



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Medicina

Análisis de los motivos RFXV/I en WNK4: Implicaciones en  
la regulación de la vía WNK4-SPAK-NKCC1

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA:

Alejandro Rodríguez Gama

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Castañeda Bueno

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

2016



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.

## **Análisis de los motivos RFXV/I en WNK4: Implicaciones en la regulación de la vía WNK4-SPAK-NKCC1**

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, ubicada en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán, con la asesoría de la Dra. María Castañeda Bueno.

## Agradecimientos

A María Castañeda, por sus enseñanzas, su apoyo en mis decisiones académicas, por confiar y enriquecer mis ideas y por enseñarme que aún puedo ser más multitarea de lo que creía.

Al Dr. Gerardo Gamba por aceptarme en su laboratorio y permitirme ser parte de su grupo de investigación del cual he aprendido el significado de excelencia.

A los integrantes de mi jurado, Dra. Adela Rodríguez, Dra. Norma Bobadilla, Dr. Alfredo Torres y Dr. Armando Tovar, por todos sus comentarios y observaciones tan valiosas.

A la Q.F.B. Norma Vázquez, por su increíble apoyo en el laboratorio, su compañía y amistad.

A todos mis compañeros de la Unidad de Fisiología Molecular, porque sin ellos estos tres últimos no hubiesen sido lo mismo: Erika, Silvana, Eduardo, Karla, Lorena, Diana, Adriana, Paola, Jasmine, Chelo y Luz. A los vecinos, Rosy, Andrea, Toño, Ixchel, Tino, Vicky, Luis. Y, en especial a Adrián, por todas las discusiones, ideas y momentos divertidos.

A mis compañeros de la LIBB, Augusto, Benjamín, David, Eva, Jessica, Grisel y Gianfranco, por compartir 4 años de excelentes aventuras, por su amistad y porque juntos somos la Elite Provinciana.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis padres, Maricela Gama y Alejandro Rodríguez, por todo su apoyo incondicional y porque a través de sus historias me inspiran a seguir soñando.

A mi hermano Daniel Rodríguez, por enseñarme que a través de la fortaleza se consiguen grandes cosas.

A la familia Ortiz Estrada, por todo su apoyo, su amistad y porque son para mí como una segunda familia.

A D. Monserrat, por enseñarme que no importa cuánto te rompas siempre seguirás escribiendo tu historia y porque me ha regalado momentos increíbles en su compañía.

A Eugenia Román, por su enorme cariño y porque es un ejemplo de fortaleza.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	8
<b>I Introducción</b> .....	10
<b>I.1 Proteínas Cinasas</b> .....	10
I.1.1 Características de las proteínas cinasas.....	11
<b>I.2 Cinasas With No Lysine (WNK)</b> .....	14
I.2.1 Características estructurales de las cinasas WNK .....	14
I.2.2 Sensibilidad a la concentración intracelular de Cloruro .....	17
<b>I.3 Familia de los cotransportadores SLC12A</b> .....	19
<b>I.4 Las cinasas SPAK y OSR1 y sus implicaciones en la regulación de los CCCs.</b> ..	26
<b>I.5 Motivos RFXV en la vía WNK-SPAK/OSR1-CCCs.</b> .....	31
<b>Hipótesis</b> .....	37
<b>Objetivos Generales</b> .....	37
<b>Objetivos Particulares</b> .....	37
<b>II Material y Métodos</b> .....	38
<b>II.1 Material</b> .....	38
<b>II.2 Métodos</b> .....	40
<b>III Resultados</b> .....	44
<b>III.1 Localización de los motivos RFXV/I en el dominio cinasa de las WNK</b> .....	44
<b>III.2 Motivos RFXV/I de WNK4 en la activación de SPAK</b> .....	46
<b>III.3 Interacción WNK4-SPAK es mediada por un solo motivo RFXV</b> .....	47
<b>III.4 La adición del motivo RFXV/I no conservado en WNK4 no rescata la activación de SPAK</b> .....	49
<b>III.5 La interacción WNK4-SPAK no se rescata por la adición del motivo RFRV (N)</b> .....	50

<b>III.6 La cinasa WNK4 constitutivamente activa es afectada por la ausencia de motivos RFXV/I .....</b>	<b>51</b>
<b>III.7 La autofosforilación de WNK4 no se afecta en la ausencia del motivo 1 RFXV/I.....</b>	<b>53</b>
<b>III.8 La localización celular de WNK4 no se afecta al perder la interacción con SPAK.....</b>	<b>54</b>
<b>III.9 La cinasa WNK4 fusionada a mRFP1 es funcionalmente activa.....</b>	<b>57</b>
<b>III.10 La interacción WNK4-NKCC1 no es mediada por el dominio PF2 en WNK4 .....</b>	<b>58</b>
<b>III.11 La región C-terminal en WNK4 no es requerida para la interacción con NKCC1.....</b>	<b>60</b>
<b>IV Discusión .....</b>	<b>62</b>
<b>IV.1 Los motivos RFXV/I en WNK4 sobre la interacción y activación de la cinasa SPAK.....</b>	<b>62</b>
<b>IV.2 Localización celular del complejo WNK4-SPAK .....</b>	<b>64</b>
<b>IV.3 Interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK.....</b>	<b>65</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo II .....</b>	<b>69</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo IV .....</b>	<b>72</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>73</b>

## Resumen

Los cotransportadores de cationes acoplados a cloruro (CCC) tienen un papel importante en la fisiología humana. Dentro de las funciones que realizan se encuentran: el transporte transepitelial de iones, regulación del volumen celular, regulación de la concentración de cloruro intracelular y regulación de la excitabilidad neuronal. Uno de los elementos más importantes para el entendimiento de los mecanismos de regulación de estos cotransportadores fue la descripción de la vía WNK-SPAK-CCC. Gracias a trabajos genéticos, bioquímicos y fisiológicos se conoce que la cinasa WNK (With No Lysine) regulan mediante fosforilación la actividad de las cinasas SPAK/OSR1, quienes a su vez fosforilan a los cotransportadores en residuos críticos para su actividad. El presente trabajo se enfoca en la caracterización de las interacciones que permiten a las cinasas WNK4-SPAK regular la función del cotransportador NKCC1. Las interacciones de los tres componentes de la vía son mediadas por diferentes regiones estructurales presentes en WNK4 y SPAK. El dominio PASK-FRAY 2 (PF2) está presente en las cinasas SPAK/OSR1. Se ha descrito que este dominio puede mediar interacciones con motivos RFXV/I presentes en las cinasas WNK y en algunos CCCs. WNK4 posee dos motivos RFXV/I, el primero localizado hacia el final del dominio cinasa y el segundo localizado en el extremo C-terminal. Las demás cinasas WNK presentan un motivo RFXV/I conservado en el dominio cinasa y varios en el C-terminal. Después de analizar la secuencia de aminoácidos de las cinasas WNK, así como su estructura tridimensional, una diferencia se hizo evidente; el motivo RFXV/I localizado en el dominio cinasa de WNK1, WNK2 y WNK3 presenta una localización y secuencia idéntica, mientras que en WNK4 este motivo no está conservado, pero existe un motivo RFXV/I localizado en otra posición dentro del dominio cinasa.

Se estudió la contribución de los motivos RFXV/I de WNK4 en la interacción con la cinasa SPAK y la activación de la misma. Observamos que el motivo RFXV/I localizado en el dominio cinasa de WNK4 es fundamental para la activación de SPAK, pero no media una interacción preponderante. Además, observamos que el motivo C-terminal es indispensable para la interacción con SPAK. Se ha descrito que en WNK1 y WNK3, los motivos RFXV/I del dominio cinasa son esenciales para la activación de SPAK. Por lo tanto, evaluamos si la inserción en WNK4 del motivo conservado en otras WNKs es capaz de rescatar la interacción con SPAK y la activación de ésta en una mutante de WNK4 carente de los dos motivos RFXV endógenos. Sin embargo, no se observó ningún efecto positivo sobre la activación/interacción.

Adicionalmente en este trabajo fue la identificación de la localización celular de los complejos WNK4-SPAK. Por medio de microscopia confocal se identificó un patrón de localización vesicular para WNK4 y este mismo patrón se observó para SPAK. Al emplear Microscopia de Iluminación estructurada se pudo determinar el tamaño de las estructuras en las que se localiza WNK4, siendo el tamaño aproximado 500 nm.

En este trabajo también se identificó la presencia de una interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK. Para identificar este dominio interacción se generaron múltiples construcciones con diferentes mutaciones. WNK4 contiene un dominio PF2 similar al presente en SPAK, que se localiza río arriba del dominio cinasa. Por lo tanto, evaluamos la posibilidad de que este motivo pudiera mediar una interacción con los motivos RFXV/I de NKCC1. Sin embargo, la interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK se observó aún en ausencia de un dominio PF2 funcional. Para descartar que la interacción WNK4-NKCC1 pudiera estar mediada de manera indirecta por la hetero-dimerización de WNK4 con una WNK endógena, se diseñó la construcción de una mutante trunca de WNK4 que carece de la región hélice-helicoidal que es esencial para la hetero-dimerización. Este constructo además carece del motivo RFXV/I C-terminal. Observamos que esta mutante sigue siendo capaz de interactuar con NKCC1, lo que sugiere la existencia de una región adicional que contribuye a dicha interacción.

En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que ambos motivos RFXV/I de WNK4 son relevantes para su participación en la vía de señalización. Dado que en ausencia del motivo RFXV/I del dominio cinasa se sigue observando interacción con SPAK, queda pendiente aclarar cómo participa dicho motivo en la activación de SPAK. Además, se muestra que WNK4 y NKCC1 pueden interactuar de manera independiente de SPAK y en el futuro se buscará describir el dominio o motivo responsable de dicha interacción. Con estos resultados se genera un mejor panorama de las interacciones implicadas en la vía, lo que, en un futuro podría servir para poder generar nuevos blancos farmacológicos para la vía WNK-SPAK.



## Abstract

Cation-Chloride Cotransporters (CCCs) play an important role in the human physiology, for instance, CCCs participate in transepithelial ion transport, cell volume regulation, intracellular chloride concentration regulation and neuronal excitability regulation. It has been shown through genetic, biochemical and physiological approaches that WNK kinases regulate the SPAK/OSR1 kinases through phosphorylation, and that SPAK/OSR1 in turn phosphorylate CCCs in critical residues that modulate their activity. This thesis work focuses on the characterization of the interactions that participate in the regulation of NKCC cotransporter by the kinases WNK4-SPAK. The interaction of these three components is mediated by several domains present in both WNK4 and SPAK kinases. The PASK-FRAY homology 2 domain (PF2) is present in SPAK/OSR1 kinases. This domain has been shown to interact with RFXV/I motifs present in WNK4 kinase and some cotransporters. WNK4 possesses two RFXV motifs one at the end of the kinase domain and a second one at the C-terminus. Other WNK kinases possess a RFXV motif in the middle of the kinase domain and several others at the C-terminus. Through sequence alignment analysis and generation of three-dimensional models of WNKs an important difference in the arrangement of RFXV/I motifs between WNK4 and other members of the WNK family; the RFXV/I motif present in the kinase domain of WNK1, WNK2 and WNK3 is conserved in sequence and location, while for WNK4 this motif appeared to be relocated in a position near the end of the kinase domain.

We aimed to study the role of WNK4's RFXV motifs on the activation and interaction with SPAK. The results of this work suggest that the RFXV/I motif localized in the kinase domain of WNK4 plays a critical role in the activation of SPAK. Nevertheless, it is not essential for interaction. On the other hand, the C-terminal RFXV/I motif is indispensable for interaction with SPAK. It has been reported that RFXV/I motifs present in the kinase domain of WNK1 and WNK3 are crucial for SPAK activation. Because WNK4 displays a different RFXV/I motif arrangement in the kinase domain. We decided to evaluate whether modifying this arrangement to make it similar to the one presented by other WNKs could make the kinase functional. However, the addition of this new motif in the absence of the original RFXV/I motif did not restore the function.

An additional aim of this project was to analyze the cellular localization of the WNK4-SPAK complexes. Through confocal microscopy, it was possible to determine that WNK4 display a

vesicular localization pattern. This same pattern is displayed by SPAK. Through Structured Illumination Microscopy, it was possible to determine the size of the structures in which WNK4 is present, which have an average size of 500 nm.

In this work we present evidence that WNK4 can interact with NKCC1 in a SPAK independent manner. WNK4 possess a PF2 domain located upstream of the kinase domain, which is similar to the one present in SPAK. Therefore, the possibility that this domain can mediate an interaction with the RFXV/I motifs present in NKCC1 was addressed. The SPAK independent WNK4-NKCC1 interaction was observed in spite of the lack of a functional PF2 domain suggesting that this domain might participate, but is not essential for the interaction. In order to determine whether hetero-dimerization of WNK4 with endogenous WNKs could mediate the interaction with NKCC1. We designed a series of short WNK4 constructs, truncated in the C-terminus. In the absence of the C-terminal coiled coil domain critical for WNK hetero-dimerization the WNK4-NKCC1 interaction was preserved, suggesting that additional domains or motifs present in WNK4 can mediate this interaction.

Altogether these findings present evidence that both RFXV/I motifs in WNK4 are relevant for the WNK4 function. Further work will be required to elucidate the mechanism by which the RFXV/I motif located in WNK4's kinase domain is essential for SPAK activation. Additionally, we report a SPAK independent WNK4-NKCC1 interaction, yet, a domain or motif responsible for this interaction remains unknown. Overall, these results help to better understand the major interactions in the pathway and in the near future this information might be relevant in the design of new pharmacological targets.

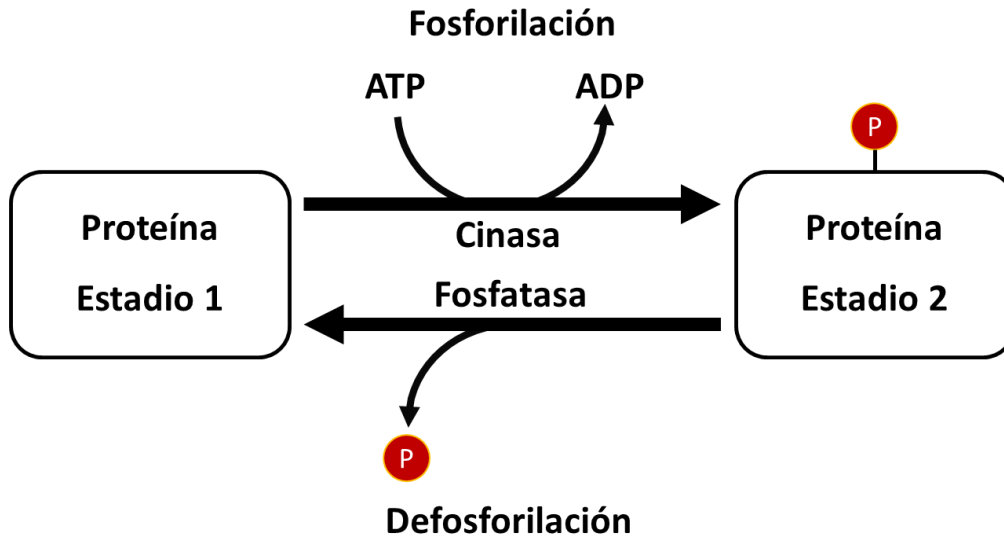
# I Introducción

## I.1 Proteínas Cinasas

Dentro de los múltiples procesos que se realizan constantemente en la célula, se encuentran las reacciones catalíticas. De no ser estos procesos ejecutados por enzimas, los fenómenos biológicos tomarían mucho tiempo en suceder por mera espontaneidad. Por lo tanto, las enzimas son participantes esenciales en una variedad de procesos celulares. Un grupo de enzimas constantemente activas en la célula son las proteínas cinasas. Que catalizan una reacción de tipo transferasa, denominada fosforilación. Esta consiste en la transferencia del grupo fosfato gamma del adenosín trifosfato (ATP) a una molécula aceptora.

Las proteínas cinasas unen a la molécula de ATP y a la proteína sustrato y dirigen la transferencia del grupo gamma del ATP al grupo hidroxilo aceptor de los residuos Serina, Treonina o Tirosina, en la secuencia de la proteína sustrato (Figura I.1). Existe una divergencia en el tipo de sustratos que tiene las proteínas cinasas. De esta manera, se dividen en dos familias principales: las cinasas de residuos de Serina/Treonina y las cinasas de residuos de Tirosina.

La fosforilación de las proteínas representa uno de los mecanismos más conservados en los procesos biológicos. Constituye uno de los principales mecanismos con los que cuenta la célula para regular una gran diversidad de procesos celulares, dentro de los que se incluyen; crecimiento celular, proliferación, diferenciación, metabolismo, regulación transcripcional, apoptosis y en general la homeostasis celular. La fosforilación de proteínas regula la función de sus blancos al alterar su actividad enzimática, localización subcelular, interacciones proteína-proteína y estabilidad (Hunter 2000). El balance entre los estados fosforilado y defosforilado de las proteínas permite regular de manera precisa la función de estas. Lo anterior se conoce como la fosforilación reversible de proteínas (Figura I.1). Con la secuenciación del genoma humano, fue posible identificar los potenciales marcos de lectura y sus potenciales productos proteicos. De esta manera se ha calculado que en el genoma humano existen más de 518 proteínas cinasas (Manning et al. 2002), de las cuales 90 son cinasas de residuos de Tirosina y 428 son cinasas de residuos de Serina/Treonina (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001; Johnson and Hunter 2005)



**Figura I.1:** Fosforilación reversible de las proteínas. Ilustración de la fosforilación reversible de las proteínas, la proteína sustrato puede ser fosforilada y subsecuentemente defosforilada. Esta propiedad es importante para la regulación de diversas proteínas incluyendo a las propias cinasas.

### I.1.1 Características de las proteínas cinasas

Las proteínas cinasas suelen ser de tamaño muy variable pero todas se caracterizan por poseer en su secuencia un dominio cinasa catalítico de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos (Hanks et al. 1988). Un gran número de proteínas cinasas presentan extensiones N-terminal y C-terminal del dominio cinasa. Muchas de estas extensiones contienen regiones reguladoras, o dominios necesarios para llevar a cabo interacciones intermoleculares (Nolen et al. 2004). El dominio cinasa, está conservado en arquitectura en las diferentes proteínas cinasas de las cuales se ha resuelto la estructura. Esto explica que las diferencias funcionales observadas en las múltiples cinasas se debe a las regiones aledañas al dominio cinasa.

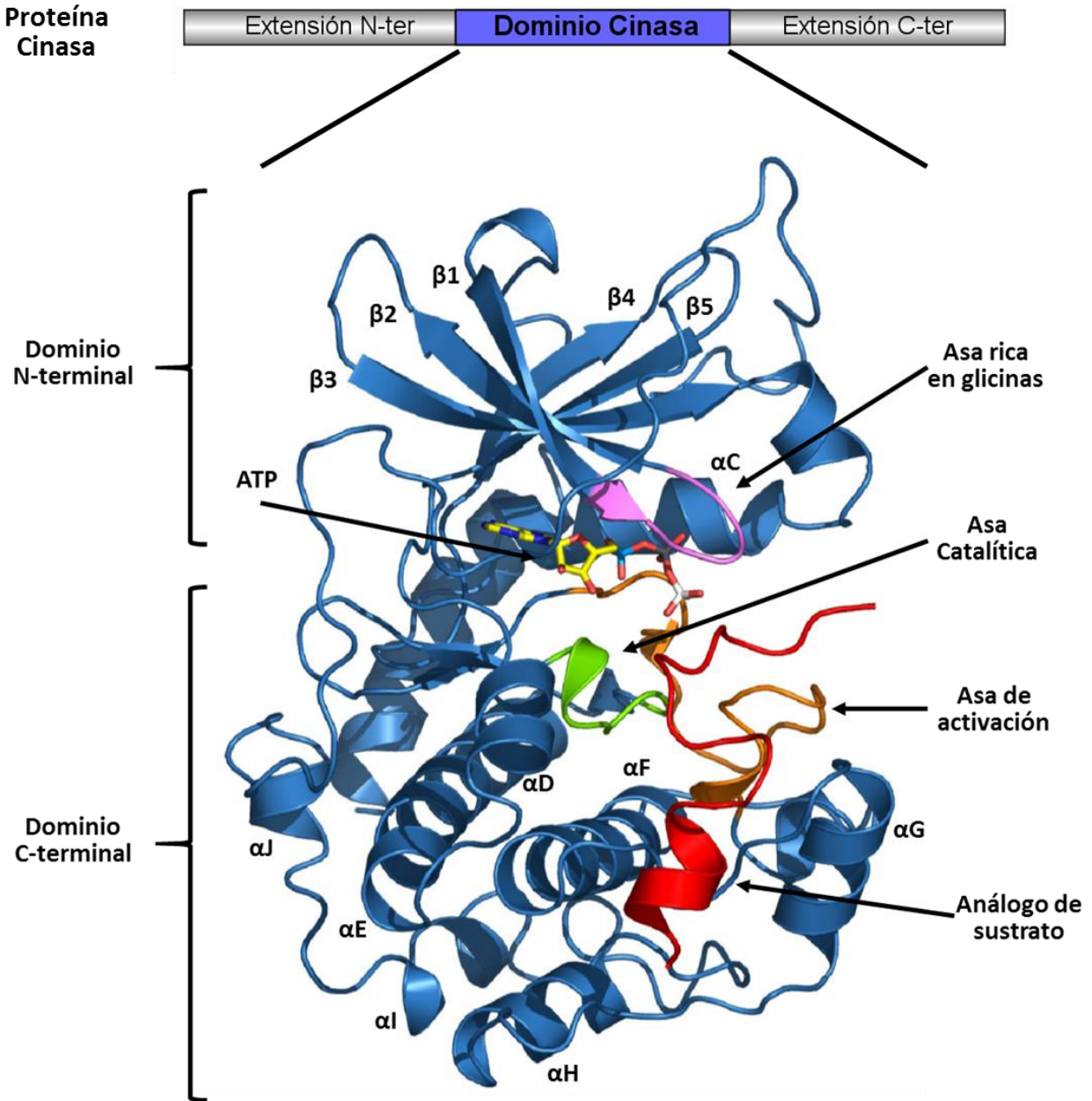
El dominio cinasa presenta dos subdominios, que consisten en un subdominio N-terminal pequeño compuesto principalmente por hebras  $\beta$  antiparalelas y un subdominio C-terminal principalmente compuesto de  $\alpha$ -hélices (Figura I.2). Estos dos subdominios están conectados por un asa flexible localizada entre la quinta hebra  $\beta$  y la primera hélice  $\alpha$  ( $\alpha$ D) del dominio C-terminal. El sitio activo reside en la interfase de los dos subdominios. Tanto el ATP como los iones  $Mg^{2+}$  son importantes para la catálisis y se unen en el interior del sitio activo, mientras que, la proteína sustrato se une en el exterior de esta interfase.

Un elemento principal en el dominio cinasa es el asa de activación, que varía en tamaño entre las diferentes cinasas y tiene una longitud de 20-30 residuos de aminoácidos (Liu et al. 2006), está delimitada por dos motivos altamente conservados en las cinasas; Asp-Phe-Gly (DFG) y Ala-Pro-Glu (APE). EL motivo APE tiene una participación en la cavidad de reconocimiento al sustrato. Por otro lado, el Aspartato en el motivo DFG, coordina al catión de  $Mg^{2+}$  que a su vez realiza una interacción con los grupos fosfato  $\beta$ - y  $\gamma$ - del ATP. La naturaleza de esta interacción permite la correcta orientación de ATP en el sitio catalítico.

