica su degradación por la ubiquitina ligasa E3 CUL-3-KLHL-3. En contraste, la eliminación de las 2 cisteínas periféricas KS-WNK1-2CxS no modifica el efecto activador de KS-WNK1 ni la degradación por la ubiquitina ligasa E3 CUL-3-KLHL-3. Esto hace eco a lo mostrado por (Boyd-Shiwarski et al., 2018) donde la KS-WNK1-6CxS no forma puntos y la KS-WNK1-2CxS si los forma al igual que KS-WNK1 (figura 6 B, C y D del artículo).

***La región hidrofóbica es necesaria para la función de KS-WNK1 y para la degradación por CUL-3-KLHL-3***

Mutamos el motivo hidrofóbico (Valina, Fenilalanina, Valina, Isoleusina, Isoleusina) por glutaminas KS-WNK1-5Q. Decidimos utilizar glutaminas ya que en Boyd-Shiwarski et al utilizaron esta mutación para analizar el dominio ácido y reportaron que la KS-WNK1-5Q no es capaz de formar puntos (Boyd-Shiwarski et al., 2018). Nosotros mostramos que esta mutación no activa a NCC (fig 7a) pero tampoco es degradada por KLHL3 (fig 5B y 5C).

***La Valina 11 y la Valina 13 son necesarias para la degradación por CUL-3-KLHL-3***

Al final decidimos mutar cada uno de los aminoácidos de la región hidrofóbica por alaninas para evaluar la función específica de cada aminoácido sin modificar la polaridad de la región. La mutación de las valinas (11 y 13) disminuye el efecto activador de KS-WNK1 sobre NCC y al mismo tiempo disminuye la sensibilidad de la KS-WNK1 a KLHL3. El cambiar el resto de los aminoácidos en esta región no tiene efecto en la activación o en la degradación por KLHL3 (figura 8 a, b y c).

***La expresión de KS-WNK 1 se incrementa en una dieta baja en potasio.***

De acuerdo a lo mostrado en la figura 3 del artículo donde KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> no degrada a KS-WNK1 lo que permite su visualización a nivel proteico, y aunado a lo mostrado por Ishizawa et al, 2016 que una dieta baja en potasio fosforila a KLHL3 en el sitio de unión a WNK4 e inhibe su actividad, decidimos evaluar la expresión de KS-WNK1 en una dieta baja en potasio. La expresión de KS-WNK1 aumentó lo que sugiere que KS-WNK1 tiene una función en momentos de depleción de potasio. La expresión de KS-WNK1 en dieta baja en potasio es aún más aparente en ratones KLHL3<sup>+R528H</sup> (figura 9 a y b del artículo) sin embargo, este hallazgo está fuera del alcance de este proyecto. En el laboratorio del Dr. Gamba se continuará investigando la función de KS-WNK1 en niveles bajos de potasio.

## Discusión

La hipótesis original del proyecto era que la isoforma KS-WNK1 es necesaria para que la cinasa WNK4 se mantenga activa en FHht. Sin embargo, como se muestra en la tabla 2 del artículo, los ratones  $KLHL3^{R528H/R528H}$  presentan hiperkalemia, hipercloremia y un bicarbonato disminuido compatible con Síndrome de Gordon, independientemente de la presencia de KS-WNK1. Esto sugiere que la hipótesis no es verdadera y que KS-WNK1 no es necesaria para que la cinasa WNK4 se mantenga activa en FHht. Sin embargo, en este estudio encontramos hallazgos importantes para entender la función de KS-WNK1, así como su degradación y no podemos descartar que KS-WNK1 sea un activador de NCC. Estos hallazgos están descritos a continuación.

Al igual que el modelo  $KLHL3-R528H$  descrito por Susa et al. (Susa et al., 2014), en nuestro modelo los ratones  $KLHL3^{R528H/R528H}$  presentan hiperkalemia, hipercloremia y acidosis metabólica (tabla 1 del artículo). Sin embargo, los ratones no desarrollan hipertensión arterial (datos no mostrados). También demostramos que la WNK4 aumenta de manera dosis dependiente en los ratones  $KLHL3^{+/R528H}$  y  $KLHL3^{R528H/R528H}$  comparados con los silvestres, lo que reafirma que  $KLHL3$  degrada a WNK4. El incremento de la cantidad y fosforilación de NCC y SPAK cuando WNK4 no se degrada reafirman el modelo actual de activación de NCC donde WNK4 fosforila a SPAK quien a su vez fosforila a NCC. La activación de NCC promueve la reabsorción de sodio en el TCD y disminuye la cantidad que llega río abajo para ser transportada por ENaC, lo que disminuye la expresión de ENaC.

En nuestro conocimiento, el artículo publicado con estos resultados es el primero que muestra KS-WNK1 a nivel proteico en un experimento *in vivo* y esto únicamente fue posible al prevenir la degradación mediada por  $KLHL3$  ya sea por una mutación inactivante o por la depleción del potasio. Un impedimento para evaluar la expresión de KS-WNK1 ha sido que difiere de L-WNK1 únicamente en el dominio amino terminal. Pero debido al alto número de cisteínas en esta región la generación de

un anticuerpo que la detecte no es factible. Cruzar los ratones KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> con KS-WNK1<sup>-/-</sup> hizo posible la visualización de KS-WNK1 a nivel proteico ya que al usar un anticuerpo pan-WNK1 (también detecta L-WNK1) mostró una banda en los KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> que desaparece en los ratones dobles mutantes KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> con KS-WNK1<sup>-/-</sup> y que no está presente en los ratones KLHL3 silvestres. Esto sugiere que la degradación de KS-WNK1 por KLHL3 es un proceso constante y previene su visualización.

Una segunda manera de observar KS-WNK1 *in vivo* a nivel proteico (figura 9 del artículo) es estresar al sistema por medio de una dieta baja en potasio que como describimos en la introducción promueve la fosforilación e inactivación de KLHL3. Esto promueve un aumento en KS-WNK1 lo que sugiere que KS-WNK1 tiene una función en estados bajos en potasio. Actualmente esta función se está investigando en el laboratorio.

Finalmente, en este estudio se muestra que KS-WNK1 es más sensible a la degradación mediada por de CUL3-KLHL3 que L-WNK1. Ya que ambas isoformas son idénticas a partir del exón 5 incluyendo el dominio ácido (sitio de unión de KLHL3) y que probablemente la L-WNK1 no se expresa en el TCD decidimos analizar las distintas porciones del exón 4a. Como se muestra en los resultados, la eliminación total del exón 4a (KS-WNK1-Δ4a) previene el efecto activador sobre NCC y la sensibilidad a la degradación por CUL3-KLHL3.

Para evaluar los aminoácidos en la región 4a que están relacionados con la función y la degradación, decidimos mutar las cisteínas por serinas y la región hidrofóbica por glutaminas de la misma manera que lo hicieron en Boyd-Shiwarski et al., 2018 con resultados similares a los reportados. Así, KS-WNK1-6CxS no activa a NCC aunque KLHL3 si es capaz de degradarla. KS-WNK1-2CxS activa a NCC y también se degradada por la ligasa de ubiquitina CUL3-KLHL3. Boyd-Shwarski muestra que KS-WNK1 forma puntos en cuando el potasio sérico disminuye. La función de estos puntos continua bajo investigación, pero la KS-WNK1-6CxS no es capaz de formar puntos, por el contrario, KS-WNK1 2CxS si forma puntos.

La mutación del dominio hidrofóbico (Valina, Fenilalanina, Valina, Isoleucina, Isoleucina) presente en la región 4a (KS-WNK1-5Q) previene la función activadora y la degradación de KS-WNK1, lo que da relevancia a este motivo conservado en un gran número de animales terrestres. Con el fin de llegar a fondo en esta región de 5 aminoácidos mutamos cada uno por alanina para evaluar la función individual de cada aminoácido y la eliminación de las valinas disminuye tanto la función de KS-WNK1 sobre NCC como la degradación. Esto nos hace pensar en la relevancia de este sitio y porque se ha conservado en la mayoría de las especies terrestres.

Este proyecto resalta la función activadora de KS-WNK1 que sucede en niveles bajos de potasio, pero deja sin resolver la incógnita de porque WNK4 no se encuentra inhibida con la hiperkalemia y niveles bajos de angiotensina II en FHHT.