La conformación de el asa de activación está asociada con los estados inactivos o activos de las proteínas cinasas. En un estado inactivo, el asa de activación presenta una gran flexibilidad que impide ser identificada por análisis estructurales. Sin embargo, en el estado activo, el asa de activación adquiere una conformación estable, mediante la fosforilación de residuos Ser/Thr en su secuencia (Huse and Kuriyan 2002). De hecho, la fosforilación de dichos residuos es necesaria para la activación de la cinasa. Otra función del asa de activación, además de proporcionar la estabilidad del dominio cinasa en el estado activo, es determinar la especificidad del sustrato. Un conjunto de 7-10 residuos río arriba del motivo APE, ayudan a conferir la especificidad del sustrato mediante la interacción en el residuo subsecuente al residuo fosforilable (P+1) en el asa de activación (Nolen et al. 2004).

La especificidad de las cinasas por ciertos sustratos no sólo está determinada por el asa de activación. Durante la reacción catalítica se producen múltiples contactos que aseguran la selectividad de las cinasas. En varios reportes estructurales se ha observado la interacción del sustrato con hélices  $\alpha$ , entre estas se encuentra la hélice D, y F del lóbulo C-terminal del dominio cinasa. La naturaleza de estas interacciones es muy diversa, pero principalmente se observan las interacciones de tipo hidrofóbico (Brinkworth et al. 2003; Zhu et al. 2005).

Previamente mencionado, es de interés el hecho de la presencia de regiones aledañas al dominio cinasa que potencialmente pueden conferir capas de regulación a la función de éstas. Motivos presentes dentro de estas secuencias aledañas pueden mediar interacciones con otras moléculas y resultan en el control de la actividad catalítica, afinidad y especificidad por el sustrato. Un dominio bien caracterizado en este sentido es el SH2 (Dominio homólogo a Src 2) (Yadav and Miller 2008). Se ha demostrado que el arreglo específico de dominios SH2 y SH3 en diferentes proteínas cinasas, es relevante en la determinación de la afinidad por diferentes sustratos.



**Figura I.2:** Estructura del dominio cinasa. Representación esquemática del dominio cinasa de la proteína PKA (PDB: 1ATP, Knighton et al. 1991). Se ilustra la localización de los diferentes elementos importantes para la función de la cinasa. El asa de activación coloreado en naranja se encuentra en la posición activa debido a que existe un análogo de sustrato unido (rojo). El estado activo del asa de activación le permite hacer contacto con los residuos cercanos al sitio de fosforilación, además de este contacto, el sustrato es unido por residuos en las hélices F y G de dominio C-terminal. Otro elemento importante es el asa rica en glicinas, esta confiere la flexibilidad necesaria para poder ser sitio de anclaje del ATP. En conjunto el residuo de Lisina 72 localizado en la hebra  $\beta 3$  aseguran la unión del ATP.

## **I.2 Cinasas With No Lysine (WNK)**

Las cinasas WNK son un grupo atípico de cinasas de residuos de Serina/Treonina. La identificación de este grupo de cinasas ocurrió al intentar encontrar nuevos miembros de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Mediante el alineamiento con proteínas cinasas previamente identificadas se reveló que WNK1 carecía de la lisina catalítica en la posición que es invariable entre todos los miembros de la familia de las cinasas, por lo que WNK1 fue categorizada como una proteína cinasa atípica (Xu et al. 2000).

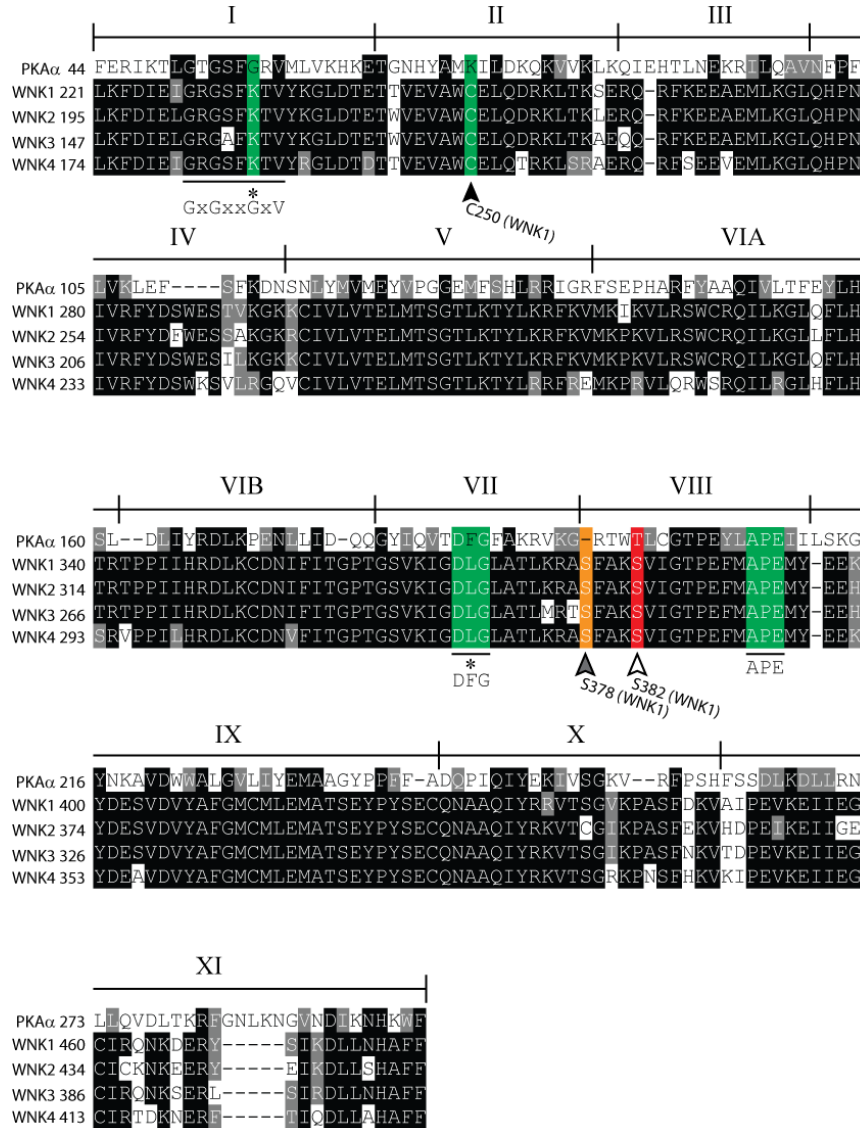
En el genoma humano existen 4 genes que codifican para 4 diferentes WNKs. Otra de las particularidades de estas cinasas, además de su lisina catalítica relocalizada, es su gran tamaño. Siendo que varían entre 1243-2400 residuos de aminoácidos. Es interesante que, a pesar de su gran tamaño, el dominio globular más importante es el dominio cinasa, que posee las mismas características que cualquier cinasa de residuos de Serina/Treonina. Debido al gran tamaño de estas cinasas no ha sido posible determinar su estructura completa. Cuando se resolvió la estructura del dominio cinasa de WNK1 se encontró que la lisina catalítica relocalizada en el subdominio I funciona de la misma manera que en las otras cinasas donde esta se encuentra en el subdominio II (Figura I.3) (Min et al. 2004).

La función fisiológica de las WNKs empezó a entenderse a partir de análisis genético del síndrome de Gordon. En 2001 Wilson y colaboradores reportaron que este síndrome es causado en ciertos pacientes, por mutaciones en los genes de las cinasas WNK1 y WNK4. Los pacientes presentan alteraciones en la regulación del transporte de iones en la nefrona, que se refleja en hipertensión, hipercalemia, así como acidosis metabólica (Wilson et al. 2001).

### **I.2.1 Características estructurales de las cinasas WNK**

Dentro de las regiones con más grado de homología entre los cuatro miembros de las WNKs se encuentra el dominio cinasa. Con un porcentaje de identidad del 95% (Veríssimo and Jordan 2001). La característica que las nombra WNK es interesante debido a que, se ha intentado colocar a la lisina catalítica al subdominio conservado en las demás cinasas. Sin embargo, al hacer esto la cinasa WNK no es capaz de restablecer su actividad catalítica (Xu et al. 2002). Esto sugiere que la relocalización de la lisina catalítica en las WNK fue parte de una selección molecular, en la cual se produjeron

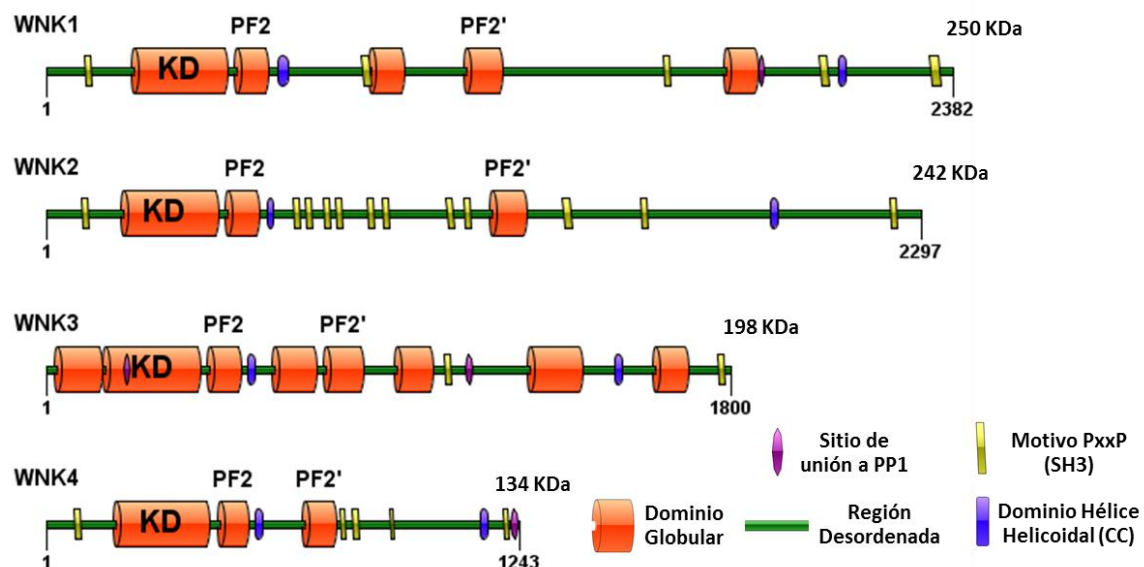
cambios específicos que permiten la conservación de la actividad catalítica. Un dato relevante es el hecho de que estas proteínas están presentes en organismos multicelulares e incluyen los reinos Plantae y Animal. La activación de las cinasas WNK sigue a la necesidad invariable del estado fosforilado del asa de activación. La identificación de la fosforilación del residuo S382 en WNK1, describe que este residuo es necesario para adquirir la conformación activa de la cinasa (Xu et al. 2002; Zagórska et al. 2007).



**Figura I.3:** Alineamiento del dominio cinasa de las WNK. El alineamiento se realizó usando el dominio cinasa de las isoformas de WNK y a PKA $\alpha$ . Se identifican los subdominios característicos del dominio cinasa. Se observa el cambio de localización de la lisina catalítica en las WNK al asa rica en glicinas. Otra diferencia es el motivo DFG que en las WNKs presenta la secuencia DLG. Existen dos residuos de serina fosforilables en el asa de activación.



Las cinasas WNK poseen varias regiones conservadas adicionales al dominio cinasa principalmente localizadas en el segmento C-terminal. Entre estas se incluyen, un dominio auto-inhibitorio, el cuál presenta un plegamiento semejante a los dominios PASK-FRAY de *D. melanogaster* (Xu et al. 2002; Moon et al. 2013); dos regiones de hélices helicoidales, la región localizada en el extremo C-terminal de todos los miembros de la familia es indispensable para la hetero-dimerización y subsecuente auto-activación de las WNKs (Thastrup et al. 2012); una región conservada rica en aminoácidos ácidos, la cual es blanco de reconocimiento por el complejo ligasa de ubiquitina CUL3-KLHL3 (Ohta et al. 2013; Schumacher et al. 2014); y la presencia de múltiples motivos de interacción proteína-proteína, tales como PxxP (SH3), de unión a Proteína Fosfatasa 1 (PP1) (Hendrickx et al. 2009; Lin et al. 2012). Esto sugiere que las WNKs podrían funcionar como proteínas de andamiaje. Sin embargo, pocos motivos han sido validados (Figura I.4).



**Figura I.4:** Miembros de la familia WNK. En el esquema se representa la localización a lo largo de la secuencia de los diferentes motivos descritos. Además, se ilustra la predicción de los dominios globulares, de hélice helicoidal y regiones desordenadas que se realizó en el servidor, elm.eu.org. Dominio cinasa (KD), Dominio PF2 (Pask-Fray 2), Dominio PF2' (Pask-Fray similar).

Con la finalidad de ahondar un poco más en el papel que juegan los segmentos N- y C-terminal de las cinasas WNK, se realizó un análisis de predicción de dominios globulares a partir de la secuencia primaria, mediante el cual se puede determinar que los cuatro miembros de la familia WNK presentan un gran porcentaje de regiones desordenadas en su secuencia. La proporción de regiones desordenadas/ordenadas aumenta en el siguiente orden WNK3, WNK1, WNK4, WNK2. En este sentido, WNK3 posee más regiones globulares y WNK2 tiene una mayor proporción de regiones

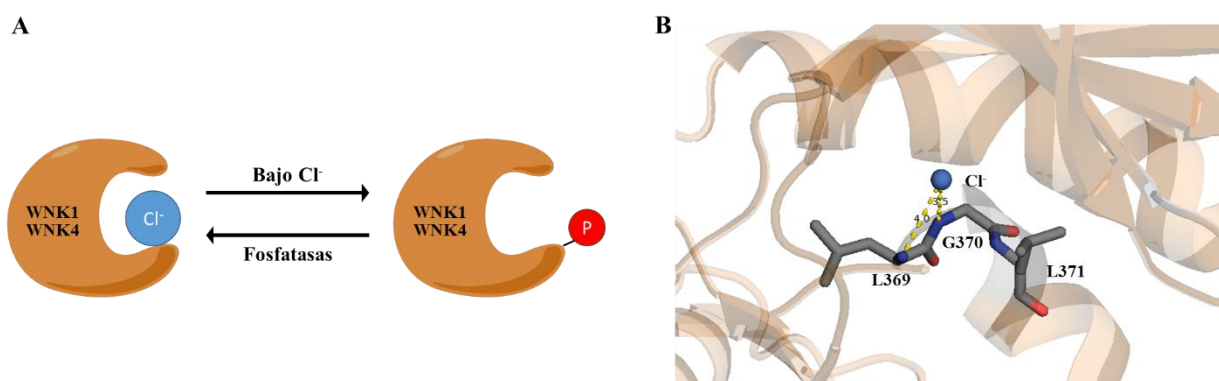
desordenadas. Será interesante evaluar la posibilidad de que estas regiones sean intrínsecamente desordenadas. En WNK4 se predijeron dos dominios globulares a parte del dominio cinasa. El primero es el dominio autoinhibitorio (PF2) río abajo del dominio cinasa y está conservado en otras WNKs. El segundo (PF2'), también está conservado en las cuatro WNKs y se localiza aproximadamente a la mitad de la secuencia lineal de aminoácidos de estas cinasas. Al realizar una predicción de estructura secundaria y terciaria de este dominio, el mejor templado es el dominio PF2 de SPAK. Sin embargo, no existe información estructural de este dominio, ni información sobre su papel en la regulación de la función de las cinasas WNK. Los demás dominios globulares predichos para WNK1 y WNK3, no se presentan en otras WNKs y representan un potencial fenómeno de divergencia funcional (Figura I.4).

## **I.2.2 Sensibilidad a la concentración intracelular de Cloruro**

En un trabajo de biología estructural realizado por Píala et al, se determinó que el dominio cinasa de WNK1, puede sensar la concentración de cloruro intracelular. En las cinasas WNK, el motivo DFG que antecede al asa de activación, no está conservado, ya que la Fenilalanina es reemplazada por una Leucina (DLG); estas cinasas presentan dos leucinas formando así el motivo DLGL. Esta característica está conservada en los cuatro miembros de la familia, a lo largo de diferentes especies (Píala et al. 2014; Bazua-Valenti et al. 2015). La estructura cristalográfica muestra que la amida de la Leucina 369, localizada en el motivo DLG, forma un puente de hidrogeno con un ion cloruro en el estado inactivo de la cinasa. Dado que el motivo DLG se localiza justo en el sitio activo de la cinasa, se esperaría que la unión de un ion cloruro en esta posición interfiera con la actividad catalítica. Apoyando esta idea, al resolver la estructura cristalográfica del dominio cinasa de WNK1 fosforilado en la Serina 382, se observó que la unión del cloruro con la amida de la leucina se pierde en el estado activo. Adicionalmente, en el trabajo, se demuestra que la activación por autofosforilación de la cinasa WNK1 es inversamente proporcional a la concentración de cloruro. Dicha regulación se encuentra ausente en la mutante L369F, en donde la unión del ion cloruro se pierde.

En conjunto, estos datos sugieren que la cinasa WNK1 podría funcionar como un sensor de la concentración intracelular de cloruro mediante la unión de este anión en el dominio cinasa. En una condición donde la concentración intracelular de cloruro excede la  $CI_{50}$  (concentración de inhibición) de 20 mM, la cinasa se encontrará en el estado inactivo. Mientras que en una condición donde  $[Cl^-]$  este por debajo de la  $CI_{50}$ , la cinasa podrá autofosforilarse y subsecuentemente adquirir la conformación activa (Píala et al. 2014).

En un trabajo reciente realizado por el laboratorio se demostró que la cinasa WNK4 posee también la capacidad de funcionar como sensor de la concentración intracelular de cloruro. Los antecedentes del laboratorio indicaban un fenotipo inhibitor de WNK4. Sin embargo, al realizar una depleción de cloruro en ovocitos de *X. laevis*, se encontró un fenotipo activador. Esta evidencia hizo pensar en la capacidad de WNK4 como un sensor de cloruro con una afinidad muy alta por este anión. Al mutar la Leucina 322 (secuencia de humano) conservada por un residuo de Fenilalanina, se observó un fenotipo constitutivamente activo (Bazua-Valenti et al. 2015). Esto indica la participación del motivo DLG en la unión de cloruro y subsecuente activación por autofosforilación, la cual resulta en la regulación de los Cotransportadores de Cloruro-Cation (CCCs). De esta manera se confirmó que la sensibilidad al cloruro en las cinasas WNK es un mecanismo conservado y es una propiedad importante para su regulación (Figura I.5).



**Figura I.5:** Las cinasas WNK funcionan como sensor de Cloruro. (A) La auto-activación de WNK1 y WNK4 es inhibida por el cloruro. En una condición donde existe bajo cloruro las cinasas WNK1 y WNK4 alcanzan su estado activo. Esta activación es revertida por proteínas fosfatasa (B) Estructura del dominio cinasa de WNK1 PDB: 4Q2A. Se muestran los puentes de hidrógeno hacia el cloruro por la amida de L369 y la G370 del motivo DLG.

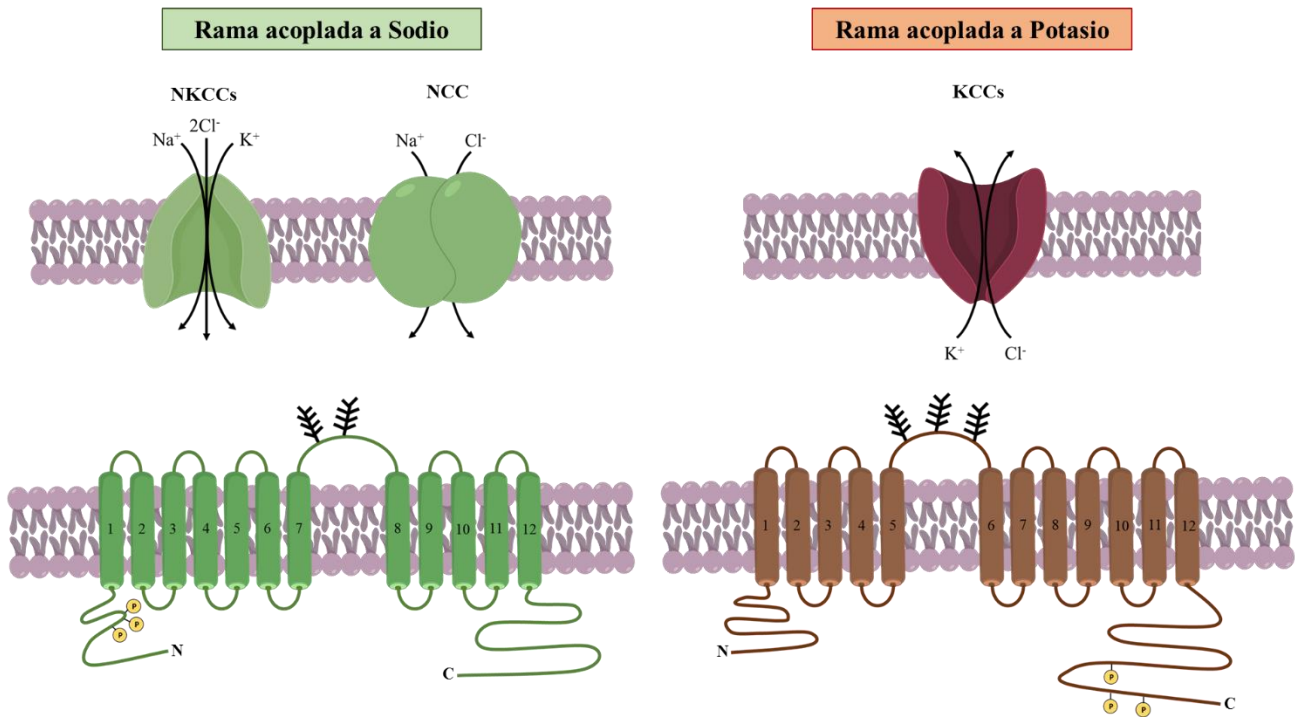
En diversos trabajos se ha reportado la actividad diferencial pero conservada de las WNK. En este sentido se ha demostrado que las cinasas WNK1, WNK3 funcionan como activadores de los cotransportadores NKCC2 y NCC. Para el caso de WNK4 existió una controversia entre el papel que ejercía sobre ambos cotransportadores, existiendo evidencia que la señalaba como una cinasa inhibitora, pero con algunos reportes con evidencia contraria. Un reporte importante en este sentido fue la descripción de la sensibilidad al cloruro por WNK4 realizada en el laboratorio. Recientemente, se ha postulado que los diferentes miembros de la familia WNK presenta diferentes afinidades por cloruro. Como parte de estos hallazgos se identificó mediante ensayos de actividad cinasa, que

WNK3 presenta una sensibilidad por cloruro muy baja, por su parte WNK1 tiene una  $CI_{50}$  reportada de 20  $\mu$ M. Sin embargo, WNK4 es el miembro que presenta la mayor sensibilidad por cloruro, ya que es la cinasa que se mantiene inactiva en concentraciones de cloruro en donde tanto las cinasas WNK1 y WNK3 se encuentran activas. Estos datos, indican un potencial fisiológico importante, en términos de la regulación del volumen y concentración de iones intracelular, modulada por las cinasas WNK (Terker et al. 2016).