Esto puede deberse que los homo-dímeros WNK4-WNK4 *in vivo* tengan una función activadora, que los niveles de cloruro dentro del TCD no se vean afectados en FHHT o a que exista otra molécula capaz de activar a NCC directa o indirectamente.

## **Conclusiones**

La función de KS-WNK1 ha sido explorada por distintos investigadores por casi 20 años desde su descubrimiento en 2003. En un inicio se pensó que era inhibidor cuando el modelo de NCC no se entendía por completo, lo que hace su historia muy interesante ya que mientras el modelo de activación de NCC no fue entendido KS-WNK1 se consideró un inhibidor.

En los últimos 20 años se ha aclarado como el NCC se activa y quienes son los jugadores principales. Esto ha sido gracias a la unión entre la ciencia básica con la cristalización de WNK1, los experimentos en ovocito y los modelos animales, y la clínica al entender la causa del Síndrome de EAST, los estudios genéticos sobre mutaciones en las WNKs, KLHL3 y en Cul3 y todo esto con un gran rigor metodológico.

El descubrimiento de la regulación de las WNKs por cloruro aclaró el panorama y ayudo a entender que WNK4 es un activador. KS-WNK1 continuó siendo

considerado como un inhibidor. Sin embargo, debido a que el paradigma cambio, la función KS-WNK1 tuvo que ser reevaluada y mostró ser un activador *in vitro*. Los modelos animales son necesarios para entender la fisiología como un todo y por ello decidimos evaluar la función de KS-WNK1 *in vivo* en el modelo FHHt ya que KS-WNK1 *in vitro* reduce la sensibilidad de WNK4 a cloruro intracelular y el modelo FHHt tiene el cloruro intracelular elevado. Este modelo resultó no ser el ideal ya que nos dimos cuenta de que KS-WNK1 se expresa en niveles bajos de potasio y no elevados como en FHHt. En este proyecto no logramos mostrar que KS-WNK1 es un activador, sin embargo, tampoco resulto ser un inhibidor. En las perspectivas generó una hipótesis de cuál puede ser la función de KS-WNK1 en niveles bajos de potasio, pero eso será parte del siguiente proyecto a realizar en el laboratorio.

Este proyecto además de aclarar la expresión del KS-WNK1 analiza la sensibilidad a KLHL3. Esta sensibilidad puede explicar porque el mRNA es tan elevado ya que la degradación es continua y debido a que no tiene región cinasa probablemente esta es su única manera de ser regulado.

Los sitios conservados de la región 4a (cisteínas y motivo hidrofóbico) han sido previamente descritos con respecto su importancia para que se formen puntos en el TCD en condiciones de potasio bajo. Sin embargo, poco se conoce de estos sitios y su relevancia en la función de KS-WNK1. Este proyecto aportó en explicar la función de estos sitios tanto en la función de KS-WNK1 como en la degradación mediada por la ligasa de ubiquitina Cul-3-KLHL-3. Estos sitios están muy conservados en los animales terrestres, lo que sugiere que han sido necesarios para la regulación del volumen, potasio y sodio durante la evolución. En específico, este artículo muestra que las valinas 11 y 13 del motivo hidrofóbico son necesarias para la función y degradación, mientras que las cisteínas son necesarias para la función, pero no para la degradación.

Estudiar de la función de KS-WNK1 en la condición de depleción de potasio será el siguiente paso para entender la función de KS-WNK1 sobre WNK4 y NCC.

## Perspectivas

Los resultados de la caracterización del modelo KLHL3<sup>R528H/R528H</sup> refuerzan el modelo actual de activación de NCC donde WNK4 es la cinasa principal y esta fosforila a SPAK quien a su vez fosforila a NCC. WNK4 se degrada por KLHL3 y la mutación R528H en KLHL3 previene su interacción con WNK4 lo que aumenta su cantidad. En este estudio también se muestra que *in vivo* la eliminación de KS-WNK1 no previene significativamente la fosforilación de WNK4 para prevenir el fenotipo de FHHT. Sin embargo, aún existe evidencia que KS-WNK1 puede ser activador de NCC y de WNK4 y se enlistan a continuación.

WNK4 es muy sensible a KLHL3 al igual que KS-WNK1. La mutación en el dominio ácido de WNK4 genera FHHT menos grave que la mutación en KLHL3 (Boyden et al., 2012) y la mutación en el dominio ácido de WNK1 (probablemente KS-WNK1 ya que como se muestra a previamente L-WNK1 no se expresa en el TCD) también causa FHHT aunque leve con hiperkalemia leve y niveles disminuidos de renina sin causar hipertensión arterial pero sugiere hipervolemia (Louis-Dit-Picard et al., 2020). Lo descrito anteriormente sugiere que KS-WNK1 tiene un efecto activador sobre NCC, aunado con que KS-WNK1 aumenta con una dieta baja en potasio, al igual que la función de NCC y la presión arterial. Esto sugiere que KS-WNK1 tiene un efecto regulador en condiciones de depleción de potasio.

Lo que genera una nueva incógnita porque la expresión de KS-WNK1 aumenta en niveles bajos de potasio donde la WNK4 está activa y al igual que NCC.

Una probable respuesta a la incógnita mostrada que explicaría los hallazgos *in vitro* en armonía con los hallazgos *in vivo* es la evolución.

Actualmente el humano se alimenta tres veces al día, sin embargo, esto es único de la especie, así como un cambio reciente de comportamiento.

Los animales carnívoros que dependen de la cacería tienen una gran carga de potasio al ingerir a su presa posterior a días de ayuno (depleción de potasio). En el modelo actual el aumento repentino de potasio causaría una inhibición de WNK4 y de NCC y por lo tanto una pérdida masiva de sal y agua. Con el fin de prevenir esto, la lenta depleción de potasio del organismo al estar en ayuno causa la fosforilación

en KLHL3 lo que inhibe la degradación de KS-WNK1 que mantiene activa a WNK4 aún después de una carga de potasio lo que previene la pérdida de sal y agua. Esta hipótesis esta fuera del alcance de este proyecto, sin embargo, la función de KS-WNK1 continuará siendo estudiada en el laboratorio del Dr. Gamba.

***“Aprender es lo único que la mente nunca agota, nunca teme y nunca lamenta.”***

Leonardo Da Vinci

## Otros artículos publicados durante mi doctorado

- Argaiz ER, Chavez-Canales M, **Ostrosky-Frid M**, Rodríguez-Gama A, Vázquez N, Gonzalez-Rodriguez X, Garcia-Valdes J, Hadchouel J, Ellison D, Gamba G. Kidney-specific WNK1 isoform (KS-WNK1) is a potent activator of WNK4 and NCC. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 Sep 1;315(3):F734-F745. doi: 10.1152/ajprenal.00145.2018. Epub 2018 May 30. PMID: 29846116; PMCID: PMC6172580
- **Ostrosky-Frid M**, Castañeda-Bueno M, Gamba G. Regulation of the renal NaCl cotransporter by the WNK/SPAK pathway: lessons learned from genetically altered animals. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019 Jan 1;316(1):F146-F158. doi: 10.1152/ajprenal.00288.2018. Epub 2018 Aug 8. PMID: 30089030; PMCID: PMC6383199.
- **Ostrosky-Frid M**, Chávez-Canales M, Romo M, Grunfeld B, Simsolo R, Segura-Kato Y, Tusié-Luna T, Gamba G. Familial Hyperkalemic Hypertension Genotype With a Negative Phenotype: A CUL3 Mosaicism. *Am J Hypertens*. 2020 Mar 13;33(3):278-281. doi: 10.1093/ajh/hpz185. PMID: 31802109.