### **I.3 Familia de los cotransportadores SLC12A**

El mecanismo de regulación anteriormente descrito toma relevancia fisiológica cuando se entiende una de las principales funciones de las cinasas WNK. Como ya se mencionó, en 2001 se describió que mutaciones en los genes codificantes para las cinasas WNK1 y WNK4 son causantes de una enfermedad genética mendeliana, que cursa con hipertensión sensible a sal, denominada, Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII). Además, de hipertensión, los pacientes PHAII presentan hiperkalemia y acidosis metabólica, alteraciones que son exactamente opuestas a las observadas en otro padecimiento genético denominado síndrome de Gitelman. Este último es causado exclusivamente por mutaciones inactivantes en el cotransportador de sodio-cloruro (NCC). Este cotransportador es el blanco de los diuréticos tipo tiazida, que son ampliamente usados en la clínica para el tratamiento de la hipertensión arterial. Una observación interesante es que los pacientes con PHAII son particularmente sensibles al tratamiento con tiazidas y dicho tratamiento no solo corrige la hipertensión, sino también todas las demás alteraciones electrolíticas que se presentan (Mayan et al. 2002). Todo esto, llevó a varios investigadores a proponer, incluso desde antes de que se conocieran los genes afectados en el PHAII, que este síndrome debía ser causado por una sobre activación patológica del cotransportador NCC.

Por lo tanto, después de la primera descripción de mutaciones en los genes de WNK1 y WNK4 causantes de PHAII, se hipotetizó inmediatamente que estas cinasas podrían funcionar como reguladores de NCC en el Túbulo Contorneado Distal (TCD). En consecuencia, dicha relación funcional comenzó a ser estudiada y a lo largo de la última década se ha establecido, mediante estudios bioquímicos y genéticos, que las cinasas WNK son capaces de regular la actividad del cotransportador NCC, así como la de otros miembros de la familia SLC12A mediante la fosforilación indirecta de residuos de Serina y Treonina localizados en las regiones N- y C-terminales citoplasmáticas de dichos cotransportadores.



**Figura I.6:** Estructura y función de los cotransportadores de la familia SLC12A. Existen dos ramas en la familia de cotransportadores de cationes-cloruro. Los cotransportadores  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (NKCCs) y el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  (NCC), median la entrada de  $\text{Cl}^-$  a la célula, mientras que los cotransportadores  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  (KCCs) facilitan la salida de  $\text{Cl}^-$ . Todos los miembros presentan una estructura similar con variaciones mínimas. Por ejemplo, los cotransportadores NKCCs y NCC presentan un asa extracelular larga entre los pases transmembrana 7 y 8 la cual posee varios sitios de glicosilación. Por otro lado, en los KCCs el asa extracelular se encuentra entre los pases transmembrana 5 y 6. Otra diferencia es la localización de los sitios de fosforilación. En la rama acoplada a sodio los residuos fosforilables se encuentran en la cola N-terminal, mientras que en la rama acoplada a potasio la mayoría se encuentran en la cola C-terminal.

La familia de cotransportadores SLC12A está conformada de dos ramas. La rama de cotransportadores acoplados a sodio y los acoplados a potasio. Ambas ramas realizan el transporte activo secundario de iones obedeciendo el gradiente electroquímico de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Esto dicta que las dos ramas de la familia SLC12A funcionen de manera recíproca. Mientras que los cotransportadores acoplados a sodio median la entrada de sodio y cloruro a la célula siguiendo el gradiente electroquímico de entrada para el  $\text{Na}^+$ , los cotransportadores acoplados a potasio median la salida de potasio y cloruro siguiendo el gradiente electroquímico de salida para el  $\text{K}^+$  (Figura I.6). Es importante destacar que, de igual manera, la regulación de ambas ramas se da de manera recíproca. En este sentido, la activación de los cotransportadores acoplados a sodio ocurre por la fosforilación

de residuos en la región N-terminal, mientras que la fosforilación principalmente de residuos en la región C-terminal en los cotransportadores acoplados a potasio inhibe la función de estos (Richardson and Alessi 2008; Alessi et al. 2014). A pesar de que las cinasas WNK fueron las primeras en ser implicadas en la regulación de los cotransportadores, éstas no pueden fosforilar directamente a los cotransportadores, sino que lo hacen a través de modular la actividad de dos cinasas denominadas SPAK y OSR1 de las cuales se hablará con más detalle en una sección posterior.

A lo largo de la última década, diversos estudios han demostrado que la actividad de los cotransportadores de la familia SLC12A es regulada en respuesta a cambios en la concentración intracelular de cloruro (Pacheco-Alvarez et al. 2006; Ponce-Coria et al. 2008). Por ejemplo, en un trabajo realizado en el laboratorio se demostró que NCC es activado al depletar de cloruro a las células, esta activación es dependiente de la fosforilación de residuos de Serina y Treonina en la región N-terminal. De igual manera, se demostró que la activación de NKCC2 se realiza por la fosforilación de residuos que son homólogos a los de NCC (Richardson et al. 2011). Adicionalmente, la fosforilación de estos sitios se incrementa bajo la respuesta a la depleción de cloruro. A partir de estas observaciones se postuló la existencia de una cinasa sensible a la concentración intracelular de cloruro (Figura I.7). No fue hasta la publicación de los trabajos de Píala et al. en 2014 y Bazúa-Valenti et al. en 2015, mencionados en la sección I.2.2, que se demostró que dichos sensores de la concentración de cloruro son precisamente las cinasas WNK.

La familia de cotransportadores SLC12A está conformada por 9 miembros en mamíferos, de los cuales solo 7 han sido bien descritos.

- SLC12A1 codifica el cotransportador 2 de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  (NKCC2)
- SLC12A2 codifica el cotransportador 1 de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  (NKCC1)
- SLC12A3 codifica el cotransportador de  $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  (NCC)
- SLC12A4 codifica el cotransportador 1  $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$  (KCC1)
- SLC12A5 codifica el cotransportador 2  $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$  (KCC2)
- SLC12A6 codifica el cotransportador 3  $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$  (KCC3)
- SLC12A7 codifica el cotransportador 4  $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$  (KCC4)

Los diferentes miembros realizan múltiples funciones dentro de las que se incluyen, regulación de volumen celular, control de la excitabilidad neuronal y son los responsables de muchos de los flujos

iónicos que conducen a la secreción de fluidos y absorción en los epitelios. A continuación, se describen las principales funciones de cada uno de los miembros de esta familia.

### **Cotransportador 1 de Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> - 2Cl<sup>-</sup> (NKCC1)**

El cotransportador 1 de Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> - 2Cl<sup>-</sup> (NKCC1) es una proteína compuesta de 1212 residuos de aminoácidos, codificada por el gen SLC12A2 localizado en el cromosoma 5q23. Se expresa en múltiples tipos celulares. En el caso particular de las células epiteliales, éste se localiza exclusivamente en la membrana basolateral, por ejemplo, en el intestino y el riñón. Existe evidencia que indica que NKCC1 funciona como homodímero. Su estructura es igual a la de los demás miembros de la familia SLC12, contiene 12 pases transmembrana y las regiones amino y carboxilo terminales están localizadas en el citoplasma. En la región amino terminal se localizan tres residuos de treonina (T184, T189 y T202 en humano) que son blancos de fosforilación para las cinasas SPAK y OSR1 (Moriguchi et al. 2005; Vitari et al. 2005; Anselmo et al. 2006). La fosforilación del cotransportador en estos residuos promueve su activación.

Entre las funciones fisiológicas de NKCC1 se encuentran las siguientes:

- NKCC1 funciona en la regulación del volumen celular, en situaciones en que la célula se enfrenta a cambios en la osmolaridad extracelular.
- NKCC1 genera la entrada neta de cloruro a la célula a través de la membrana basolateral que a su vez es transportado por la membrana apical durante; la secreción de fluidos en el intestino delgado, secreción de fluidos en el colon, el mecanismo de control de la glándula salival, y la secreción exocrina por las células acinares pancreáticas.
- La excitabilidad neuronal de las neuronas inmaduras depende de la función del NKCC1. En la etapa prenatal NKCC1 mantiene una concentración intracelular alta de cloruro en las neuronas. En consecuencia, el neurotransmisor gamma-acido amino butírico (GABA) genera respuestas despolarizantes, en lugar de lo que sucedería en neuronas maduras donde GABA genera una respuesta hiperpolarizante debido a la baja concentración de Cl<sup>-</sup> intracelular que favorece la entrada de Cl<sup>-</sup> a la célula.
- La secreción de fluidos durante la espermatogénesis depende estrechamente de la actividad de NKCC1.

### **Cotransportador 2 de Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -2Cl<sup>-</sup> (NKCC2)**

El cotransportador 2 de Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> - 2Cl<sup>-</sup> (NKCC2), es una proteína compuesta de 1099 residuos de aminoácidos, codificada por el gen SLC12A1 localizado en el cromosoma 15. Este gen presenta tres isoformas; A, B y F generadas por empalme alternativo. Su expresión está restringida a la rama ascendente del asa de Henle (TALH por sus siglas en inglés) de la nefrona. En esta región NKCC2 participa en la regulación de la concentración urinaria por medio de la reabsorción de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. La estructura de NKCC2 es similar a la de NKCC1 (Richardson et al. 2011).

NKCC2 también se expresa en la mácula densa, conformada por un conjunto de células especializadas que se localizan en la porción final de TAHL, justo antes del comienzo de TCD. En la mácula densa NKCC2 funciona en el mecanismo de retroalimentación tubuloglomerular que permite ajustar la tasa de filtración glomerular en respuesta a la cantidad de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> que llega hasta esta porción de la nefrona. Mutaciones de pérdida de función en NKCC2 son responsables por la pérdida de sal e hipotensión características del síndrome de Bartter tipo I.

### **Cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (NCC)**

El cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (NCC), es una proteína compuesta de 1021 residuos de aminoácidos. Está codificada por el gen SLC12A3 localizado en el cromosoma 16q13. La estructura es similar a la de los cotransportadores NKCC. Este cotransportador se expresa exclusivamente en el túbulo contorneado distal de la nefrona. En esta esta región NCC es un importante participante en la reabsorción regulada de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. En el laboratorio se han estudiado los diferentes mecanismos de regulación del cotransportador. Se ha demostrado que diversas hormonas como angiotensina II, vasopresina e insulina pueden estimular la activación del NCC a través de la activación de diferentes vías de señalización (San-Cristobal et al. 2009; Castaneda-Bueno et al. 2012; Chávez-Canales et al. 2013).

La mayoría de las vías de activación del NCC convergen en la activación de las cinasas WNK y promueven así, la activación de las cinasas SPAK y OSR1, que a su vez fosforilan una serie de residuos de Treonina en la región N-terminal del NCC (Moriguchi et al. 2005; Richardson et al. 2008; Chávez-Canales et al. 2014). Esta fosforilación causa la activación del cotransportador que resulta en la mayor reabsorción de sal por el riñón, lo que a su vez afecta la presión arterial sistémica. Es por esto que, la inactivación farmacológica con diuréticos tipo tiazida o genética del NCC provoca la disminución de la presión arterial.



### **Cotransportador 1 de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC1)**

Existen cuatro cotransportadores de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCCs), la función de estos es mediar la salida de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> de la célula. La isoforma KCC1, está codificada por el gen SLC12A4 en el cromosoma 16q22, tiene una expresión ubicua y funciona de manera opuesta al cotransportador NKCC1 en la regulación del volumen celular. La función de NKCC1 es importante para mantener el volumen cuando la célula se encuentra en un medio hipertónico. KCC1 funciona para disminuir el volumen celular al permitir la salida de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Figura I.7). La activación de KCC1 es estimulada por hipotonicidad, o al incrementar la concentración intracelular de cloruro en la célula. La activación es dependiente del estado defosforilado del cotransportador, mediada por la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Gamba 2005). La estructura de los KCCs es semejante a la de los miembros de la rama acoplada a sodio (Figura I.6).

### **Cotransportador 2 de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC2)**

El cotransportador 2 de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC2), es una proteína de 1116 residuos de aminoácidos y está codificada por el gen SLC12A5 localizado en el cromosoma 20q13. La expresión de este gen está restringida a las neuronas. El mecanismo por el cual se genera esta especificidad es por el elemento silenciador restrictivo neuronal (NRSE por sus siglas en inglés).

KCC2 funciona en conjunto con los cotransportadores NKCC1 y KCC3 para regular la excitabilidad neuronal. El principal mecanismo es el ajuste de la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup>. En las neuronas embrionarias, la [Cl<sup>-</sup>] está predeterminada a un nivel alto debido a la alta funcionalidad de NKCC1. Por otro lado, en las neuronas maduras, la expresión de NKCC1 disminuye y a su vez la expresión de KCC2 se incrementa. Esto resulta en la disminución de la [Cl<sup>-</sup>]. La marcada diferencia en la [Cl<sup>-</sup>] entre neuronas inmaduras y maduras determina que se observen respuestas diferentes ante la estimulación con neurotransmisores tales como GABA. En estudios genéticos se ha demostrado una relación causal entre la presencia de mutaciones en KCC2 y la epilepsia en ciertos pacientes. Se propuso que en estos pacientes, la función deficiente de KCC2 provoca una respuesta anormal por GABA que es responsable de la epilepsia (Gamba 2005).

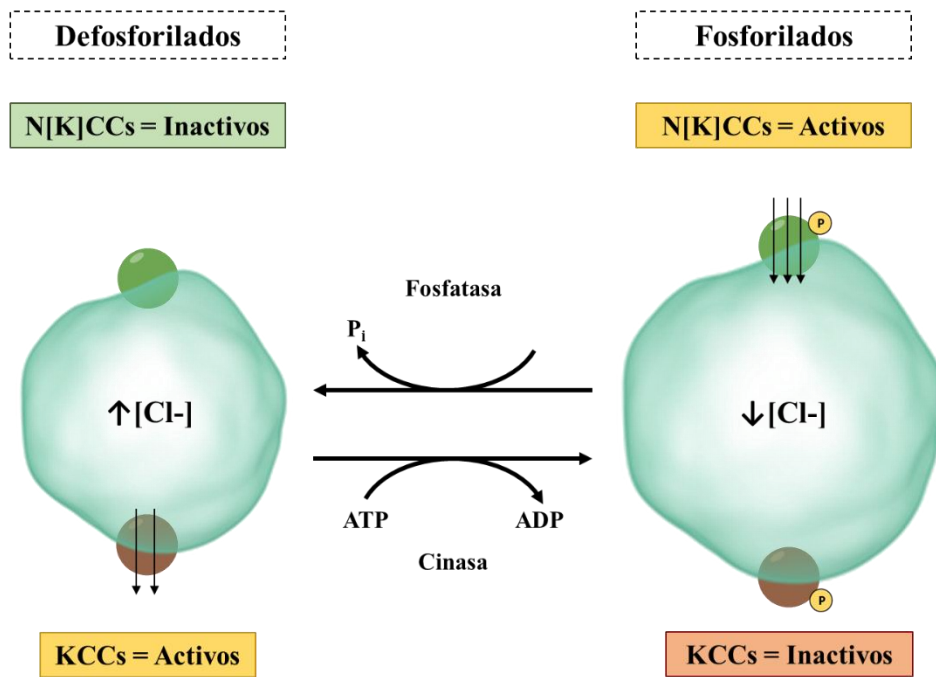
### **Cotransportador 3 de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC3)**

El cotransportador 3 de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC3), es una proteína de 1150 residuos de aminoácidos y está codificada por el gen SLC12A6 localizado en el cromosoma 15q13-14. Existen dos isoformas de KCC3; a y b generadas por empalme alternativo siendo la principal diferencia la región amino terminal (Melo et al. 2013; Rinehart et al. 2009). KCC3 se expresa en varios tejidos, entre los que se

encuentran: el hígado, el cerebro, el musculo, los pulmones, el corazón y el riñón. Mutaciones con pérdida de función para KCC3 son responsables del síndrome de Andermann que se caracteriza por la neuropatía sensorial y motora.

### Cotransportador 4 de $K^+-Cl^-$ (KCC4)

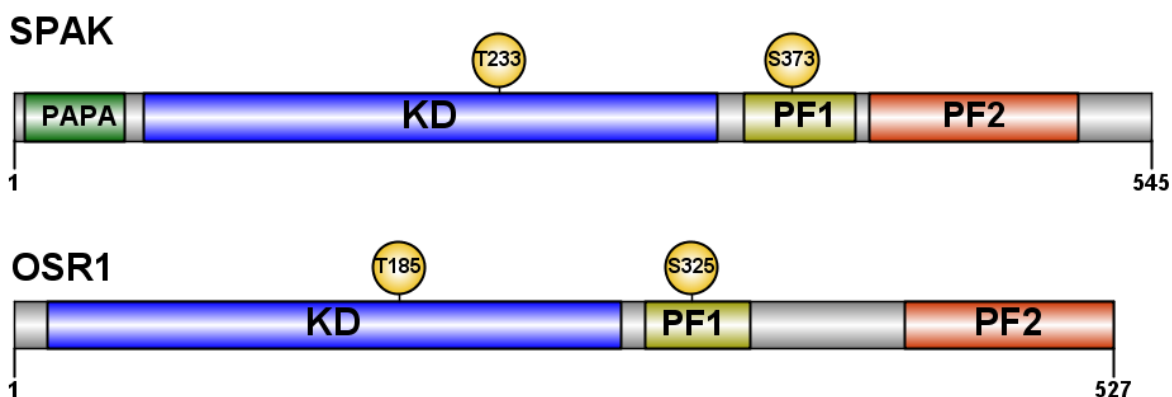
El cotransportador 4 de  $K^+-Cl^-$  (KCC4), es una proteína de 1083 residuos de aminoácidos y está codificada por el gen SLC12A7 localizado en el cromosoma 5p15,3. KCC4 se expresa principalmente en el riñón y el corazón y en menores niveles, en el cerebro. En el riñón, KCC4 es importante para mediar la salida de  $Cl^-$  a través de la membrana basolateral y de esta manera contribuye a la acidificación renal de la orina (Melo et al. 2013a).



**Figura I.7:** N[K]CCs y KCCs son regulados de manera recíproca por fosforilación reversible. En condiciones hipotónicas de bajo  $Cl^-$  o una reducción en el volumen celular (no mostrado) se observa la fosforilación y activación de los N[K]CCs y a la fosforilación e inhibición de los KCCs. Esto conduce a la entrada de iones y agua hacia la célula. Si la  $[Cl^-]_i$  es muy alta, la vía de señalización se apaga y permite la salida de iones y agua a través de los KCCs.

## I.4 Las cinasas SPAK y OSR1 y sus implicaciones en la regulación de los CCCs.

Como se mencionó anteriormente, las cinasas WNK no regulan de manera directa a los cotransportadores SLC12A, sino que lo hacen a través de las cinasas SPAK y OSR1. A continuación, presento en orden cronológico los hallazgos más trascendentes que han permitido entender la función de estas cinasas.



**Figura I.8:** Ilustración de las cinasas SPAK y OSR1. Se identifican los principales dominios presentes. El residuo de Treonina localizado en el dominio cinasa (KD) se localiza en el asa de activación. El residuo de Serina en el PF1 se ha sugerido ser necesario para la activación de ambas cinasas. La fosforilación de estos residuos es regulada por las cinasas WNK.

El primer trabajo de la identificación de la cinasa de Respuesta a Estrés Oxidante 1 (OSR1) fue realizado por Ushiro et al en 1998, quienes reportaron la secuenciación de un gen con un marco de lectura de 533 aminoácidos, que codificaba una proteína con un dominio cinasa muy parecido a las cinasas Ste20 (del inglés Steril 20) (Ushiro et al. 1998). Existía un antecedente importante en el cual se estudió la regulación de la cinasa JNK (por sus siglas del inglés: c-Jun N-terminal Kinase) en *Drosophila*. Se realizó un tamizaje para encontrar genes interactuantes, de esta manera se identificó al gen Fray como un regulador de la actividad de JNK. Posteriormente, en un intento por identificar a proteínas homólogas a Fray en mamífero se clonó el gen de OSR1 (Chen et al. 2004). La cinasa SPAK se clonó por primera vez de células beta pancreáticas de rata (DeAizpurua et al. 1997). La caracterización de esta cinasa mostró que contiene una región de repeticiones de residuos de Alanina y Prolina (a la que se llamó caja PAPA) localizada río arriba del dominio catalítico. También se identificó un sitio de localización nuclear en el extremo C-terminal. El nombre SPAK deriva de

Cinasa Rica en Prolinas y Alaninas Relacionada a Ste20. Posteriormente, se realizó un análisis en el que, mediante el alineamiento de la secuencia de ambas proteínas, se observó un grado de similitud equiparable al de genes parálogos entre OSR1 y SPAK (Johnston et al. 2000). Al analizar detalladamente la secuencia de las dos cinasas, se encontró que ambas comparten dos dominios adicionales al dominio cinasa. Estos dominios fueron nombrados PF1 y PF2, debido a su gran nivel de homología con los dominios presentes en los genes PASK y FRAY (de *Drosophila*), donde fueron identificados por primera vez (Figura I.8).