## Otros artículos publicados durante mi estancia en el PECEM

- Calva JJ, Larrea S, Tapia-Maltos MA, **Ostrosky-Frid M**, Lara C, Aguilar-Salinas P, Rivera H, Ramírez JP. The Decline in HIV-1 Drug Resistance in Heavily Antiretroviral-Experienced Patients Is Associated with Optimized Prescriptions in a Treatment Roll-Out Program in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017 Jul;33(7):675-680. doi: 10.1089/AID.2016.0248. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28094565.
- Hernaiz-Leonardo JC, Golzarri MF, Cornejo-Juárez P, Volkow P, Velázquez C, **Ostrosky-Frid M**, Vilar-Compte D. Microbiology of surgical site infections in patients with cancer: A 7-year review. *Am J Infect Control*. 2017 Jul 1;45(7):761-766. doi: 10.1016/j.ajic.2017.02.023. PMID: 28385464.
- Sieber J, Wieder N, **Ostrosky-Frid M**, Dvela-Levitt M, Aygün O, Udeshi ND, Carr SA, Greka A. Lysine trimethylation regulates 78-kDa glucose-regulated protein proteostasis during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2017 Nov 17;292(46):18878-18885. doi: 10.1074/jbc.M117.797084. Epub 2017 Sep 14. PMID: 28912266; PMCID: PMC5704472.

## Referencias

- Argaiz, E. R., Chavez-Canales, M., Ostrosky-Frid, M., Rodriguez-Gama, A., Vázquez, N., Gonzalez-Rodriguez, X., . . . Gamba, G. (2018). Kidney-specific WNK1 isoform (KS-WNK1) is a potent activator of WNK4 and NCC. *Am J Physiol Renal Physiol*. doi:10.1152/ajprenal.00145.2018
- Bazua-Valenti, S., Chavez-Canales, M., Rojas-Vega, L., Gonzalez-Rodriguez, X., Vazquez, N., Rodriguez-Gama, A., . . . Gamba, G. (2015). The Effect of WNK4 on the Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride. *J Am Soc Nephrol*, *26*, 1781-1786. doi:10.1681/ASN.2014050470
- Bazua-Valenti, S., & Gamba, G. (2015). Revisiting the NaCl cotransporter regulation by with-no-lysine kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, *308*(10), C779-C791. doi:10.1152/ajpcell.00065.2015
- Bazúa-Valenti, S., Rojas-Vega, L., Castañeda-Bueno, M., Barrera-Chimal, J., Bautista, R., Cervantes-Pérez, L. G., . . . Gamba, G. (2018). The Calcium-Sensing Receptor Increases Activity of the Renal NCC through the WNK4-SPAK Pathway. *J Am Soc Nephrol*, *29*(7), 1838-1848. doi:10.1681/ASN.2017111155
- Bockenbauer, D., Feather, S., Stanescu, H. C., Bandulik, S., Zdebik, A. A., Reichold, M., . . . Kleta, R. (2009). Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N.Engl.J.Med.*, *360*(19), 1960-1970. Retrieved from PM:19420365
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2012). *Medical physiology : a cellular and molecular approach* (Updated second edition. ed.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
- Boyd-Shiwerski, C. R., Shiwerski, D. J., Roy, A., Namboodiri, H. N., Nkashama, L. J., Xie, J., . . . Subramanya, A. R. (2018). Potassium-regulated distal tubule WNK bodies are kidney-specific WNK1 dependent. *Mol Biol Cell*, *29*(4), 499-509. doi:10.1091/mbc.E17-08-0529
- Boyden, L. M., Choi, M., Choate, K. A., Nelson-Williams, C. J., Farhi, A., Toka, H. R., . . . Lifton, R. P. (2012). Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature*, *482*(7383), 98-102. Retrieved from PM:22266938
- Castaneda-Bueno, M., Arroyo, J. P., Zhang, J., Puthumana, J., Yarborough, O., 3rd, Shibata, S., . . . Lifton, R. P. (2017). Phosphorylation by PKC and PKA regulate the kinase activity and downstream signaling of WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(5), E879-E886. doi:10.1073/pnas.1620315114
- Castaneda-Bueno, M., Cervantes-Perez, L. G., Vazquez, N., Uribe, N., Kantesaria, S., Morla, L., . . . Gamba, G. (2012). Activation of the renal Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(20), 7929-7934. doi:10.1073/pnas.1200947109
- Castaneda-Bueno, M., & Gamba, G. (2012). Mechanisms of sodium-chloride cotransporter modulation by angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, *21*(5), 516-522. doi:10.1097/MNH.0b013e32835571a4
- Chavez-Canales, M., Zhang, C., Soukaseum, C., Moreno, E., Pacheco-Alvarez, D., Vidal-Petiot, E., . . . Hadchouel, J. (2014). WNK-SPAK-NCC Cascade Revisited: WNK1 Stimulates the Activity of the Na-Cl Cotransporter via SPAK, an Effect Antagonized by WNK4. *Hypertension*, *64*(5), 1047-1053. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04036
- Chen, L., Chou, C. L., & Knepper, M. A. (2021). A Comprehensive Map of mRNAs and Their Isoforms across All 14 Renal Tubule Segments of Mouse. *J Am Soc Nephrol*. doi:10.1681/ASN.2020101406
- Cheng, C. J., Truong, T., Baum, M., & Huang, C. L. (2012). Kidney-Specific WNK1 Inhibits Sodium Reabsorption in Cortical Thick Ascending Limb. *Am J Physiol Renal Physiol*, *303*, F667-F673. doi:10.1152/ajprenal.00290.2012

- Crowley, S. D., Gurley, S. B., Herrera, M. J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A. P., . . . Coffman, T. M. (2006). Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, *103*(47), 17985-17990. Retrieved from PM:17090678
- Cuevas, C. A., Su, X. T., Wang, M. X., Terker, A. S., Lin, D. H., McCormick, J. A., . . . Wang, W. H. (2017). Potassium Sensing by Renal Distal Tubules Requires Kir4.1. *J Am Soc Nephrol*. doi:10.1681/ASN.2016090935
- Curtis, J. J., Luke, R. G., & Dustan, H. P. (1983). Remission of essential hypertension after renal transplantation. *New England Journal of Medicine*, *309*(17), 1009-1015.
- Delaloy, C., Lu, J., Houot, A. M., Disse-Nicodeme, S., Gasc, J. M., Corvol, P., & Jeunemaitre, X. (2003). Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. *Mol.Cell Biol.*, *23*(24), 9208-9221. Retrieved from PM:14645531
- Gamba, G., Saltzberg, S. N., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton, J., Hediger, M. A., . . . Hebert, S. C. (1993). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, *90*, 2749-2753.
- Gitelman, H. J., Graham, J. B., & Welt, L. G. (1966). A new family disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans.Assoc.Am.Physicians*, *79*, 221-235.
- Gordon, R. D. (1986). Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension*, *8*(2), 93-102. Retrieved from PM:3002982
- Grimm, P. R., Coleman, R., Delpire, E., & Welling, P. A. (2017). Constitutively Active SPAK Causes Hyperkalemia by Activating NCC and Remodeling Distal Tubules. *J Am Soc Nephrol*. doi:10.1681/ASN.2016090948
- Gutiérrez, J., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., . . . Hernández-Ávila, M. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*. Retrieved from Cuernavaca, México:
- Hadchouel, J., Soukaseum, C., Busst, C., Zhou, X. O., Baudrie, V., Zurrer, T., . . . Jeunemaitre, X. (2010). Decreased ENaC expression compensates the increased NCC activity following inactivation of the kidney-specific isoform of WNK1 and prevents hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *107*(42), 18109-18114. Retrieved from PM:20921400
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (12th ed.). Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier.
- Ishizawa, K., Xu, N., Loffing, J., Lifton, R. P., Fujita, T., Uchida, S., & Shibata, S. (2016). Potassium depletion stimulates Na-Cl cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3. *Biochem Biophys Res Commun*, *480*(4), 745-751. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.127
- Karimi, K., Fortriede, J. D., Lotay, V. S., Burns, K. A., Wang, D. Z., Fisher, M. E., . . . Vize, P. D. (2018). Xenbase: a genomic, epigenomic and transcriptomic model organism database. *Nucleic Acids Res*, *46*(D1), D861-D868. doi:10.1093/nar/gkx936
- Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalz, J. (2016). *Harrison's manual of medicine* (19th edition. ed.). New York: McGraw Hill Education.
- Lalioti, M. D., Zhang, J., Volkman, H. M., Kahle, K. T., Hoffmann, K. E., Toka, H. R., . . . Lifton, R. P. (2006). Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat.Genet.*, *38*(2), 1124-1132. Retrieved from PM:16964266
- Liu, Z., Xie, J., Wu, T., Truong, T., Auchus, R. J., & Huang, C. L. (2011). Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models. *Hum.Mol.Genet.*, *20*(5), 855-866. Retrieved from PM:21131289