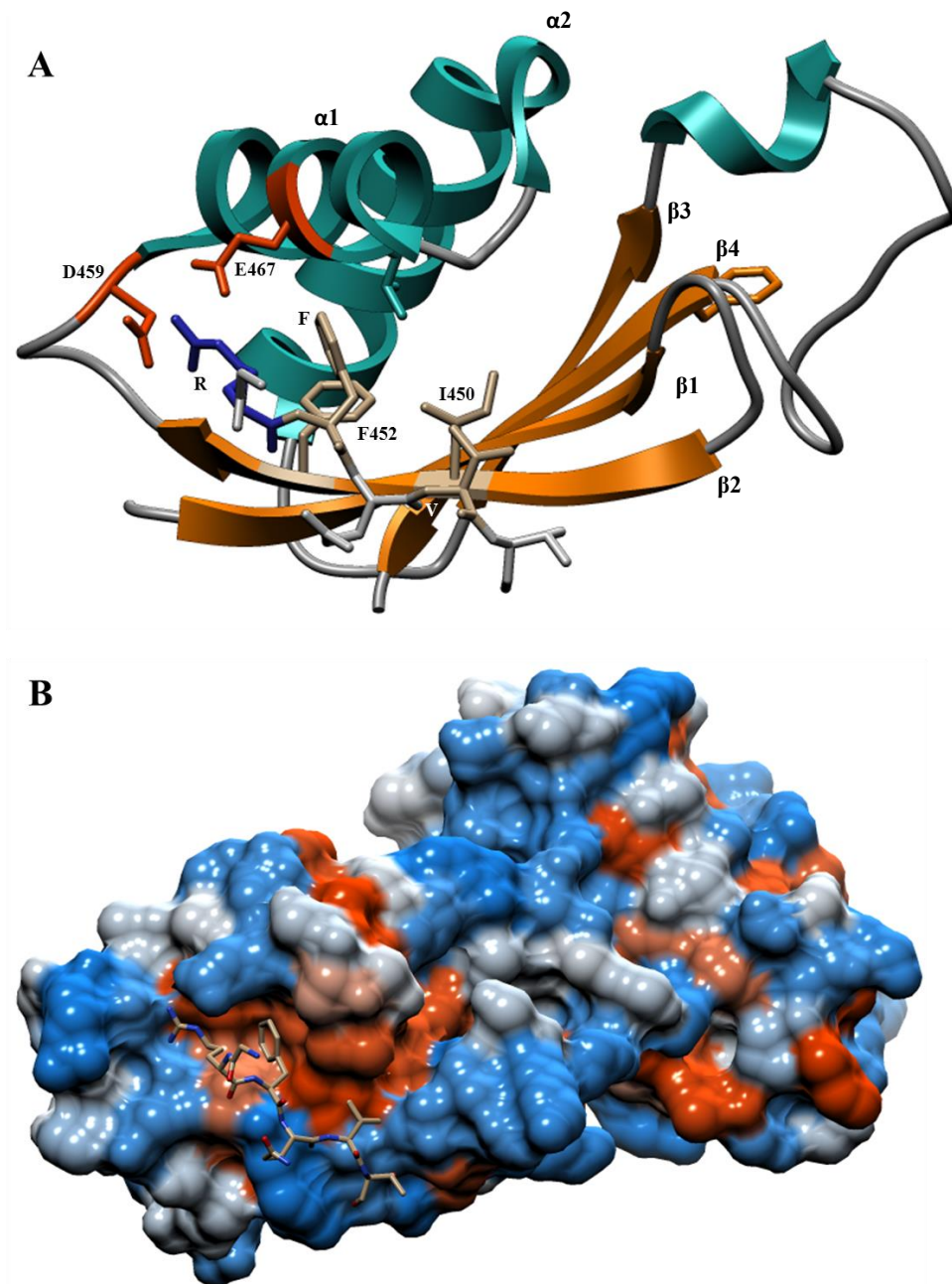
Estos dominios y en particular el dominio PF2, presentan una estructura tridimensional que ha permitido entender la naturaleza de ciertas interacciones que tienen SPAK y OSR1 con otras proteínas, tanto reguladores como sustratos que representan las redes de interacciones.

Los primeros experimentos que indicaron que las cinasas SPAK y OSR1 interactúan con los cotransportadores de la familia SLC12A surgieron de un análisis de tamizaje para identificar proteínas que interactúan con KCC3 mediante ensayos de doble híbrido en levadura (Piechotta et al. 2002). Una vez identificada la cinasa SPAK, se realizó un análisis más detallado para identificar los dominios proteicos implicados en la interacción y se observó que la región C-terminal conservada en SPAK y OSR1 hace una interacción con los fragmentos amino terminal de ciertos cotransportadores entre ellos: NKCC1, NKCC2, NCC, KCC2a y KCC3a. Además, se pudo identificar un motivo conservado entre los diferentes cotransportadores, con la secuencia consenso Arg-Phe-Xxx-Val (RFxV), que cuando se muta se afecta la interacción (Piechotta et al. 2003).

En un trabajo posterior, Anselmo et al, demostraron, al usar un sistema de doble híbrido, que el dominio C-terminal de OSR1, posee un comportamiento similar al del dominio C-terminal de SPAK. En este caso, utilizando el dominio C-terminal de OSR1 se demostró que éste realiza una interacción con varios fragmentos C-terminal de la cinasa WNK1. Estos fragmentos contienen en su secuencia varios motivos RFxV. El motivo conservado RFxV apunta a una red de interacciones de la cinasa SPAK con los principales sustratos y reguladores de esta cinasa.

La cristalización del dominio PF2 de OSR1 ha permitido entender la naturaleza de la interacción del dominio PF2 con el motivo peptídico RFxV. En 2007, Villa et al resolvieron la estructura de OSR1-PF2 en dos estados, uno unido al péptido GRFQVT y otro en ausencia de péptido (Villa et al. 2007). Se observó que el dominio PF2 se caracteriza por la presencia de cuatro hebras  $\beta$

antiparalelas apiladas contra dos hélices  $\alpha$ . Se describió además la presencia de un surco hidrofóbico en la estructura que está localizado entre la segunda hebra  $\beta$  y la primera hélice  $\alpha$  (Figura I.9).



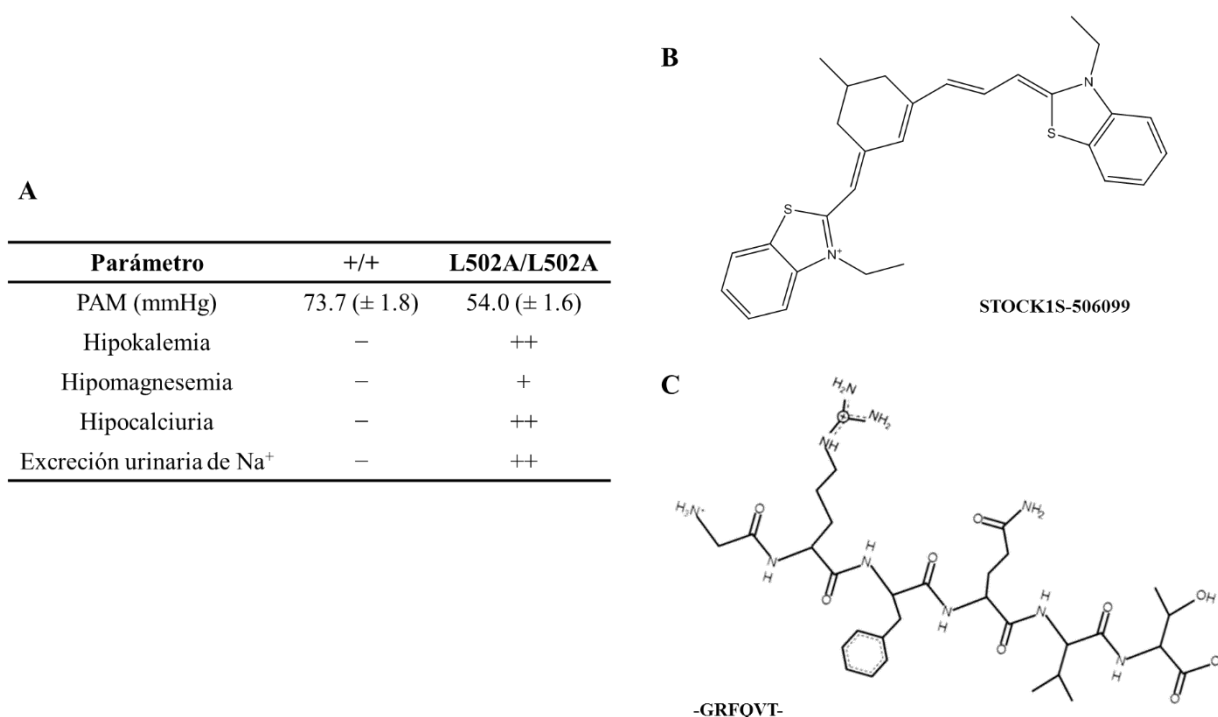
**Figura I.9:** Estructura tridimensional del dominio PF2 de OSR1. Estructura del dominio PF2 unido al péptido GRFQVT. Se muestran los aminoácidos involucrados en las interacciones de diferente naturaleza (A). Análisis de superficie del dominio PF2, se muestra el surco hidrofóbico del dominio que acopla al motivo RFxV. Azul = Hidrofílico, Rojo = Hidrofóbico (B). PDB: 2V3S. Visualización en Chimera 1.1 UCSF.

En la holo-estructura el péptido GRFQVT se posiciona precisamente en este surco y el motivo RFXV forma tres interacciones de distinta naturaleza que confieren la estabilidad entre el dominio PF2 y el péptido. La primera es una interacción electrostática entre el grupo guanidina en la arginina del motivo RFXV y dos aminoácidos de característica ácida en el dominio PF2, D459/E467 (OSR1 humano). Una característica del dominio PF2 es la presencia de estos residuos ácidos cuyo grado de conservación es muy alto. En este sentido es preciso mencionar que el segundo residuo E467 está conservado universalmente en los dominios PF2, con una localización de 1.5 giros desde el inicio de la primera hélice  $\alpha$ . Esta conservación se debe, en cierta medida, a que constituye el sitio de unión de la arginina del motivo RFXV, el cual se localiza cerca del asa que conecta la segunda hebra  $\beta$  y la primera hélice  $\alpha$ . La segunda interacción importante es el apilamiento  $\pi$  de anillos aromáticos entre la fenilalanina de la segunda posición en el motivo y la F452 en el dominio. Esta fenilalanina, junto con la F454, dan la característica hidrofóbica al surco. La última interacción es un apilamiento hidrofóbico del residuo valina en el motivo RFXV con la I450 en el PF2 (Figura I.9). Un detalle importante es que mediante un afinamiento del motivo consenso se demostró que el residuo en la cuarta posición también puede ser un residuo de isoleucina, lo que modifica la secuencia del consenso a RFXV/I (Austin et al. 2014).

En términos fisiológicos no se ha reportado alguna interacción en humanos que afecten la secuencia del dominio PF2 de SPAK/OSR1. Sin embargo, en un trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Alessi se generó un ratón con la mutación homocigótica L502A en el gen de SPAK que afecta la interacción con el péptido motivo RFXV/I al modificar la propiedad hidrofóbica del surco en el dominio PF2 (Zhang et al. 2015). Este ratón presenta un fenotipo hipotenso, el cual refleja anomalías en la regulación de la excreción urinaria de sal (Figura I.10 A). Este fenotipo exhibe la relevancia del dominio PF2 de SPAK en la regulación de los cotransportadores y en particular los que se encuentran en la nefrona como es el caso de NKCC1 y NCC. Además del fenotipo hipotenso, la caracterización bioquímica de los ratones indica que existe una disminución considerable de la fosforilación de los cotransportadores NKCC1, NKCC2 y NCC. En este sentido, la interacción de SPAK con la cinasa WNK1 y con los diferentes cotransportadores se ve dramáticamente disminuida.

Existe una evidencia más que apoya la importancia del dominio PF2 sobre la vía WNK-SPAK/OSR1-CCCs. En un intento por generar una nueva línea de fármacos con un potencial efecto inhibitorio de los cotransportadores NKCC2 y NCC, se realizó un tamizaje de moléculas con una estructura similar a un motivo RFXV/I. El objetivo de generar este tipo de fármacos es inhibir la vía al impedir la interacción de dominio PF2 con los motivos RFXV/I de las moléculas activadoras y

substratos. Mediante ensayos de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia (FCS por sus siglas en inglés), se reportó, que la molécula denominada STOCK 1S-50699 tiene la capacidad de impedir la interacción entre SPAK y las cinasas WNK. Esta molécula posee una  $CI_{50}$  de  $\sim 37 \mu M$  (Figura I.10 B, C) (Mori et al. 2013). Desafortunadamente, la molécula STOCK 1S-50699 es altamente hidrofóbica y presenta una solubilidad baja, por lo que, no puede ser usada para su estudio en modelos animales. Será necesario evaluar esta molécula inhibidora en un modelo animal, además de ganar más conocimiento en el mecanismo de inhibición.



**Figura I.10.** Implicaciones fisiológicas del dominio PF2 y estructura del inhibidor. (A) Alteraciones fisiológicas presentadas en el ratón homocigótico con la mutación L502 en el dominio PF2 de SPAK. El fenotipo es similar al presentado en el síndrome de Gitelman en el cual la activación de NCC se ve afectada. (B) Estructura de la molécula inhibidora del dominio PF2, se puede observar la cantidad de anillos aromáticos que vuelven a la molécula altamente hidrofóbica. (C) Estructura bidimensional del péptido GRFQVT que corresponde al motivo RFXV/I C-terminal de WNK4. PAM: Presión Arterial Media.

A partir de la evidencia de la interacción entre SPAK/OSR1 y los cotransportadores y de la evidencia de la interacción entre SPAK/OSR1 y las cinasas WNK, que surgió poco más adelante, diversos grupos empezaron a estudiar la relación funcional de estas proteínas. En uno de los trabajos iniciales Villa et al, demostraron que las cinasas WNK1 y WNK4 pueden fosforilar a SPAK/OSR1 y

estas a su vez realizan la fosforilación del cotransportador NKCC1 en residuos de treonina en la región amino terminal. Esto fue la pauta para la descripción de un mecanismo de regulación que es conservado entre los miembros de la familia de cotransportadores SLC12A.

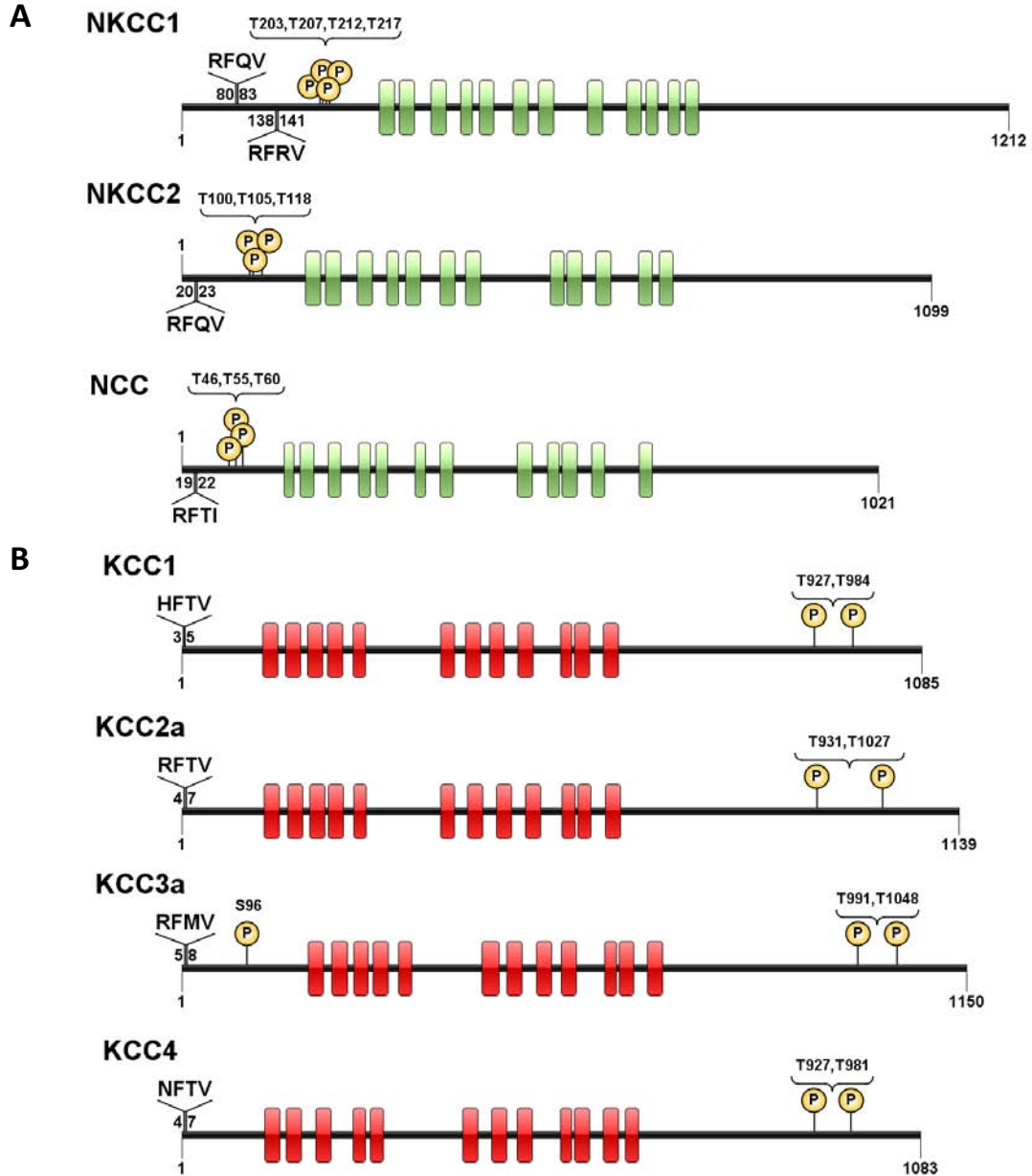
Las cinasas WNK pueden fosforilar a SPAK y OSR1 en dos residuos conservados. El primer sitio de fosforilación es T185/233 en OSR1 y SPAK, respectivamente. Este sitio se localiza en el asa de activación en el dominio cinasa. La fosforilación de asa de activación por WNK1 y demás miembros de la familia WNK, causa la activación de SPAK y OSR1. La mutación de la T185/233 por Alanina conducen a la pérdida por completo de la activación por parte de WNK1/4 (Figura I.8). El segundo sitio de fosforilación se encuentra en el dominio PF1 en un conjunto de aminoácidos denominado motivo-S. la fosforilación del motivo-S causa un cambio conformacional en SPAK/OSR1 necesario para alcanzar el estado completamente activo (Chen et al. 2004; Taylor et al. 2015). Sin embargo, al mutar este sitio por Alanina no se afecta la fosforilación del asa de activación (Zagórska et al. 2007).

## **I.5 Motivos RFXV en la vía WNK-SPAK/OSR1-CCCs.**

Los motivos RFXV/I localizados en la secuencia de los CCCs son necesarios para que la cinasa SPAK/OSR1 pueda fosforilar a los residuos de Ser/Thr en las colas citoplasmáticas de ambas ramas de los cotransportadores. Cinco de los siete CCCs descritos en esta tesis presentan al menos un motivo RFXV en su secuencia. En la Figura I.11 se ilustra la localización de estos motivos, además de su cercanía con los residuos fosforilables por las cinasas SPAK/OSR1. En este sentido, la presencia de este motivo de acoplamiento con las cinasas asegura la fosforilación directa de los residuos importantes en la regulación de los cotransportadores.

El cotrasportador NKCC1 presenta dos motivos RFXV/I en su cola N-terminal. Se ha demostrado la importancia de ambos motivos en la activación de cotransportador por SPAK/OSR1. Un dato interesante es el hecho de que un motivo RFXV/I se encuentra sobrepuesto a un motivo de acoplamiento a la Proteína Fosfatasa 1 (PP1) (Gagnon et al. 2007; Gagnon and Delpire 2010). Se ha propuesto que podría existir un mecanismo de regulación por competencia en términos de unión al motivo. El motivo de unión a PP1 se ha validado, demostrando así que existe una regulación dinámica que depende de las interacciones de ambas proteínas. A pesar de esto, no se ha logrado encontrar alguna señal que pueda inducir la unión específica con alguna de las dos proteínas. Sin embargo, se ha pensado que la interacción podría ser regulada por la fosforilación de residuos aledaños.





**Figura I.11:** Motivos RFxV en los cotransportadores SLC12A. (A) Localización de los motivos RFxV/I y sitios de fosforilación de las cinasas SPAK/OSR1 en los miembros de la rama acoplada a sodio. (B) Localización de los motivos de unión y sitios fosforilables en los diferentes KCCs.

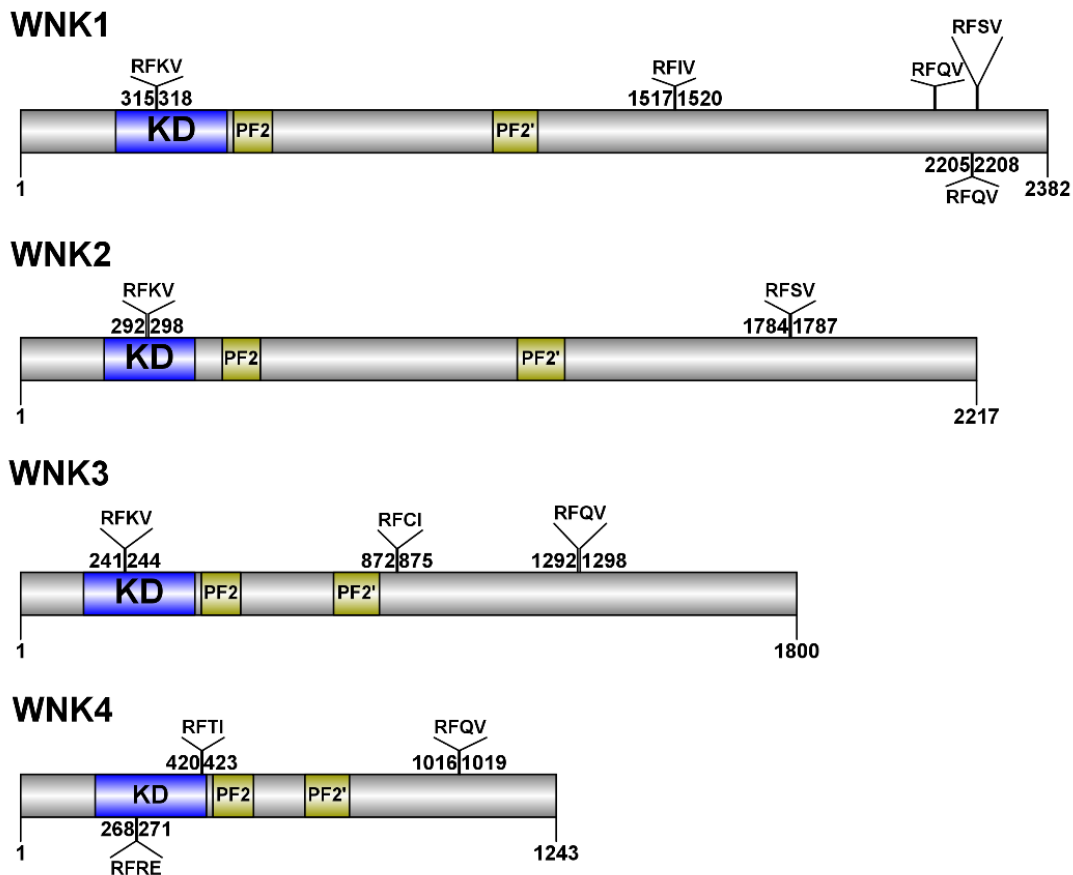
El motivo RFxV/I localizado en el extremo N-terminal del cotransportador NKCC2 es necesario para ser activado por las cinasas SPAK/OSR1 (Ponce-Coria et al. 2008). En un trabajo bioquímico, se demostró que la ausencia del motivo RFxV/I en la cola N-terminal reduce de manera considerable

la fosforilación de tres residuos cercanos al motivo cuya fosforilación es esencial para la activación del cotransportador (Richardson et al. 2011). Es importante mencionar que, en este trabajo también se describen otros residuos potencialmente fosforilables por cinasas diferentes a SPAK/OSR1. Por ejemplo, el residuo T130 en NKCC2 de humano, puede ser fosforilados por PKA de manera in vitro. Sin embargo, no se ha demostrado la función de esta fosforilación en la regulación del cotransportador en un sistema celular.

El motivo RFXV/I localizado en el extremo N-terminal de NCC es importante para su fosforilación por las cinasas SPAK/OSR1. En este sentido, se ha reportado la repercusión funcional que representa la ausencia del motivo (Moriguchi et al. 2005; Pacheco-Alvarez et al. 2006). Existen tres residuos de treonina que son fosforilados por SPAK/OSR1 en respuesta a la activación de las cinasas WNK. Mediante mutagénesis secuencial de estos residuos de treonina, se pudo determinar que el residuo T60 (NCC de humano) es indispensable para la activación de NCC (Richardson et al. 2008). De esta manera, se encontró que la mutación de T60A reduce la fosforilación de los sitios T46 y T55. Indicando que la fosforilación de T60 ayuda a establecer la subsecuente fosforilación de los sitios aledaños (Pacheco-Alvarez et al. 2006). La relevancia de este sitio en la fisiología humana ha sido demostrada gracias a que un grupo de pacientes asiáticos de síndrome de Gitelman presentan una mutación de la Treonina 60 por una Metionina (Maki et al. 2004; Lin et al. 2005; Shao et al. 2008).

La rama de cotransportadores SLC12A acoplados a potasio presenta dos miembros que contiene motivos RFXV/I en su secuencia. KCC2a y KCC3a, presentan un motivo localizado en su extremo N-terminal. La interacción de SPAK/OSR1 con estos motivos ha sido evidenciada únicamente en el ensayo inicial de doble híbrido en levadura (Piechotta et al. 2002). Se ha mostrado que la fosforilación de residuos de Ser/Thr localizados en el extremo C-terminal de los KCCs es realizada por las cinasas SPAK/OSR1 (Kahle et al. 2005, 2006; de los Heros et al. 2006). En este sentido, sería lógico pensar en la participación de motivo RFXV/I en el acoplamiento de las cinasas para catalizar la reacción de fosforilación que eventualmente conduce a la inactivación de los cotransportadores. Adicionalmente a lo anterior, existen trabajos en donde se ha demostrado el efecto inhibitorio de las cinasas WNK sobre varios miembros de los KCCs. Esta inhibición depende completamente de su capacidad catalítica por lo que sugiere la participación directa de las cinasas para efectuar la regulación (Rinehart et al. 2009). Un dato notable en este punto, es la ausencia de motivos RFXV/I en los demás miembros (KCC1 y KCC4) de la rama acoplada a potasio. Esta divergencia apunta a una posible regulación diferencial en términos de la vía WNK-SPAK/OSR1. Sin embargo, esta diferencia no ha sido atendida.

Como se mencionó anteriormente, las cinasas WNK presentan en su secuencia más de un motivo RFxV/I que son potenciales sitios de interacción con SPAK/OSR1 (Figura I.12). Por esta razón, se han realizado varios trabajos con la finalidad de identificar el papel que juegan en la interacción con SPAK/OSR1 cada uno de estos motivos RFxV/I presentes. A continuación, se describen los trabajos realizados hasta el momento.



**Figura I.12:** Motivos RFxV/I en las cinasas WNK. Se ilustran los motivos RFxV en las cinasas WNK así como su localización. La primera similitud en los motivos se encuentra el motivo RFKV conservado en el dominio cinasa de WNK1,2,3, pero no así para WNK4. En este ultimo la secuencia cambia a RFRE. Otra serie de motivos conservados son los encontrados en el C-terminal de todos los miembros. Estos se han demostrado ser importantes en la interacción con las cinasas SPAK/OSR1. Dominio PF2 (Pask-Fray 2), PF2' (Pask-Fray 2 similar).

La interacción de WNK1 con la cinasas SPAK/OSR1 ha sido descrita en diferentes trabajos. Un trabajo mostró mediante ensayo de doble híbrido en levadura con el dominio PF2 de OSR1 la interacción con 3 motivos RFxV/I localizados en el C-terminal de WNK1 (Anselmo et al. 2006). Este hallazgo fue corroborado posteriormente por el mismo grupo de investigación mediante la

inmunoprecipitación de SPAK con un fragmento de WNK1 que contiene a los 3 motivos RFXV más C-terminales (Sengupta et al. 2012). Mientras que, un grupo de investigación diferente, analizó la interacción entre la cinasa WNK1 y el dominio PF2 de SPAK y OSR1. En este trabajo mediante ensayos de “Pull-Down” se demostró la interacción del dominio PF2 de SPAK y OSR1 con la cinasa WNK1 endógena de célula de la línea HEK293. Adicionalmente, se demostró que la interacción entre estas dos cinasas es esencial para lograr la activación de OSR1 por WNK1 (Vitari et al. 2006).

En el caso de la cinasa WNK3, existe un trabajo donde se estudia la relevancia de los motivos RFXV/I sobre la activación de los cotransportadores de la familia SLC12A. En el trabajo generado por el laboratorio se demostró que el motivo localizado en el dominio cinasa de WNK3 es necesario para la activación de los cotransportadores NCC y NKCC1. A su vez éste es necesario para inhibir al cotransportador KCC4 (Pacheco-Alvarez et al. 2012). Sin embargo, al analizar mediante co-inmunoprecipitación la interacción entre SPAK y WNK3 se observó que la mutación de este motivo RFXV/I localizado en el dominio cinasa no previene la interacción entre las proteínas. También se analizó la contribución de los otros dos motivos RFXV/I presentes en WNK3 y se encontró que no afectan su capacidad de activar a NCC y NKCC1 o de inhibir a KCC4.

Por otro lado, en un trabajo más reciente de nuestro laboratorio, se observó también que el motivo localizado en el dominio cinasa de WNK1 es necesario para ejercer su efecto activador sobre el cotransportador NCC (Chávez-Canales et al. 2014). En este caso, no se realizaron ensayos para evaluar la interacción. Ambos trabajos de nuestro grupo reflejan la repercusión funcional de la ausencia del motivo RFXV/I del dominio cinasa de WNK1 y WNK3 sobre la activación de los cotransportadores SLC12A, lo que, sugiere un papel importante de este motivo.

Recapitulando lo mencionado en los dos párrafos anteriores, existe evidencia que indica la relevancia de motivo RFXV/I presente en el dominio cinasa de WNK1 y WNK3 para la activación de la vía SPAK/OSR1-CCCs. Sin embargo, los experimentos indican que a pesar de la ausencia de dicho motivo se sigue observando la interacción con SPAK. Esto sugiere que otros motivos podrían estar implicados en la interacción. El motivo RFXV/I localizado en el dominio cinasa de las WNKs se conserva desde WNK1 hasta WNK3, pero no es así para WNK4 (Figura I.12). En el caso de WNK4, existe un motivo RFXV/I dentro del dominio cinasa localizado en una posición más C-terminal con respecto a los otros miembros, el papel de este sitio en la función de la cinasa no ha sido estudiado. En cuando a los motivos RFXV/I C-terminales, la evidencia sugiere que aquellos presentes en el segmento que comprende los aminoácidos 1570-1758 (WNK1 de rata) de WNK1 puede mediar la

interacción con SPAK/OSR1, pero no se ha evaluado si estos motivos son indispensables para la interacción. Mientras que, la ausencia de los motivos C-terminales de WNK3 no parecen tener una repercusión sobre la regulación por WNK3 de NCC, NKCC1 y KCC4.

En cuando a WNK4, en la sección anterior se describió la estructura del dominio PF2 de OSR1 unida a un péptido con la secuencia GRFQVT. Este péptido se derivó de un segmento de la secuencia de WNK4 localizado en el C-terminal que contiene a un motivo RFXV/I y que está conservado en las demás WNKs. Por lo tanto, este motivo claramente tiene el potencial de mediar la interacción con SPAK/OSR1. Además, en el trabajo de Piechotta et al 2003 descrito ya anteriormente, el tamizaje del ensayo de doble híbrido muestra la interacción del motivo RFXV/I localizado en el C-terminal de WNK4 y el dominio PF2 de SPAK. Sin embargo, en estos experimentos se utilizó exclusivamente un fragmento pequeño de WNK4, por lo que no se evaluó el papel que podría tener el segundo motivo RFXV/I presente en el dominio cinasa.

La cinasa WNK4 es una molécula de particular interés en el laboratorio, dado que es un componente importante en la regulación fisiológica de los cotransportadores renales NCC y NKCC2. En esta tesis se hace un análisis detallado del papel que juega cada uno de los dos motivos RFXV/I presentes en WNK4 sobre la función de la cinasa. Con la intención de generar conocimiento sobre el mecanismo exacto de la interacción y activación de SPAK por WNK4 se realizaron una serie de experimentos en donde se describe el papel de los motivos en la interacción y activación de la vía. También es relevante mencionar que en la secuencia de las WNKs se presenta un dominio conservado cuya predicción estructural muestra semejanzas importantes con la estructura del dominio PF2 de SPAK/OSR1. Por esta razón, existe la posibilidad de que las cinasas WNKs tengan la capacidad de formar interacciones con motivos RFXV/I a través de este dominio aledaño al cinasa. En este trabajo se realizaron algunos experimentos para analizar con más detalle el papel de dominio PF2 de WNK4, que probablemente tenga un papel similar en las otras WNKs debido a su nivel de conservación.

## Hipótesis

Los motivos R<sub>FxV/I</sub> de WNK4 tienen una implicación en la interacción y activación de la cinasa SPAK, además de contribuir a la estabilidad de la interacción con SPAK. Mientras que, el dominio PF2 de WNK4 está implicado en la interacción con NKCC1.

## Objetivos Generales

- Evaluar el papel de los motivos R<sub>FxV/I</sub> de WNK4 sobre la vía WNK4-SPAK-NKCC1.
- Evaluar la contribución del dominio PF2 de WNK4 sobre la interacción con NKCC1.

## Objetivos Particulares

- Determinar la contribución de los motivos R<sub>FxV/I</sub> de WNK4 sobre la activación/interacción con SPAK.
- Determinar el efecto de la restitución en WNK4 del motivo R<sub>FxV/I</sub> del dominio cinasa conservado en todos los miembros de la familia WNK excepto en WNK4.
- Analizar la localización celular del complejo WNK4 y SPAK
- Determinar el papel del dominio PF2 en WNK4 sobre la interacción con NKCC1
- Analizar la contribución del dominio C-terminal de WNK4 sobre la interacción con NKCC1

## II Material y Métodos

### II.1 Material

#### *Clonas de cDNA*

A continuación, se enlista las clonas de cDNA generadas y utilizadas en este trabajo. El plásmido hWNK4-pcDNAF fue proporcionado por la Dra. Juliette Hadchouel. Los plásmidos SPAK-pCMV5 y SPAK-pEGFP-C1 fueron proporcionados por el Dr. Darío Alessi. La clona mWNK4-pcDNA3.1 generada previamente por la Dra. María Castañeda Bueno.

<i>Clona cDNA</i>	<i>Etiqueta</i>	<i>Plásmido</i>
hWNK4	Flag	pcDNAF
hWNK4 F421A	Flag	pcDNAF
hWNK4 RF1016,1017AA	Flag	pcDNAF
hWNK4 E271V	Flag	pcDNAF
hWNK4 F421A-RF1016,1017AA	Flag	pcDNAF
hWNK4 E271V-F421A	Flag	pcDNAF
hWNK4 E271V-F421A-RF1016,1017AA	Flag	pcDNAF
hWNK4 D321A	Flag	pcDNAF
hWNK4 L322F	Flag	pcDNAF
hWNK4 L322F-F421A	Flag	pcDNAF
hWNK4 L322F-RF1016,1017AA	Flag	pcDNAF
hWNK4 L322F-F421A-RF1016,1017AA	Flag	pcDNAF
hWNK4 FF476,478AA	Flag	pcDNAF
hWNK4 FF476,478AA-RF1016,1017AA	Flag	pcDNAF
hWNK4 FF476,478AA-F421A-RF1016,1017AA	Flag	pcDNAF
hWNK4	Flag-mRFP1	pcDNAF
hWNK4 L322F	Flag-mRFP1	pcDNAF
hWNK4 F421A	Flag-mRFP1	pcDNAF

hWNK4 RF1016,1017AA	Flag-mRFP1	pcDNAF
hWNK4 F421A-RF1016,1017AA	Flag-mRFP1	pcDNAF
mWNK4	HA-Flag	pcDNA3.1
mWNK4 R996X	HA-Flag	pcDNA3.1
mWNK4 T1029X	HA-Flag	pcDNA3.1
mWNK4 G1108X	HA-Flag	pcDNA3.1
mWNK4 P1157X	HA-Flag	pcDNA3.1
mWNK4 K1211X	HA-Flag	pcDNA3.1
hSPAK	HA	pCMV5
hSPAK	GFP	pEGFP-C1

**Tabla II.1:** Clonas de cDNA con mutaciones puntuales utilizadas en este trabajo.

### *Anticuerpos*

Anticuerpos	Secuencia reconocida	Origen	Concentración en WB
FLAG-HRP	DYKDDDDK	Sigma-Aldrich (A8592)	1:5000
HA-HRP	YPYDVPDYA	Sigma-Aldrich (H6533)	1:1000
Actina-HRP	aa 1-19	Sc-1616 HRP	1:2500
GFP	N.A	Sigma-Aldrich (G1544)	0.5ug/ml
hSPAK pS373	RRVPGSS*GHLHKT	MRC Dundee (S670B)	2ug/ml
hWNK4 pS335	KRASFAKS*VIGTPEF	MRC Dundee (S099B)	3ug/ml
hNKCC1	aa 1-280	MRC Dundee (DU34492)	2ug/ml
Sheep-HRP	N.A	Jackson ImmunoResearch	1:10000
Rabbit-HRP	N.A	Jackson ImmunoResearch	1:2500

**Tabla II.2:** Anticuerpos utilizados en este trabajo.

### *Soluciones*



<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
Medio de Cultivo	DMEM 1X (Gibco) suplementado con 10% (v/v) FBS; 1% (v/v) penicilina/estreptomicina.
PBS	137mM NaCl; 2.7mM KCl; 8.1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1.5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.4
Buffer de lisis	50mM Tris-HCl, pH7.5; 1mM EGTA; 1mM EDTA; 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 50mM NaF; 5mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; 0.27M Sacarosa; 1% v/v Nonidet-40; Inhibidores de proteasas (Complete; Roche)
Buffer salino de Tris (TBS)	2mM Tris-HCl, pH 7.5; 150mM NaCl
TBS-T	TBS; 0.2% Tween-20
Buffer de transferencia	48nM Tris-base; 39mM Glicina; 20% Metanol
Buffer de lavado de IP	50mM Tris-HCl, pH7.5; 1mM EGTA; 1mM EDTA; 0.27M Sacarosa; 1% v/v Nonidet-40.

**Tabla II.3:** Composición de las soluciones utilizadas en los procedimientos.

## II.2 Métodos

### *Mutagénesis sitio dirigida*

Para estudiar la contribución de los motivos RFXV/I de WNK4 en la interacción con SPAK y activación de ésta se realizó la mutación de las fenilalaninas de cada motivo (Tabla II.1). Además, se realizó la mutación de diversos residuos en lugares específicos que se describirán más adelante en la sección de resultados. Las mutaciones puntuales se realizaron empleando el QuickChangeII Site Directed Mutagenesis Kit de Agilent Technologies. Brevemente, el procedimiento consiste en el diseño de un par de oligonucleótidos en donde la mutación deseada es flanqueada por un aproximado de 15 nucleótidos (Anexo I). Se realiza la reacción de PCR y posteriormente se aíslan las clonas positivas. En todos los casos la introducción de la mutación fue corroborada mediante secuenciación

y posteriormente se llevó a cabo la subclonación del fragmento mutado en una clona que no sufrió PCR (Anexo II).

### ***Cultivo de células HEK293***

Las células fueron mantenidas en placas de superficie de 10 cm a una confluencia máxima de 90%. Para diluir las células, el medio fue aspirado y las células se lavaron cuidadosamente con PBS estéril, se incubaron por 5 min. a 37°C con Tripsina/EDTA. Las células fueron diluidas aproximadamente 1:5 veces y colocadas en platos nuevos de 10 cm. Para los experimentos presentados en este trabajo se utilizaron células con un máximo de 25 pases. En todo momento las condiciones de incubación para las células fueron 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***Transfección transitoria en células HEK293***

Para la transfección de las células, el día previo se sembraron 800×10<sup>3</sup> células por pozo en una placa de 6 pozos. Para cada pozo se empleó una cantidad máxima de 2 µg de DNA. El DNA fue mezclado con OptiMEM en un volumen de 100 µl y en un tubo adicional se diluyó la Lipofectamina 2000 (Invitrogen) (5 ul de lipofectamina por pozo). Ambas diluciones se mezclaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. La transfección se realizó en medio DMEM no suplementado en un volumen de 1.5 ml. Después de 4 horas de exposición con los complejos de Lipofectamina y DNA, el medio fue sustituido por medio suplementado y se incubaron las células por 48 horas más antes de ser lisadas.

### ***Lisis de células HEK293***

Para la lisis de las células transfectadas, se aspiró el medio y se lavaron las células con PBS. Las células fueron lisadas en un volumen de 120 µl de buffer de lisis (con inhibidores de proteasas y fosfatasas) por cada pozo. Después de añadir el buffer de lisis las células se mantuvieron a 4°C (hielo) en todo momento. Para obtener todas las células adheridas se emplearon raspadores y la suspensión fue centrifugada para obtener el sobrenadante a 14000g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado y posteriormente se determinó la concentración de proteína. Para su almacenaje los lisados fueron congelados a -20°C.

### ***Determinación de la concentración de proteína***

La concentración de proteína fue determinada por el método de BCA (ácido bicinonínico) de Pierce (23225), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para la determinación en placas de 96 pozos. Para cada ensayo se generó una curva estándar de concentraciones de 0-2 µg de BSA

(albúmina de suero bovino). La determinación de concentración de proteína en las muestras se realizó por duplicado y se utilizó una dilución de 1:10. La absorbancia a 562 nm se midió utilizando un lector de placas Epoch 2 (BioTek). La ecuación obtenida de la curva estándar fue empleada para determinar la concentración de cada muestra.

### ***Inmunoprecipitaciones***

Para los ensayos de inmunoprecipitación empleamos perlas de agarosa acopladas a anticuerpo ANTI-FLAG (Sigma-Aldrich A2220). Las perlas fueron lavadas 3 veces con PBS antes de la incubación con el lisado. Aproximadamente 400 µg de lisado fueron empleados por cada reacción de inmunoprecipitación y 15 µl de perlas. Se llevó la mezcla a un volumen de 800 µl con buffer de lisis adicionado con inhibidores de proteasas (Complete, Roche). La reacción ocurrió a 4°C en agitación por inversión por al menos 2 horas. Posterior a la incubación las perlas se lavaron 3 veces con buffer de lavado IP y 2 veces con PBS. La elución se hizo al añadir buffer Laemmli + β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e incubando a 95°C por 10 min. Posteriormente las muestras fueron analizadas por Western Blot.

### ***Western Blot***

Para los ensayos de Western Blot se cargaron aproximadamente 20 µg de proteína por muestra de lisado total o un volumen de 20 µl para las inmunoprecipitaciones. Los geles corrieron a un patrón de 100V por 90 min. La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF se realizó en el Trans-Blot Turbo de BioRad y se emplearon los reactivos comerciales para este tipo de equipo. El bloqueo de las membranas se realizó con agente bloqueador (BioRad) al 5%. La incubación con los anticuerpos se realizó en una dilución en agente bloqueador al 5% y la concentración para cada anticuerpo se especifica en la Tabla II.2. La detección de las bandas se realizó en el equipo C-DiGit Blot Scanner de LICOR mediante quimioluminiscencia. El análisis densitométrico se determinó en el software Image Studio. Para el análisis de los datos, los valores de intensidad de cada banda fueron normalizados con los valores de intensidad de la banda de actina correspondiente.

### ***Transformación de bacterias E. coli.***

Para cada transformación se usaron aproximadamente 30 µl de bacterias competentes de la cepa *E. coli* XL-Blue (Agilent). Para transformar reacciones de PCR para mutagénesis se emplearon aproximadamente 5 µl de la reacción, mientras que para plásmidos analizados previamente se emplearon 100 ng aproximadamente. La mezcla de DNA y bacterias ocurrió a 4°C por 30 minutos. Posterior a esta incubación se dio un choque térmico de 45 segundos a 42°C en un baño de agua sin

agitación. Posteriormente, se incubaron 2 min en hielo y se recuperaron en medio SOC por al menos 2 horas. Las bacterias fueron sembradas en placas de LB agar con 100 µg/ml de ampicilina o kanamicina de acuerdo a la resistencia de cada plásmido.

### ***Microscopia confocal***

Para la obtención de imágenes en el microscopio confocal de las proteínas marcadas, SPAK-GFP (Green Fluorescent Protein) y WNK4-mRFP1 (monomer Red Fluorescent Protein -1), ambas clonas fueron transfectadas en células sembradas sobre cubreobjetos redondos de un diámetro de 12 mm. La transfección siguió el mismo protocolo anteriormente mencionado. Después de 48 horas de la transfección las células fueron preparadas para su observación en el microscopio. La preparación fue la siguiente, inicialmente las células fueron lavadas 3 veces con PBS adicionado con MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>. Después de los lavados se fijaron las células mediante la incubación con paraformaldehído 4% por 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados más con PBS adicionado. Posteriormente, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos. Como medio de montaje se usó Vectashield (H-1000). La captura de imágenes se realizó en el microscopio confocal Zeiss LSM 5 PASCAL usando el objetivo Zeiss 100x Plan Neofluar Oil N.A. 1.3. Las imágenes fueron analizadas en el software ImageJ con el “plugin colocalization”.

### ***Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM)***

La obtención de imágenes de microscopía de súper-resolución se realizó con la técnica de iluminación estructurada. Brevemente, se utilizó el microscopio invertido Axio Observer Z1 con los siguientes láseres: 405 nm diodo, 488 nm OPSL y 561 nm OPSL. El microscopio está acoplado a la cámara PCO edge sCMOS. Las imágenes fueron adquiridas con el objetivo Plan-APOCHROMAT 63x N.A 1.4 Oil. Las muestras fueron iluminadas con una luz de láser de iluminación estructurada. La estructuración de la iluminación se logra al hacer pasar la luz por una rejilla. Se realizó la toma de imágenes en tres fases cada una con una rotación de 60 grados. El análisis de la superposición y reconstrucción de las imágenes se realizó en el software ZEN Blue Carl Zeiss.

### ***Análisis estadístico***

Todas las comparaciones presentadas fueron realizadas con la prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguidas de un análisis de Bonferroni de comparaciones múltiples. Para considerar una significancia estadística se consideró un valor de P menor a 0.05. El análisis se realizó en el software GraphPad Prism 6, La Jolla, California, USA.