- Louis-Dit-Picard, H., Barc, J., Trujillano, D., Miserey-Lenkei, S., Bouatia-Naji, N., Pylypenko, O., . . . Jeunemaitre, X. (2012). KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nat. Genet*, *44*(4), 456-460. Retrieved from PM:22406640
- Louis-Dit-Picard, H., Kouranti, I., Rafael, C., Loisel-Ferreira, I., Chavez-Canales, M., Abdel Khalek, W., . . . Jeunemaitre, X. (2020). Mutations affecting the conserved acidic WNK1 motif cause inherited hyperkalemic hyperchloremic acidosis. *J Clin Invest*. doi:10.1172/JCI94171
- Mente, A., O'Donnell, M. J., Rangarajan, S., McQueen, M. J., Poirier, P., Wielgosz, A., . . . Investigators, P. (2014). Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. *N Engl J Med*, *371*(7), 601-611. doi:10.1056/NEJMoa1311989
- O'Donnell, M., Mente, A., Rangarajan, S., McQueen, M. J., Wang, X., Liu, L., . . . Investigators, P. (2014). Urinary sodium and potassium excretion, mortality, and cardiovascular events. *N Engl J Med*, *371*(7), 612-623. doi:10.1056/NEJMoa1311889
- O'Reilly, M., Marshall, E., Speirs, H. J., & Brown, R. W. (2003). WNK1, a Gene within a Novel Blood Pressure Control Pathway, Tissue-Specifically Generates Radically Different Isoforms with and without a Kinase Domain. *Journal of the American Society of Nephrology*, *14*(10), 2447-2456. Retrieved from PM:14514722
- Ohta, A., Schumacher, F. R., Mehellou, Y., Johnson, C., Knebel, A., Macartney, T. J., . . . Kurz, T. (2013). 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*, *451*(1), 111-122. doi:10.1042/BJ20121903
- Ostrosky-Frid, M., Castañeda-Bueno, M., & Gamba, G. (2019). Regulation of the Renal NaCl Cotransporter by the WNK/SPAK Pathway. Lessons Learned from Genetically Altered Animals. *Am J Physiol Renal Physiol*. doi:10.1152/ajprenal.00288.2018
- Ostrosky-Frid, M., Chavez-Canales, M., Zhang, J., Andrukova, O., Argaiz, E. R., Lerdo de Tejada, F., . . . Gamba, G. (2021). Role of KLHL3 and dietary K(+) in regulating KS-WNK1 expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. doi:10.1152/ajprenal.00575.2020
- Piala, A. T., Moon, T. M., Akella, R., He, H., Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (2014). Chloride Sensing by WNK1 Involves Inhibition of Autophosphorylation. *Sci Signal*, *7*(324), ra41. doi:10.1126/scisignal.2005050
- Rettig, R., Folberth, C. G., Stauss, H., Kopf, D., Waldherr, R., Baldauf, G., & Unger, T. (1990). Hypertension in rats induced by renal grafts from renovascular hypertensive donors. *Hypertension*, *15*, 429-435.
- Rose, B. D. (1991). Diuretics. *Kidney International*, *39*, 336-352.
- Scholl, U. I., Choi, M., Liu, T., Ramaekers, V. T., Hausler, M. G., Grimmer, J., . . . Lifton, R. P. (2009). Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, *106*(14), 5842-5847. Retrieved from PM:19289823
- Schultheis, P. J., Lorenz, J. N., Meneton, P., Nieman, M. L., Riddle, T. M., Flagella, M., . . . Shull, G. E. (1998). Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter of the distal convoluted tubule. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 29150-29155.
- Shibata, S., Arroyo, J. P., Castaneda-Bueno, M., Puthumana, J., Zhang, J., Uchida, S., . . . Lifton, R. P. (2014). Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch-like 3, preventing WNK4 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(43), 15556-15561. doi:10.1073/pnas.1418342111