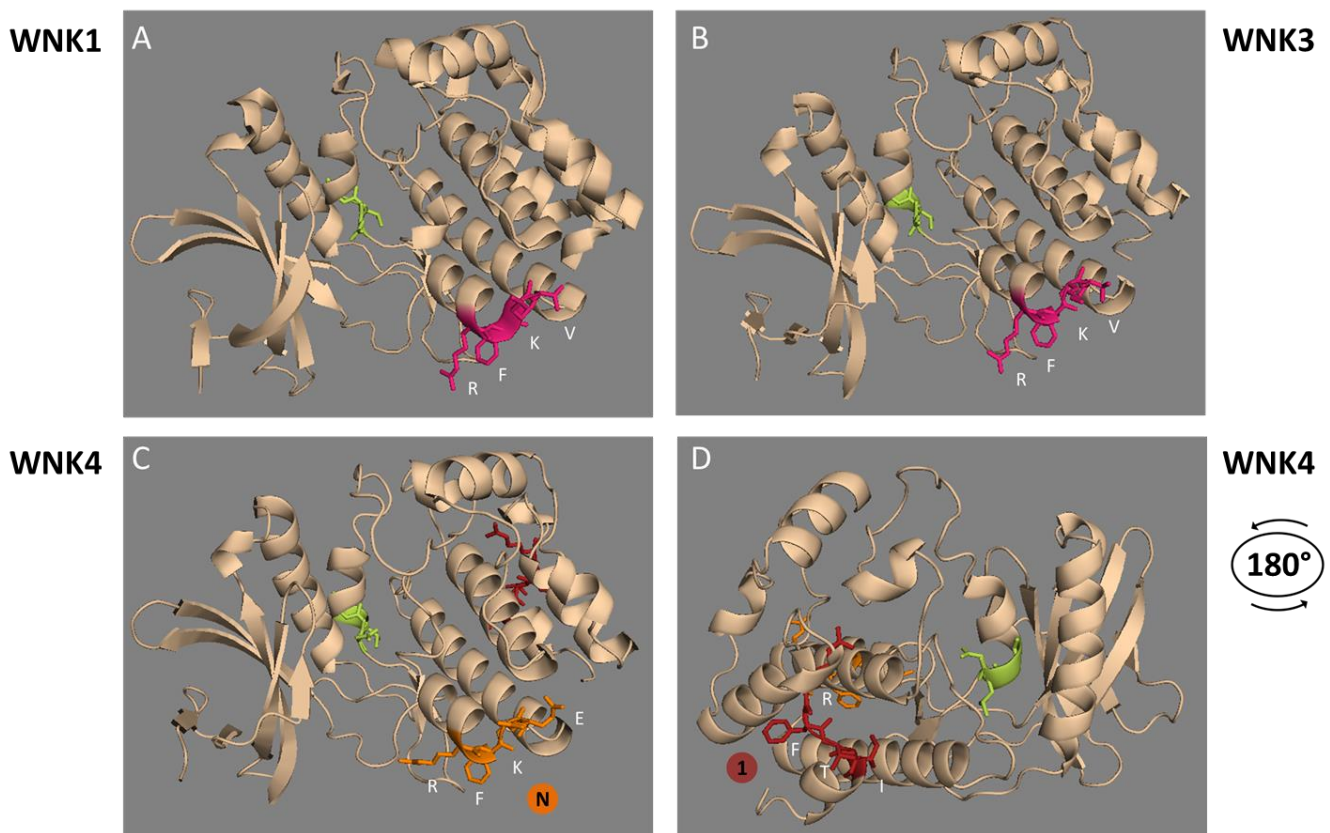
## III Resultados

### III.1 Localización de los motivos RFXV/I en el dominio cinasa de las WNK

En la Figura I.12 se representa a las diferentes cinasas WNK, se muestra que a lo largo de su secuencia que existen varios motivos con el consenso RFXV/I. Algunos de estos motivos están conservados en los diferentes miembros de la familia, como se muestra en el alineamiento presentado en la Figura AIII.1 que se encuentra en el Anexo III. Todas las WNKs presentan al menos un motivo RFXV/I en el extremo C-terminal. Uno de estos motivos C-terminales está conservados en todas las WNKs, lo cual sugiere que éste debe de tener un papel relevante en la función de las cinasas. Además, hay un segundo motivo conservado en WNK1, WNK2 y WNK3 que se localiza en el dominio cinasa. En WNK4 este motivo no está presente, pero existe otro motivo con una localización más C-terminal justo al final del dominio cinasa. Con el objetivo de determinar la accesibilidad y la localización tridimensional de los motivos RFXV/I presentes en el dominio cinasa de las WNK, se generaron modelos estructurales basados en la homología de secuencias. Para esto se utilizó el servidor I-TASSER, el cual utiliza una base de datos generada a partir de las estructuras depositadas en el Protein Data Bank. El procedimiento sigue un patrón idéntico para la predicción de cada modelo. Brevemente, al someter una secuencia problema, el servidor realiza un alineamiento de secuencia de aminoácidos para buscar homología con alguna proteína que tenga una estructura resuelta. Posteriormente realiza una predicción inicial de estructura secundaria basada en los elementos de homología. Los modelos tridimensionales se generan al utilizar el mejor templado en base a la homología en secuencia. Esto disminuye el poder computacional necesario para generar una estructura *ab initio*. Finalmente, los aminoácidos que no coincidan con el modelo templado en cuestión, son modelados por una simulación de Monte Carlo y así se genera la estructura de la secuencia en problema (Roy et al. 2010; Yang et al. 2014).

El análisis de las estructuras arrojó datos interesantes. Como se esperaba, el mejor templado para las secuencias sometidas de WNK3 y WNK4 fue la estructura del dominio cinasa de WNK1. La estructura del dominio cinasa de las WNK presenta la bi-lobularidad característica de los dominios

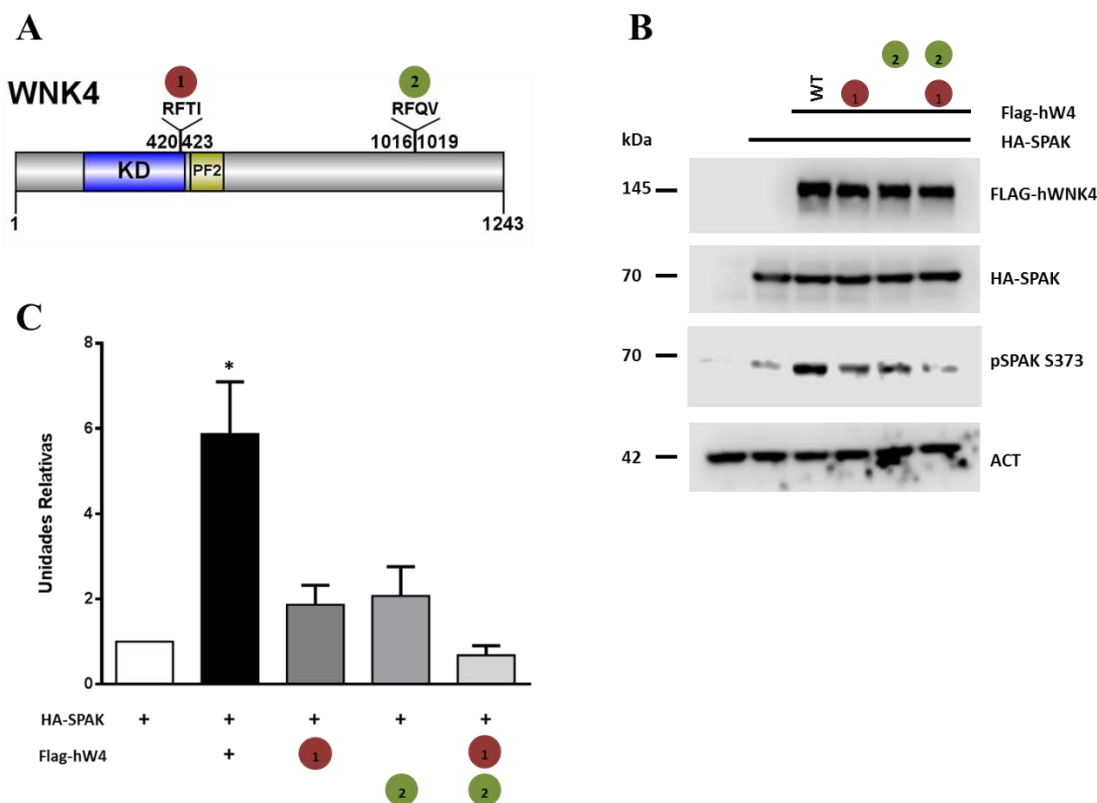
cinasa. La localización del motivo RFxV/I de WNK1 y WNK3 está conservada. Como ya se dijo, este motivo no está conservado en la estructura primaria de WNK4. Sin embargo, WNK4 presenta otro motivo RFxV/I en el dominio cinasa que en el modelo estructural se localiza en el lado opuesto al del conservado en los demás miembros de la familia. Este motivo se encuentra en una región accesible con un potencial de poder ser blanco de interacción con los dominios PF2. En una predicción con un mayor número de aminoácidos pude encontrar que el motivo RFxV/I en WNK4 cae en una secuencia que conecta al dominio cinasa con el dominio PF2 (Anexo IV). El hecho de que el motivo RFTI no presente estructura secundaria es un dato importante porque permite pensar en la posibilidad de que este motivo sea accesible y pueda mediar una interacción con SPAK.



**Figura III.1:** Predicción de la estructura tridimensional de los dominios cinasa de WNK1, 3 y 4. (A) Localización del motivo RFKV en el dominio cinasa de WNK1. (B) El motivo RFKV en WNK3 se localiza en la misma posición que en WNK1. (C) El motivo RFRE en WNK4 está localizado en la misma posición que el motivo RFKV de WNK1 y WNK3. Dado que este motivo no presenta la secuencia consenso característica de los motivos implicados en la interacción con SPAK, en este trabajo se denominó a este motivo el “motivo N”, debido a que más adelante se generó una mutante de WNK4 en la que se introdujo un motivo consenso en esta posición (motivo Nuevo). (D) Motivo RFTI de WNK4 localizado en el lado opuesto a los motivos presentes en otras WNKs. El motivo catalítico DLG se muestra en verde. WNK1 PDB: 3FPQ

### III.2 Papel de los Motivos RFxV/I de WNK4 en la activación de SPAK

WNK4 presenta dos motivos RFxV/I en su secuencia (Figura I.12). Como se describió en la introducción, hasta el momento se ha descrito que un péptido con la secuencia GRFQVT, que corresponde a la secuencia del motivo RFxV/I C-terminal de WNK4, interacciona *in vitro* con el dominio PF2 de OSR1 (Villa et al. 2007). También se ha reportado que, en ensayos de doble híbrido, un segmento C-terminal de WNK4 mismo que contiene al motivo interacciona con SPAK (Piechotta et al. 2003). En el análisis de búsqueda de motivos se encontró un motivo RFxV/I en el dominio cinasa de WNK4, sin embargo, no se ha estudiado aun el impacto que tiene la ausencia de cada uno de estos motivos sobre la función de la cinasa, lo cual nos daría información sobre la relevancia de cada uno para la activación de SPAK y, por ende, para la regulación de los CCCs. Es por esto que decidimos generar y estudiar mutantes de WNK4 carentes de los motivos RFxV/I. Las mutantes generadas se describen en la Tabla II.1.



**Figura III.2:** Motivos RFxV/I de WNK4 necesarios para activar a SPAK. (A) Localización de los motivos RFxV/I en WNK4. (B) Western Blot representativo de las diferentes mutantes de WNK4 y su efecto sobre la fosforilación de SPAK en la S373. (C) Densitometría de tres experimentos independientes, nivel de pSPAK S373 n=3 \* p < 0.05.

Inicialmente, se decidió evaluar la capacidad de las mutantes de fosforilar a la cinasa SPAK (Figura III.2). Para esto se transfectaron células HEK293 con SPAK-HA y con las diferentes construcciones de WNK4 y se determinó el nivel de fosforilación de SPAK en los lisados totales mediante Western Blot utilizando un fosfo-anticuerpo dirigido contra el epítipo de SPAK que contiene a la S373 fosforilada. En la ausencia del primer motivo RFXV/I (“mutante del motivo 1”) observamos una disminución considerable de la capacidad para fosforilar SPAK. La mutación del segundo motivo RFXV/I (“motivo 2”) tuvo un efecto similar (Fig. III.2 B). Los experimentos se realizaron tres veces de manera independiente. En la Figura III.2 C se grafican los promedios de la intensidad de las bandas observadas en cada uno de estos experimentos. Estos resultados demuestran que ambos motivos RFXV/I presentes en WNK4 son necesarios para activar a SPAK.

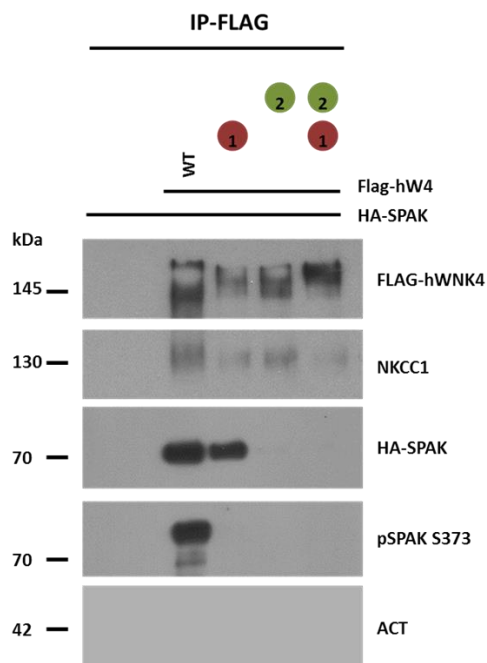
### **III.3 Interacción WNK4-SPAK es mediada por un solo motivo RFXV**

Con el objetivo de analizar la contribución de los motivos RFXV/I en la interacción de WNK4 con SPAK se realizaron inmunoprecipitaciones a partir de lisados de células HEK293 transfectadas con SPAK y WNK4 (silvestre o mutantes), aprovechando la etiqueta FLAG de WNK4. Como control negativo de la inmunoprecipitación se incluyó un grupo de células transfectadas solamente con SPAK-HA para demostrar que no existe unión inespecífica de SPAK-HA o NKCC1 a las perlas ANTI-FLAG (Figura III.3 A). El cotransportador NKCC1 se expresa de manera endógena en las células HEK293. En presencia de WNK4 silvestre, se observa la formación de complejos WNK4-SPAK-NKCC1 (Fig. III.3 A). Es importante notar que la cinasa SPAK en este complejo está fosforilada en la S373. En presencia de la mutante del “motivo 1” de WNK4 se observa que las interacciones WNK4-SPAK y WNK4-NKCC1 se conservan. Sin embargo, la cinasa SPAK que permanece unida a WNK4 no se encuentra fosforilada. Esto va de acuerdo al resultado presentado en la Figura III.2 y apunta a que este motivo es importante para la activación de SPAK, pero indica que no es indispensable para la formación de complejos WNK4-SPAK. En contraste, ante la ausencia del “sitio 2” se observa una pérdida en la interacción WNK4-SPAK que también explica la ausencia de fosforilación de SPAK. De manera interesante, la mutación del sitio 1, del sitio 2 o las mutaciones de ambos sitios no afectaron la interacción con NKCC1. Esto sugiere que existe una interacción entre WNK4 y NKCC1 que es independiente de la presencia de la cinasa SPAK, lo cual diverge de lo anteriormente propuesto (Delpire and Gagnon 2008; Richardson and Alessi 2008; Alessi et al. 2014): en donde SPAK es la cinasa que recluta a los cotransportadores y a las WNKs al complejo, mediante la interacción del dominio PF2 de SPAK con los motivos RFXV/I presentes en las WNKs y en los

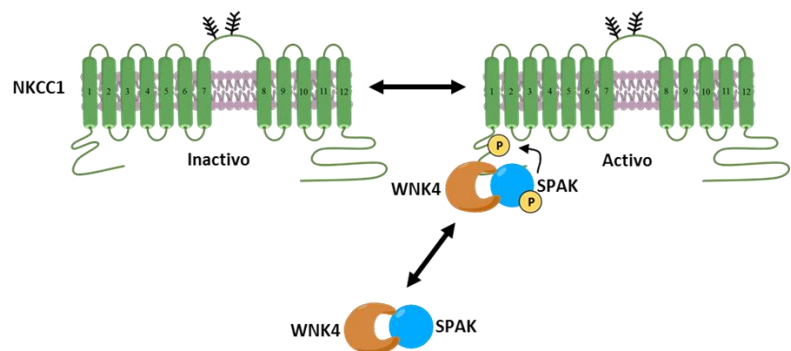


CCCs. El fenotipo que presenta la doble mutante es similar al observado en la ausencia de segundo motivo RFxV/I. En resumen, estos resultados indican que existe una interacción con SPAK fuerte mediada por el “motivo 2” de WNK4 y que el “motivo 1” no es esencial para la formación de complejos, ya que el “motivo 2” es suficiente para que ocurra la interacción. Sin embargo, el “motivo 1” es esencial para la activación de SPAK por WNK4, por lo que se puede proponer que este motivo podría ser esencial para que ocurra una interacción más débil que es necesaria para posicionar a SPAK en el dominio catalítico de WNK4.

**A**



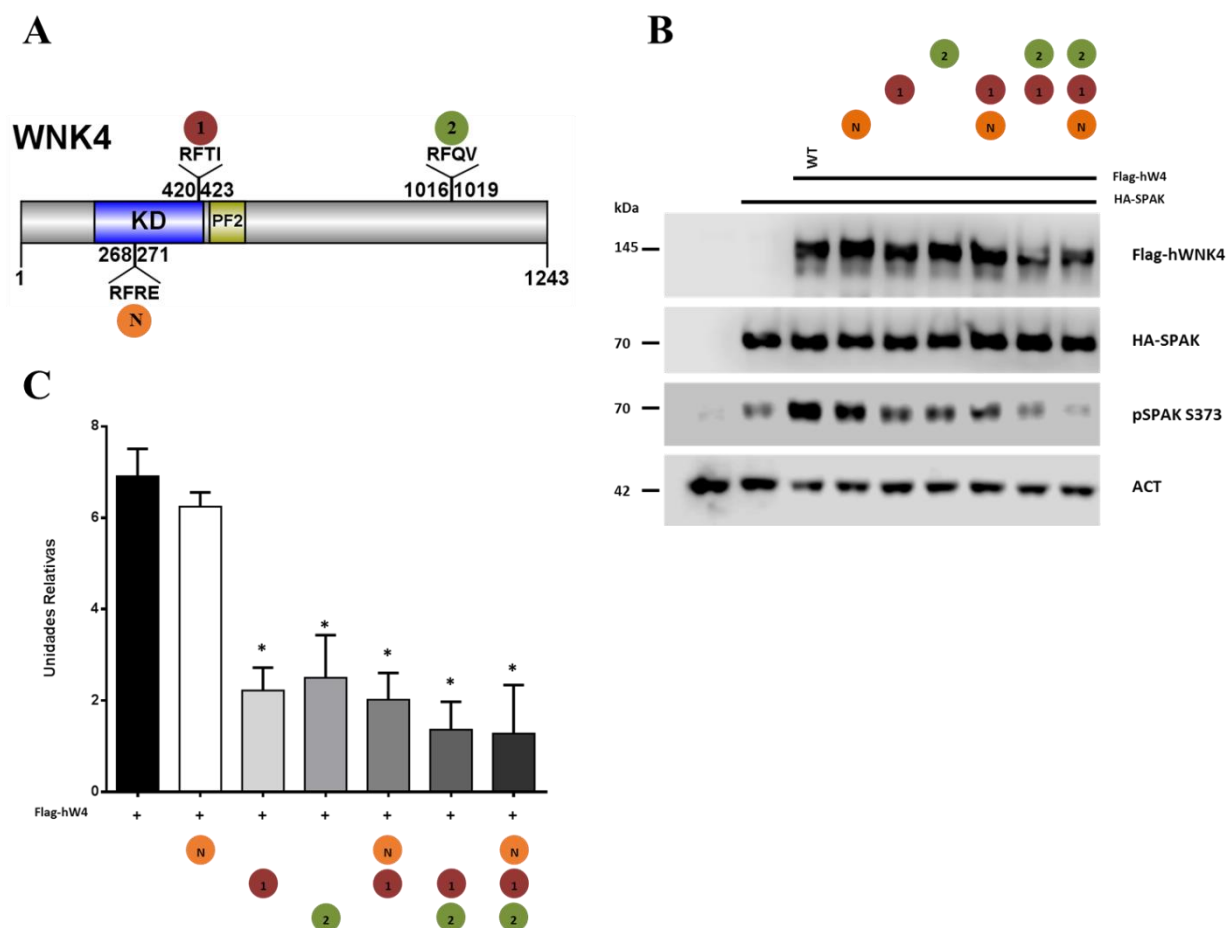
**B**



**Figura III.3:** Interacción del complejo WNK4-SPAK-NKCC1 mediada por los motivos RFxV/I. (A) Western Blot representativo de la inmunoprecipitación realizada contra Flag-hWNK4, el WB de actina funciona como control negativo de la especificidad de la purificación. El experimento se repitió tres veces de manera independiente. (B) Esquema del modelo propuesto de activación de NKCC1 por las cinasas SPAK y WNK4.

### III.4 La adición del motivo RFxV/I no conservado en WNK4 no rescata la activación de SPAK

WNK4 presenta un arreglo de motivos RFxV/I diferente a las otras WNK en el dominio cinasa. Mencionado anteriormente, todos los miembros de la familia a excepción de WNK4, presentan un motivo RFKV conservado en el dominio cinasa con una localización entre las hélices  $\alpha$ D y  $\alpha$ E. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se reportó que este motivo RFKV de WNK1 y de WNK3 es esencial para la regulación de los CCCs. En el caso de WNK4, el motivo no se conserva, ya que en el alineamiento de secuencias en esta posición se observa la secuencia RFRE.



**Figura III.4:** La introducción del motivo RFxV/I (N) en WNK4 no rescata la activación de SPAK en la ausencia de los “motivos 1 y 2”. (A) Esquema de la localización de los motivos RFxV/I en WNK4. (B) Western Blot representativo del efecto de las diferentes mutantes RFxV/I de WNK4 sobre la activación de SPAK. (C) Análisis densitométrico de tres experimentos independientes, unidades normalizadas de pSPAK S373 n=3 \* p < 0.05.

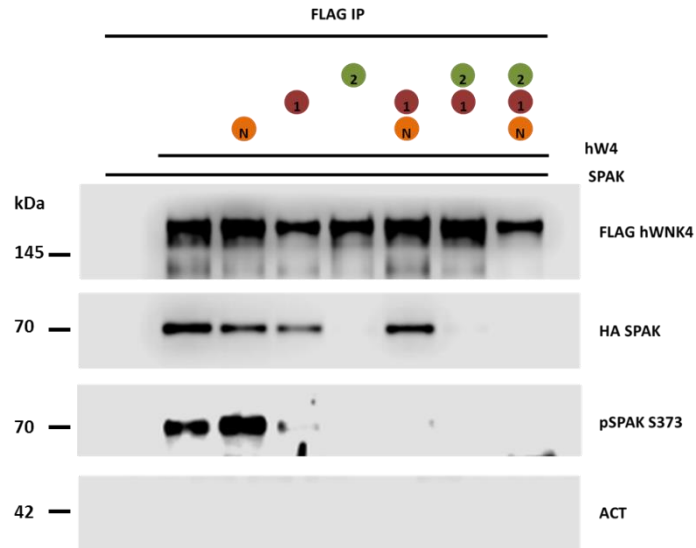
Con la finalidad de determinar si la introducción de dicho motivo (al que denominamos “motivo N”) en WNK4 es capaz de rescatar los efectos de la ausencia de los “motivos 1 y 2” presentados en las secciones anteriores, se diseñaron las mutantes presentadas en la Figura III.4. La primera mutante es una cinasa WNK4 que contiene 3 motivos RFXV/I, los motivos 1 y 2 originales y el motivo “N”. En el Western Blot representativo y análisis densitométrico (Figura III. 4 B y C) se puede observar que la introducción del sitio N no afectó la activación de SPAK por WNK4. La segunda mutante generada se asemeja a las otras cinasas WNK en términos del arreglo de motivos RFXV/I, ya que carece del “motivo 1”, pero presenta el “motivo N” y el “motivo 2”. En la Figura III. 4 se observa que la introducción del “motivo N” no fue capaz de rescatar la capacidad de WNK4 de fosforilar a SPAK que se pierde en la ausencia del “motivo 1”. La tercera mutante carece de los “motivos 1 y 2” y presenta el “motivo N”. Como se puede observar, en este caso la introducción del motivo nuevo tampoco rescata la capacidad de fosforilar a SPAK.

### **III.5 La interacción WNK4-SPAK no se rescata por la adición del motivo RFRV (N)**

Para evaluar el efecto de la introducción del “motivo N” sobre la interacción SPAK-WNK4 se realizaron inmunoprecipitaciones con las diferentes mutantes presentadas en la sección anterior. El resultado de estos experimentos muestra que la introducción del “motivo N”, en presencia de los otros dos motivos, no alteró la interacción con SPAK, ni la fosforilación de ésta. Se observó que, la mutante que asemeja a las otras WNK en términos del arreglo de motivos RFXV sí interacciona con SPAK, pero en este caso la SPAK co-inmunoprecipitada no se encuentra fosforilada en la S373. Este dato corrobora que la adición de este sitio no rescata la capacidad de activar a SPAK. La introducción del “motivo N” no modifica el fenotipo de la doble mutante en donde se pierde por completo la interacción con la cinasa SPAK. El hecho de que la adición de este sitio homólogo en las otras cinasas WNK, pero ausente en WNK4 no rescate la función, implica que el arreglo específico de motivos RFXV en WNK4, en particular en el dominio cinasa, es importante para la activación de SPAK.

**A**

Motivo RFxV	Mutación
N	E <sub>271</sub> V

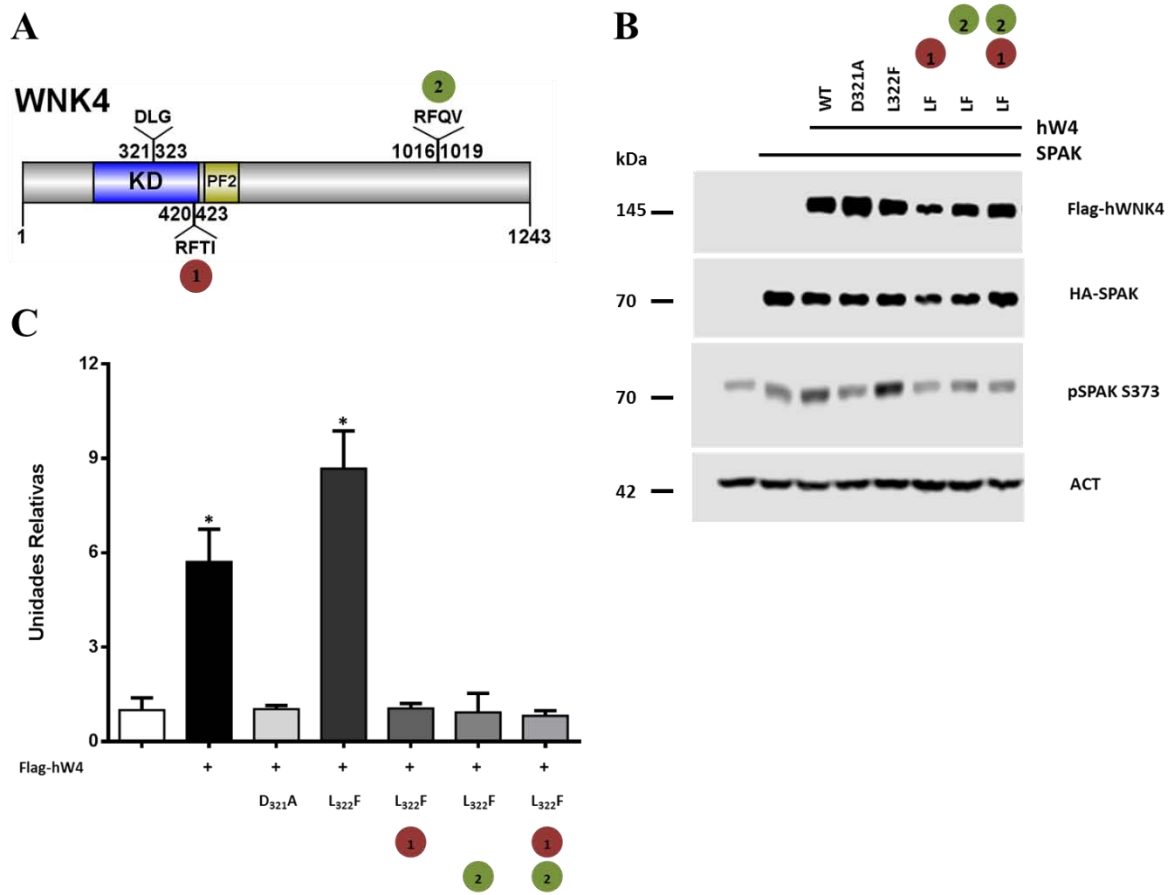
**B**

**Figura III.5:** El “motivo RFRV N” no rescata la interacción con SPAK. (A) Mutación realizada en WNK4 para adicionar un motivo RFxV. (B) Western Blot representativo de la inmunoprecipitación realizada con las mutantes de Flag-hWNK4 indicadas, n=2.

### III.6 La cinasa WNK4 constitutivamente activa es afectada por la ausencia de motivos RFxV/I

En el laboratorio, anteriormente se demostró que la sustitución por Fenilalanina de la Leucina 322 del motivo DLG en el dominio cinasa de WNK4 (humana) causa la activación constitutiva de la cinasa debido a que se impide la unión de iones cloruro al sitio activo (Bazua-Valenti et al. 2015). Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de la mutación de los motivos RFxV sobre la capacidad de WNK4-L322F para activar a SPAK. Se generaron la mutante catalíticamente inactiva (D321A) y las diferentes combinaciones de WNK4-L322F con los motivos RFxV/I mutados. La Figura III.6 B muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes. Se puede observar que, la activación de SPAK por WNK4 se pierde en presencia de la mutación que hace a la cinasa catalíticamente inactiva (D321A). Con la mutante constitutivamente activa se observa un nivel de fosforilación de SPAK 1.5 veces mayor al observado con la WNK4 silvestre. La mutación de los motivos RFxV/I, de manera individual o simultánea, en el contexto de la mutante L322F, reduce los niveles de fosforilación de SPAK al mismo nivel observado con la cinasa catalíticamente inactiva (Figura III.6 B y C).

La falta de activación en la mutante del “motivo 2” y la doble mutante se explica con los resultados anteriores, en los que se identificó al “motivo 2 RFXV/I” como mediador de una interacción fuerte entre ambas cinasas. Mientras que, la ausencia del “motivo 1” conduce también a una inactivación similar a la de una cinasa catalíticamente inactiva. Una posible explicación para esta observación es que el “motivo 1 RFXV/I” sea importante para posicionar a SPAK en el dominio cinasa de WNK4 y esta última pueda realizar la fosforilación de SPAK. Otra posibilidad es que la mutación del “motivo 1” altere la estructura del dominio cinasa provocando una conformación catalíticamente inactiva.

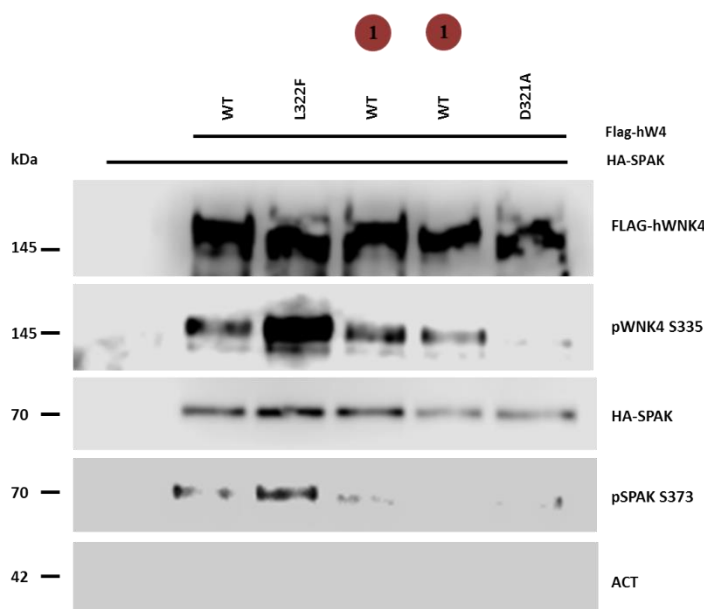


**Figura III.6:** WNK4 constitutivamente activa es afectada por la ausencia de motivos RFXV/I. (A) Esquema de los residuos catalíticos mutados y los motivos RFXV/I en WNK4. (B) Western Blot representativo de las diferentes mutantes WNK4 y su efecto sobre la activación de SPAK. (C) Análisis densitométrico de tres experimentos independientes, unidades normalizadas de pSPAK S373 n=3 \*  $p < 0.05$ .

### III.7 La autofosforilación de WNK4 no se afecta en la ausencia del motivo 1 RF<sub>x</sub>V/I

Como se mencionó en la sección I.1.1, un requerimiento para la actividad catalítica conservado en la cinasas de proteínas es la fosforilación de un residuo en el asa de activación localizada dentro del dominio cinasa. El grupo negativo del fosfato forma un puente salino con la arginina localizada en el asa catalítica. Esta interacción permite darle estabilidad al dominio cinasa y subsecuentemente estabilizar el asa de activación para permitir el reconocimiento del sustrato. En el caso de las WNKs, dicha modificación es lograda mediante trans-autofosforilación. Es decir, las cinasas WNK tienen la capacidad de formar homodímeros o heterodímeros en los que cada uno de los monómeros puede fosforilar a su contraparte. En la cinasa WNK4 el residuo S335 es el blanco de la trans-autofosforilación.

Con el objetivo de determinar si la mutante del “motivo 1” de WNK4 pierde la actividad catalítica se diseñó el siguiente experimento. Se inmunoprecipitó a las diferentes mutantes de los motivos RF<sub>x</sub>V/I de WNK4, con el objetivo de enriquecer a la cinasa y poder obtener un mejor resultado al medir la fosforilación de el asa de activación. El nivel de fosforilación en el residuo S335 se determinó mediante Western Blot.



**Figura III.7:** La autofosforilación de WNK4 no es afectada por la ausencia del motivo RF<sub>x</sub>V/I 1. Inmunoprecipitación de las diferentes mutantes de WNK4. La autofosforilación se evaluó al usar el fosfo-anticuerpo contra la S335.

En el experimento se observa que el nivel de fosforilación en la S335 de la mutante constitutivamente activa, WNK4-L322F, es considerablemente mayor que en la cinasa silvestre. Las mutantes con el “motivo 1” mutado presentaron un nivel de fosforilación similar al de la cinasa silvestre. Un dato a favor de que la ausencia del “motivo 1” no causa una cinasa catalíticamente inactiva es el hecho de que las mutantes del “motivo 1” presentaron un nivel de fosforilación mayor al de la mutante catalíticamente inactiva (D321A) (Figura III.7). Los datos de interacción con SPAK confirman lo anteriormente demostrado.

### **III.8 La localización celular de WNK4 no se afecta al perder la interacción con SPAK**

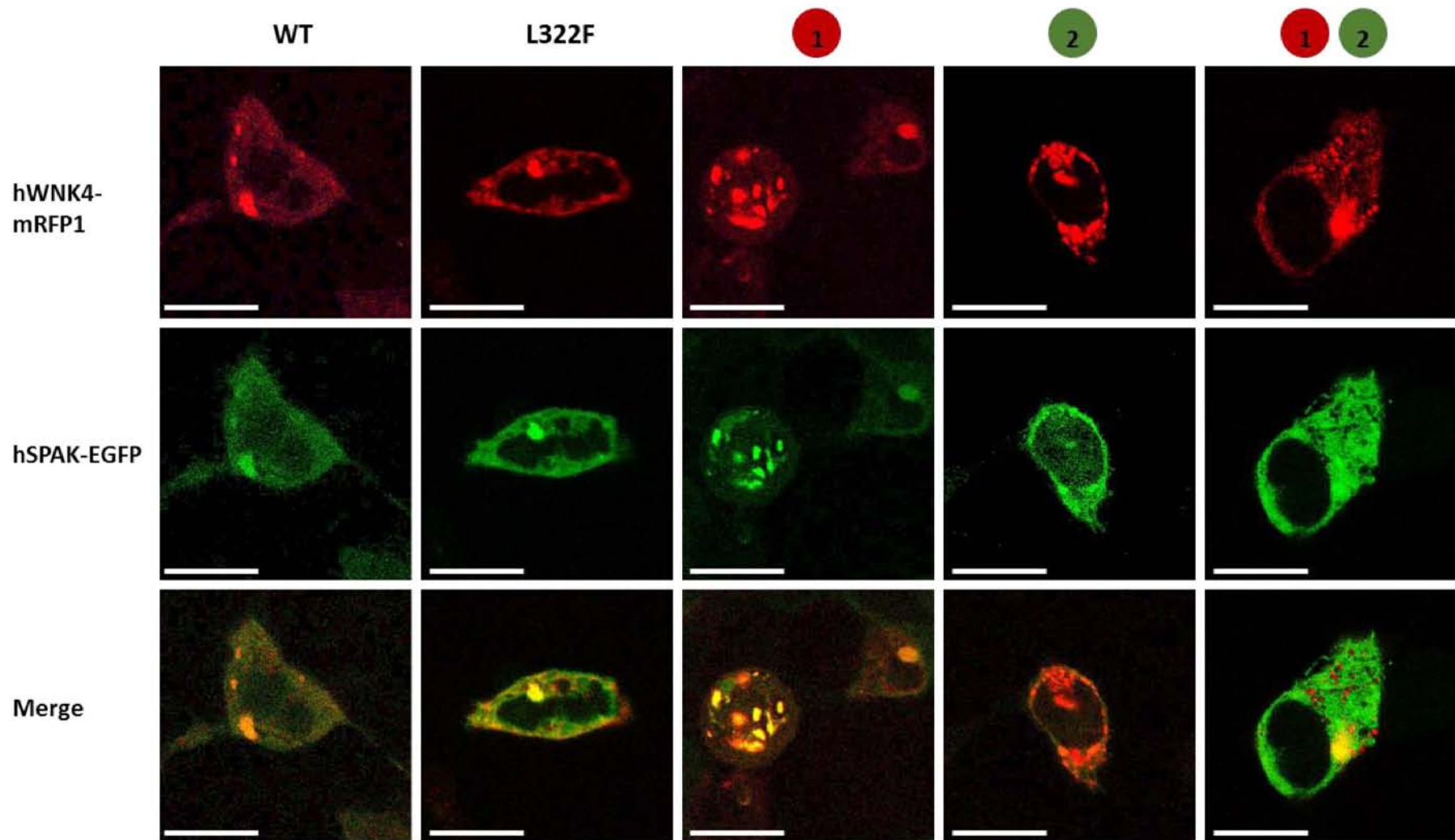
Existen varios reportes en los que se ha analizado la localización subcelular de WNK4. En el primer reporte, Wilson y colaboradores describieron que WNK1 y WNK4 se localizan en uniones estrechas de células epiteliales de segmentos específicos de la nefrona (Wilson et al. 2001). Sin embargo, más recientemente, Terker y colaboradores mostraron que en condiciones en que se estimula la actividad de WNK4, ésta se observa en estructuras que parecen ser vesículas citoplasmáticas del túbulo contorneado distal (Terker et al. 2015). Además, trabajos bioquímicos han mostrado la existencia de interacciones entre WNK4 y moléculas asociadas a vesículas y lisosomas (Subramanya et al. 2009). En este último trabajo se propuso que WNK4 hace una interacción con AP3, molécula asociada a lisosomas, y que esta interacción tiene una repercusión funcional, ya que promueve la degradación del cotransportador NCC al dirigirlo hacia endolisosomas. Por otro lado, en el 2008, en un trabajo de Shaharabany y colaboradores, se estudió la velocidad de difusión de WNK4 mediante análisis de FRAP (Recuperación de Fluorescencia Posterior al Foto-blanqueamiento). Estos autores observaron que, en células HEK293 en cultivo transfectadas con WNK4, la velocidad de difusión de WNK4 es muy baja, por lo que propusieron que WNK4 debe de estar anclada a algún tipo de organelo o estructura compleja (Shaharabany et al. 2008; Mendes et al. 2011).

Con estos antecedentes en mente, decidimos generar una fusión de WNK4 con mRFP1 (del inglés monomeric Red Fluorescent Protein-1) en su C-terminal, para poder localizar a WNK4 en las células HEK293. Después de la transfección de SPAK-GFP y WNK4-mRFP1 se visualizaron las células en el microscopio confocal. Las imágenes indican que SPAK presenta un patrón de localización similar al de WNK4 silvestre, WNK4-L322F y a la mutante del “motivo 1 RFXV/I”. En contraste, la mutante del “motivo 2 RFXV/I” y la doble mutante presentaron un patrón “punteado” diferente al observado

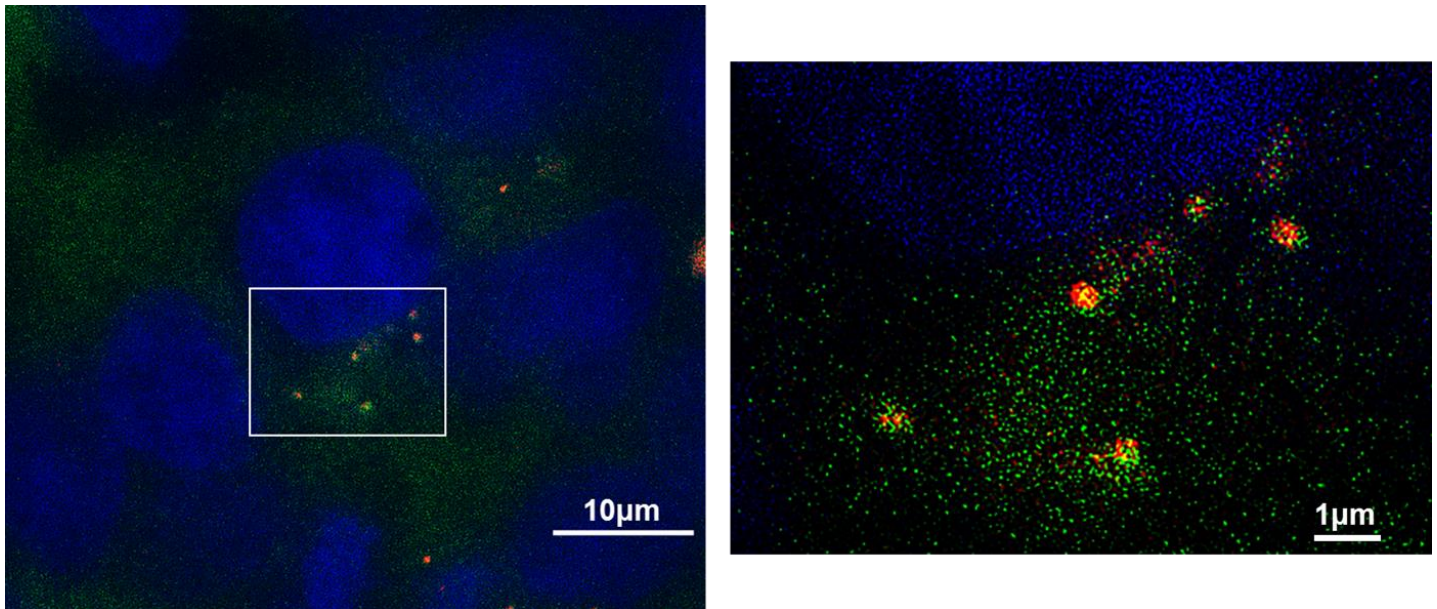
con SPAK en la misma célula. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos en las co-inmunoprecipitaciones de WNK4-SPAK. Además, nos indican que la interacción entre WNK4 y SPAK está muy probablemente ocurriendo en vesículas y no directamente en la membrana plasmática. Tomando en cuenta que en la Figura III.3 se muestra que existe una interacción entre WNK4 y NKCC1 que es independiente de SPAK, este resultado podría indicar que las vesículas en las cuales se localiza WNK4 contienen al cotransportador. Aunque se necesitan otro tipo de experimentos para corroborar la hipótesis de que la fosforilación y regulación de los cotransportadores ocurre en las vesículas y no en la membrana plasmática, este resultado apunta a un mecanismo de regulación con un enfoque dinámico en términos de la participación de las WNKs en el tráfico vesicular de los cotransportadores.

En la Figura III.9, se muestra imágenes de las estructuras formadas por WNK4 y SPAK tomadas con microscopia de iluminación estructurada. La resolución que puede proporcionar esta técnica de microscopia permite observar estructuras con hasta 100 nm de resolución. WNK4 forma complejos con SPAK con un tamaño promedio de diámetro de ~500nm. Este tamaño correspondería a vesículas implicadas en el tráfico vesicular, lo que reafirma de manera visual lo anteriormente mostrado por Subramanya et al y Shaharabany et al.





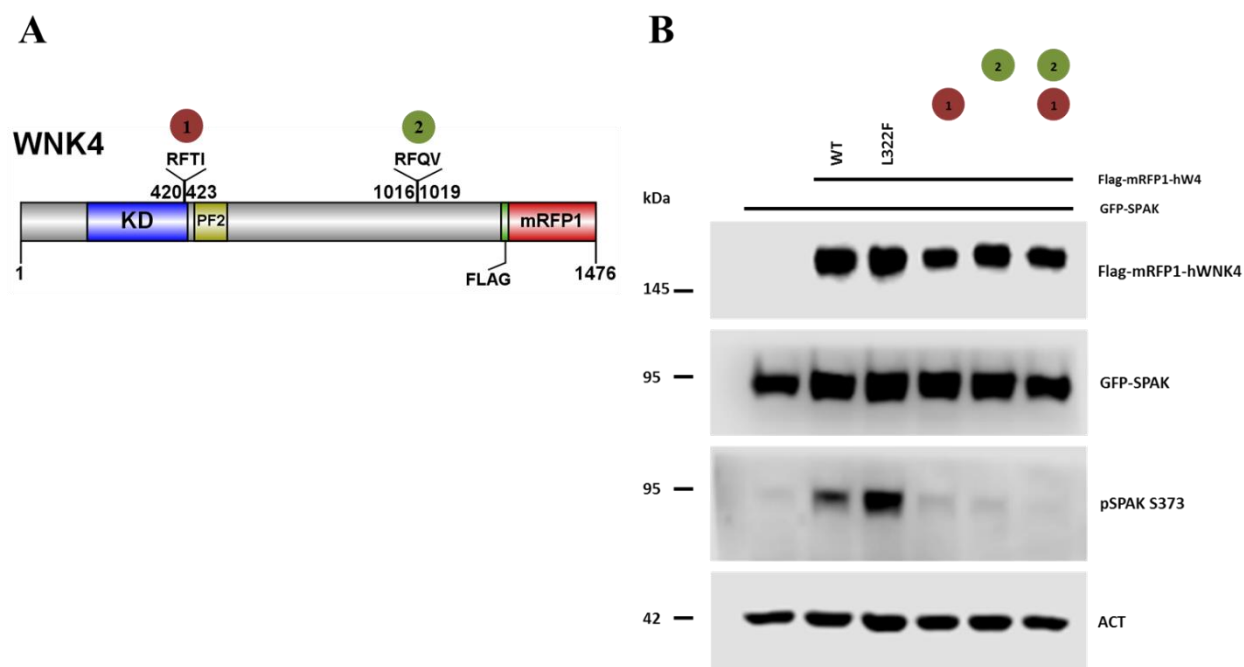
**Figura III.8:** Localización celular de WNK4 y SPAK. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células HEK293 transfectadas con las diferentes mutantes de WNK4-mRFP1 y SPAK-GFP. Línea 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura III.9:** WNK4 y SPAK co-localizan en estructuras de ~500nm. Imágenes de microscopía de iluminación estructurada (SIM). Se muestran las estructuras formadas por WNK4-mRFP1 silvestre y SPAK-GFP.