- Shibata, S., Zhang, J., Puthumana, J., Stone, K. L., & Lifton, R. P. (2013). Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(19), 7838-7843. doi:10.1073/pnas.1304592110
- Subramanya, A. R., Yang, C. L., Zhu, X., & Ellison, D. H. (2006). Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, *290*(3), F619-F624. Retrieved from PM:16204408
- Susa, K., Sohara, E., Rai, T., Zeniya, M., Mori, Y., Mori, T., . . . Uchida, S. (2014). Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAI1 in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet*, *23*(19), 5052-5060. doi:10.1093/hmg/ddu217
- Susa, K., Sohara, E., Takahashi, D., Okado, T., Rai, T., & Uchida, S. (2017). WNK4 is indispensable for the pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II caused by mutant KLHL3. *Biochem Biophys Res Commun*, *491*(3), 727-732. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.121
- Terker, A. S., Zhang, C., Erspamer, K. J., Gamba, G., Yang, C. L., & Ellison, D. H. (2016). Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis. *Kidney Int*, *89*, 127-134. doi:10.1038/ki.2015.289
- Thastrup, J. O., Rafiqi, F. H., Vitari, A. C., Pozo-Guisado, E., Deak, M., Mehellou, Y., & Alessi, D. R. (2012). SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochemistry Journal*, *441*(1), 325-337. Retrieved from PM:22032326
- Thomson, M. N., Cuevas, C. A., Bewarder, T. M., Dittmayer, C., Miller, L. N., Si, J., . . . Mutig, K. (2020). WNK bodies cluster WNK4 and SPAK/OSR1 to promote NCC activation in hypokalemia. *Am J Physiol Renal Physiol*, *318*(1), F216-F228. doi:10.1152/ajprenal.00232.2019
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., . . . Ponten, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, *347*(6220), 1260419. doi:10.1126/science.1260419
- Vargas-Poussou, R., Dahan, K., Kahila, D., Venisse, A., Riveira-Munoz, E., Debaix, H., . . . Jeunemaitre, X. (2011). Spectrum of mutations in gitelman syndrome. *J.Am Soc.Nephrol.*, *22*(4), 693-703. Retrieved from PM:21415153
- Vidal-Petiot, E., Cheval, L., Faugeroux, J., Malard, T., Doucet, A., Jeunemaitre, X., & Hadchouel, J. (2012). A New Methodology for Quantification of Alternatively Spliced Exons Reveals a Highly Tissue-Specific Expression Pattern of WNK1 Isoforms. *PLoS One*, *7*(5), e37751. doi:10.1371/journal.pone.0037751
- Vidal-Petiot, E., Elvira-Matelot, E., Mutig, K., Soukaseum, C., Baudrie, V., Wu, S., . . . Hadchouel, J. (2013). WNK1-related Familial Hyperkalemic Hypertension results from an increased expression of L-WNK1 specifically in the distal nephron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(35), 14366-14371. doi:10.1073/pnas.1304230110
- Wakabayashi, M., Mori, T., Isobe, K., Sohara, E., Susa, K., Araki, Y., . . . Uchida, S. (2013). Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. *Cell Rep*, *3*(3), 858-868. doi:10.1016/j.celrep.2013.02.024
- Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., . . . Lifton, R. P. (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science*, *293*(5532), 1107-1112. Retrieved from PM:11498583
- Wilson, F. H., Kahle, K. T., Sabath, E., Lalioti, M. D., Rapson, A. K., Hoover, R. S., . . . Lifton, R. P. (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *100*(2), 680-684. Retrieved from PM:12515852

- Xu, B., English, J. M., Wilsbacher, J. L., Stippec, S., Goldsmith, E. J., & Cobb, M. H. (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16795-16801. Retrieved from PM:10828064
- Yamada, K., Park, H. M., Rigel, D. F., DiPetrillo, K., Whalen, E. J., Anisowicz, A., . . . Monovich, L. (2016). Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function. *Nat Chem Biol*, 12(11), 896-898. doi:10.1038/nchembio.2168
- Yang, C. L., Angell, J., Mitchell, R., & Ellison, D. H. (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J.Clin.Invest*, 111(7), 1039-1045. Retrieved from PM:12671053
- Yang, S. S., Morimoto, T., Rai, T., Chiga, M., Sohara, E., Ohno, M., . . . Uchida, S. (2007). Molecular Pathogenesis of Pseudohypoaldosteronism Type II: Generation and Analysis of a Wnk4(D561A/+) Knockin Mouse Model. *Cell Metab*, 5(5), 331-344. Retrieved from PM:17488636