### III.9 La cinasa WNK4 fusionada a mRFP1 es funcionalmente activa

Al diseñar la proteína fusionada WNK4-mRFP1 decidimos colocar a mRFP1 en el C-terminal de WNK4. Esto debido a que en la descripción inicial de mRFP1 se encontró que la estabilidad de la proteína de fusión es mayor cuando mRFP1 se coloca en el extremo C-terminal (Campbell et al. 2002). Sin embargo, en las cinasas WNK existen varias regiones importantes en su C-terminal, una de ellas es una región hélice helicoidal crucial para la hetero-, homo-dimerización. Lo anterior generó una preocupación sobre si la adición de mRFP1 en el C-terminal de WNK4 pudiera afectar la actividad de la cinasa. En la Figura III.10 se muestra un Western Blot representativo en el que se demuestra que la adición de mRFP1 a WNK4 no afectó su capacidad de fosforilar a SPAK en la S373. Además, se observa un mayor nivel de fosforilación de SPAK en presencia de la mutante L322F que en presencia de la cinasa silvestre. El fenotipo de la ausencia de motivos RFXV/I no fue alterado como se puede apreciar en los carriles 4-6. Este resultado indica que la cinasa WNK4 fusionada a mRFP1 conserva su capacidad catalítica sobre SPAK.



**Figura III.10:** WNK4-mRFP1 mantiene su capacidad catalítica sobre SPAK. (A) Esquema ilustrativo de la construcción de WNK4 fusionada a mRFP1. (B) Western Blot representativo que demuestra el efecto de WNK4-mRFP1 sobre la activación de SPAK-GFP.

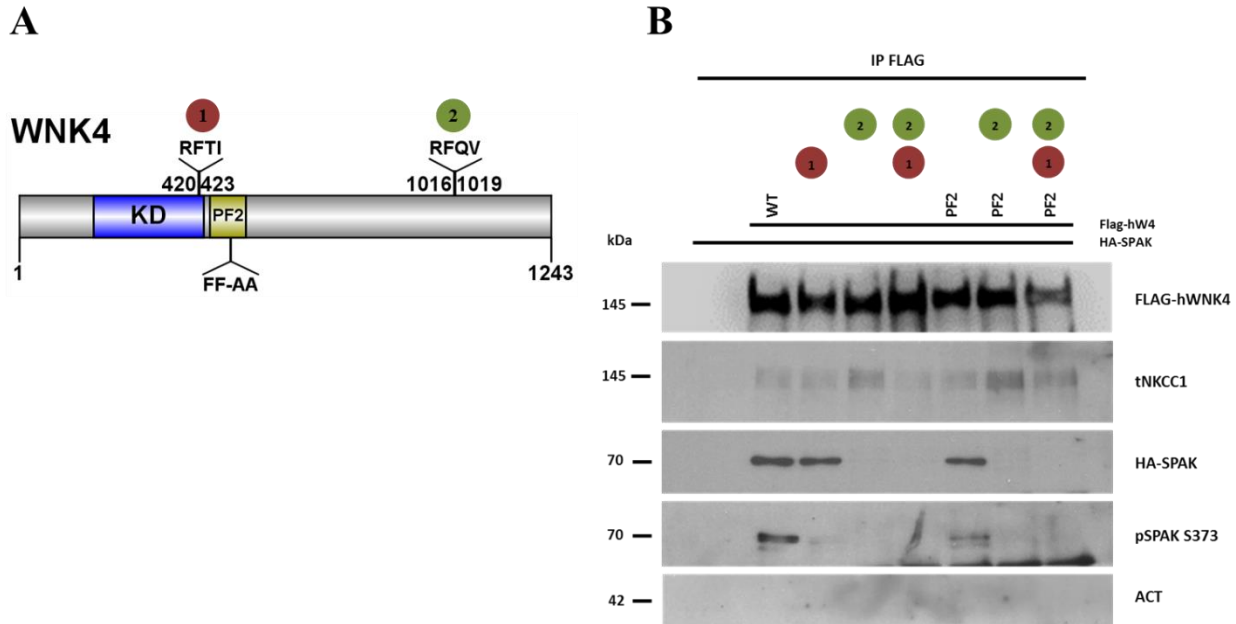
### III.10 La interacción WNK4-NKCC1 no es mediada por el dominio PF2 en WNK4

Uno de los resultados poco esperados en los experimentos anteriormente presentados es la interacción observada entre WNK4 y NKCC1 independiente de SPAK, apoyada por los ensayos de co-inmunoprecipitación (Figura III.3) y por los resultados de microscopia confocal (Figura III.8). Una incógnita entonces, es cuál es el dominio en la cinasa WNK4 que permite la interacción con el cotransportador NKCC1. Es importante señalar que, en el trabajo realizado por Pacheco et al, muestran una interacción entre la cinasa WNK3 y el cotransportador NCC que es independiente de SPAK. Ponce-Coria et al también observaron interacción independiente de SPAK entre WNK4 y NKCC1, mediante ensayos de doble híbrido. Estos resultados sugieren que se trata de un mecanismo conservado en las WNKs que permite su anclaje a los cotransportadores. En la sección I.2.1 de la introducción se muestra un análisis de la predicción de dominios globulares en las cinasas WNK, así como las regiones desordenadas presentes en la secuencia de las cinasas. Un dato relevante es la

presencia de un gran porcentaje de regiones desordenadas que se mantiene en todos los miembros de la familia. Existen dos dominios globulares predichos en WNK4 adicionales al dominio cinasa; el dominio PF2 (que también ha sido denominado autoinhibitorio, aunque su actividad autoinhibitoria ha sido recientemente cuestionada) (Xu et al. 2002; Lenertz et al. 2005) y el dominio PF2'. Ambos han sido así llamados por alto grado de conservación en secuencia y potencial estructura secundaria con el dominio PF2 de OSR1 (Gagnon and Delpire 2012; Ponce-Coria et al. 2014). La alta similitud estructural de los dominios PF2 y PF2' de WNK4 con el dominio PF2 de OSR1/SPAK, abre la posibilidad de que estos tengan un papel en la interacción con otras moléculas que contengan motivos RFXV/I.

Con el objetivo de determinar cuál es la contribución del dominio PF2 en las interacciones se generaron las mutantes presentadas en la Figura III.11, en donde se muestra una inmunoprecipitación de las diferentes mutantes. Los primeros cinco carriles muestran un resultado similar al observado en la Figura III.3, donde el segundo motivo RFXV/I media una interacción fuerte entre SPAK y WNK4, mientras que el primer motivo es necesario para la activación. Al mutar dos Fenilalaninas (F454 y F456) localizadas en el dominio PF2, se observa que las interacciones del complejo no son afectadas. Sin embargo, la cinasa SPAK presenta una menor fosforilación. Esto apoya la idea del que el dominio PF2 de WNK4 no ejerce un papel autoinhibitorio. Apoyando esta observación, en el reporte de Ponce-Coria et al observó que una mutante del dominio PF2 de WNK4 (WNK4-F473A) no es capaz de activar al cotransportador NKCC1.

Ponce Coria et al. también realizaron ensayos de doble híbrido en los que observaron interacción entre WNK4 y NKCC1 y además observaron que la interacción se pierde al mutar la F437 de WNK4. En contraste con esto, nosotros observamos que en presencia de las mutaciones "PF2 + RFXV/I motivo 1" y "PF2 + RFXV/I motivos 1 y 2", WNK4 retuvo la capacidad de interactuar con NKCC (Figura III.11 B, carriles 7 y 8). Es decir, de acuerdo a los datos mostrados en este trabajo, el dominio PF2 de WNK4 parece no ser el único dominio responsable de la interacción con WNK4-NKCC1 independiente de SPAK. Sin embargo, existe la posibilidad de que la hetero-dimerización de WNK4 con alguna WNK expresada de manera endógena en las células HEK293 sea responsable de la interacción con el cotransportador. Otra posibilidad implica la existencia de otro dominio en WNK4 que realice la interacción. En 2005 el grupo de David Ellison demostró la existencia de una interacción entre la región C-terminal de WNK4 y la cola C-terminal de cotransportador NCC (Yang et al. 2005). Por lo tanto, decidimos evaluar si esta interacción está ocurriendo entre WNK4 y NKCC1 y los resultados se presentan en la siguiente sección.

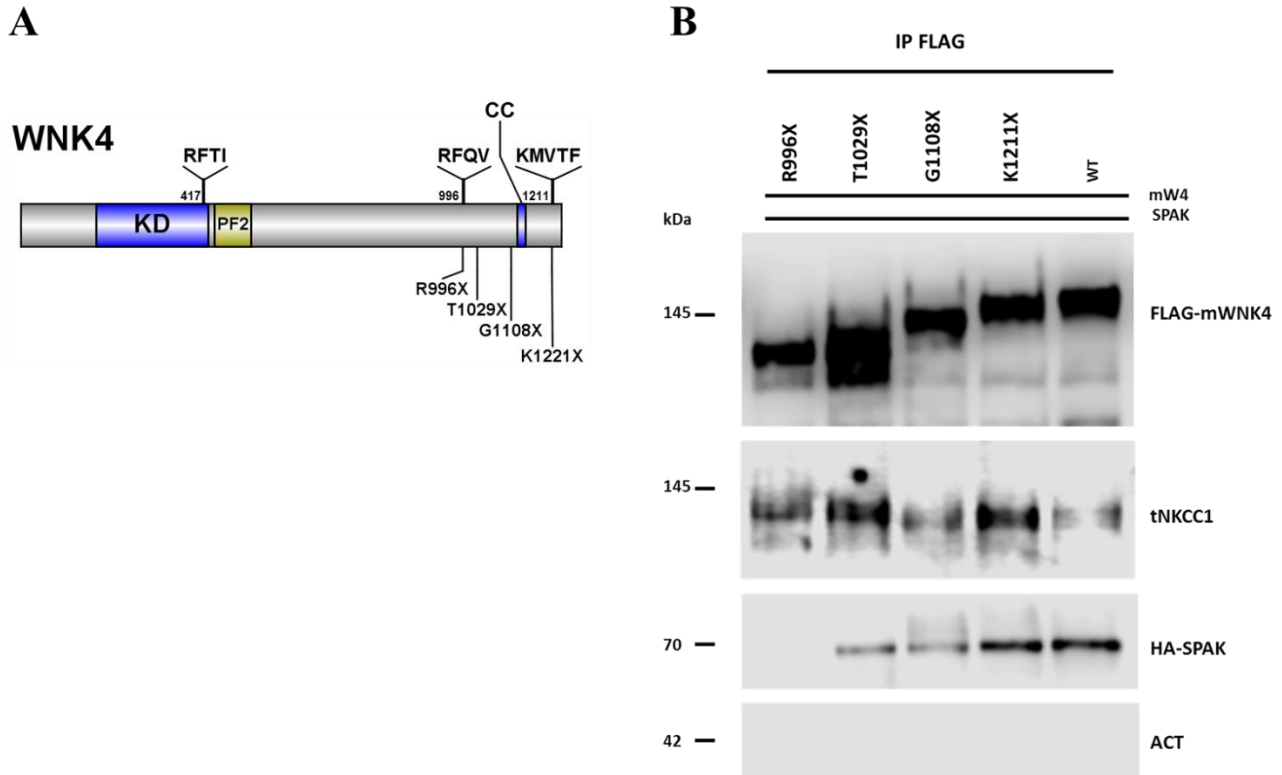


**Figura III.11:** Dominio PF2 en WNK4 no media interacción con NKCC1. (A) Esquema donde se ilustran las regiones mutadas en WNK4. (B) Western Blot representativo de la inmunoprecipitación de las diferentes mutantes de WNK4, se analiza la contribución del dominio PF2 en la interacción entre WNK4-NKCC1.

### III.11 La región C-terminal en WNK4 no es requerida para la interacción con NKCC1

Se diseñaron y construyeron una serie de mutantes en WNK4 que carecen de regiones C-terminales de forma progresiva (Figura III.12 A) y se estudió la formación de complejos entre WNK4, NKCC1 y SPAK mediante co-inmunoprecipitación. Los resultados muestran que a pesar de eliminar el C-terminal de WNK4 en diferentes puntos específicos, la interacción de WNK4 con NKCC1 se mantiene. Una mutante que arroja algo interesante es la más pequeña R996X, la cual pierde la interacción con SPAK, pero mantiene la interacción con NKCC1. Estos resultados indican el dominio C-terminal de las WNKs no es indispensable para mediar la interacción con NKCC1. Existe la posibilidad de que si participe en establecer en la interacción pero que otros dominios de interacción sean responsables de que en ausencia del C-terminal la interacción se siga observando, por ejemplo, el dominio PF2. Para evaluar esta posibilidad será necesario mutar el PF2 en las mutantes cortas. Esto descartará o confirmará que la mutante PF2 puede interactuar con NKCC1 (en ausencia de unión a SPAK) debido a una interacción mediada por el C-terminal, ya sea directamente con el

cotransportador o a través de la hetero-dimerización con una WNK endógena. Sabemos que en el C-terminal de las WNKs se localiza un motivo de hélice helicoidal implicado en la dimerización (Thastrup et al. 2012).



**Figura III.12:** Dominio C-terminal en WNK4 no media una interacción con NKCC1. (A) Esquema donde se ilustran las diferentes clonas de WNK4 truncadas en el C-terminal. (B) Western Blot representativo de la inmunoprecipitación de las diferentes mutantes de WNK4. Se puede observar la presencia de la interacción en las diferentes mutantes, incluso en la más pequeña R996X, donde no hay interacción con SPAK y carece de una región importante en el C-terminal.

## **IV Discusión**

### **IV.1 Los motivos RFXV/I en WNK4 sobre la interacción y activación de la cinasa SPAK**

Los cotransportadores de la familia SLC12A participan en procesos biológicos muy diversos y la regulación fina de su actividad es esencial para el adecuado funcionamiento del organismo. Un ejemplo de uno de estos procesos biológicos es la reabsorción renal de sal, en la que participan NCC y NKCC2. Alteraciones en la regulación de estos cotransportadores conducen alteraciones en la presión arterial y en la homeostasis electrolítica. La participación del NCC y NKCC2 en la regulación de la presión arterial y el conocimiento de la importancia que tiene la vía WNK-SPAK/OSR1 en la regulación de estos cotransportadores ha llevado a algunos grupos a proponer que fármacos dirigidos a inhibir dicha vía podrían funcionar como tratamiento para el manejo de la hipertensión. Uno de los fármacos que se ha desarrollado es la molécula STOCK1S-506099 (Mori et al. 2013). De manera interesante, esta molécula se encontró a partir de un tamizaje realizado para identificar moléculas capaces de inhibir la interacción entre péptidos RFXV/I y el dominio C-terminal de OSR1. Se demostró después que esta molécula tiene la capacidad de inhibir la activación de NCC dependiente de cinasas WNK. Al estar los motivos RFXV/I presentes tanto en los sustratos, como en los reguladores de SPAK/OSR1, se espera un efecto inhibitorio considerable.

Dado que las WNKs presentan al menos dos motivos RFXV/I en su secuencia, existe la posibilidad de que más de un motivo RFXV/I esté implicado en la interacción con SPAK. El papel que juegan los motivos RFXV/I presentes en WNK4 se describe por primera vez en esta tesis. WNK4 posee 2 motivos RFXV/I en su secuencia. Los datos obtenidos a través de las mutantes que carecen de estos motivos sugieren que la interacción entre WNK4 y SPAK es mediada por el motivo RFXV/I localizado en la región C-terminal de WNK4. Por otro lado, la ausencia del primer motivo RFXV/I en WNK4 que se localiza justo al término del dominio cinasa impide la activación de SPAK. Es posible que este motivo esté mediando una interacción más débil y transitoria entre SPAK y WNK4. Las propiedades fisicoquímicas de esta interacción no son claras, pero mediante los análisis de

predicción de estructura se observa que el “motivo 1”, se encuentra en una zona accesible. La hipótesis anterior toma relevancia cuando se demuestra que la ausencia del primer motivo no causa una pérdida de la actividad catalítica en WNK4. Con esa observación, un mecanismo propuesto es que el “motivo RFXV/I 1” podría estar involucrado en posicionar a SPAK cerca del dominio cinasa para su subsecuente activación. Sin embargo, la demostración de la interacción débil requiere de otro tipo de experimentos.

Dentro de los demás estudios que se han hecho para entender la relevancia de los motivos RFXV/I de las cinasas WNK en la interacción y activación de SPAK/OSR1, destacan dos. Un trabajo realizado por el laboratorio de la Dra. Melanie Cobb y otro realizado en el laboratorio del Dr. Gerardo Gamba. En el primer trabajo se estudian únicamente los motivos RFXV/I localizados en el C-terminal de WNK1 (Sengupta et al. 2012). Se observa que fragmentos C-terminales de WNK1, que contienen a los tres motivos RFXV del dominio C-terminal, co-inmunoprecipitan con OSR1. Sin embargo, no se analizó el impacto de dichos motivos sobre la función de la cinasa completa. En el segundo trabajo, se analizó el papel de los motivos RFXV/I de WNK3. Se describió que el motivo RFXV/I localizado en el dominio cinasa es importante para que la cinasa WNK3 regule a los CCCs (Pacheco-Alvarez et al. 2012). Esto a pesar de que se observó que al mutar dicho motivo la interacción con SPAK seguía ocurriendo. Recientemente, en un trabajo publicado por nuestro laboratorio se encontró que el motivo RFXV/I localizado en el dominio cinasa de WNK1 es crucial para que esta pueda mediar la activación del NCC (Chávez-Canales et al. 2014). En este caso no se estudió el estado de la interacción con SPAK.

Como se dijo en la introducción, uno de estos motivos C-terminales está conservado en las cuatro WNKs. Por otro lado, todas excepto WNK4 poseen un motivo conservado en el dominio cinasa. Dado que el motivo RFXV/I localizado en el dominio cinasa de WNK3 y WNK1 parece ser esencial para la activación de SPAK, la ausencia de dicho motivo en WNK4 resulta interesante. Una interrogante que se planteó en este estudio fue si al modificar los motivos RFXV/I dentro del dominio cinasa de WNK4 para que tuvieran un arreglo similar al observado en otras WNKs se afectaría la función de la cinasa. Se observó que la adición del motivo conservado en las otras cinasas no rescata la pérdida de función ante la ausencia del primer motivo RFXV/I. Adicionalmente, se demostró que este nuevo motivo no media ninguna interacción entre WNK4 y SPAK. Este resultado sugiere que la cinasa WNK4 divergió en términos de su arreglo de motivos y que ésta no puede funcionar si presenta un arreglo similar a los otros miembros de la familia.



## IV.2 Localización celular del complejo WNK4-SPAK

Los cotransportadores de la familia SLC12A se regulan por fosforilación de residuos específicos de Serina/Treonina en sus colas citoplasmáticas. En los diversos trabajos que se han realizado sobre la regulación de la función de estos cotransportadores se ha encontrado una correlación entre la fosforilación y la activación de NCC, NKCC1 y NKCC2 (Moriguchi et al. 2005; Anselmo et al. 2006; Pacheco-Alvarez et al. 2006; Vitari et al. 2006; Richardson et al. 2008, 2011). Una de las interrogantes que no se ha resuelto hasta el momento con relación a esto es la pregunta sobre cuál es la localización de las cinasas WNK y donde ocurre la regulación de los cotransportadores. Existen un par de trabajos donde se muestra que la cinasa WNK4 posee una constante de difusión menor a la de una proteína citosólica (Shaharabany et al. 2008; Mendes et al. 2011). Además, al hacer uso de FRAP se encuentra que, en condiciones hipertónicas, la movilidad de WNK4 se reduce considerablemente.

Dentro de los experimentos realizados como parte de esta tesis, se llevó a cabo la construcción de la cinasa WNK4 fusionada a la proteína roja fluorescente, mRFP1. Con la obtención de imágenes de microscopia confocal se pudo determinar la localización subcelular de WNK4 en células HEK293. En las imágenes se muestra a la cinasa con una localización citoplasmática. Además, se observa un patrón punteado en la periferia de la célula. Sin embargo, no hay un patrón propiamente de membrana plasmática. En el caso de la cinasa SPAK la localización es aún más difusa en el citoplasma. Se ha reportado que, en condiciones hipertónicas SPAK puede migrar al núcleo gracias a una secuencia de localización nuclear dentro de su secuencia de aminoácidos (Gagnon and Delpire 2012). La relevancia de esta translocación no ha sido del todo atendida, aunque podría implicar una regulación transcripcional *in cis*.

Tanto la cinasa WNK4 silvestre, como las diferentes mutantes (L322F, 1 RFXV/I, 2 RFXV/I y doble mutante RFXV/I), mostraron un patrón de localización similar. Los resultados de microscopia confocal reafirmaron lo demostrado por los ensayos de inmunoprecipitación. En este sentido, SPAK pierde la co-localización con WNK4 en la ausencia del segundo motivo RFXV/I. Sin embargo, un dato interesante es el hecho de que la cinasa WNK4 no pierde su patrón de localización en la ausencia de la interacción con SPAK. Una explicación a este fenómeno podría deberse a la interacción con el cotransportador NKCC1 que es independiente de la interacción con SPAK. NKCC1 al ser una proteína transmembrana está sujeta al tráfico vesicular para llegar a su destino funcional, la membrana plasmática. El uso de SIM (Microscopía de Iluminación Estructurada) permitió hacer una estimación

del tamaño de las estructuras punteadas en las que se observa WNK4 y que es de ~500 nm. Este tamaño correspondería a vesículas en donde la proteína cargo sería NKCC1 mientras que WNK4 estaría realizando una interacción con el cotransportador alrededor de la vesícula. Este resultado sugiere que la cinasa WNK4 podría tener un papel en la regulación del tráfico vesicular del cotransportador NKCC1. Para ahondar más en esto será necesario determinar el tipo de vesículas a las cuales WNK4 está siendo reclutada.

### **IV.3 Interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK**

Un resultado interesante fue la interacción observada entre la cinasa WNK4 y el cotransportador NKCC1 en una manera independiente de SPAK. Desde los primeros estudios de la vía WNK-SPAK-CCC se ha postulado que SPAK/OSR1 son las cinasas que realizan la interacción tanto con los cotransportadores, como con las cinasas WNK. Los resultados presentados en este trabajo plantean una modificación en el mecanismo propuesto. La presencia de la interacción WNK4-NKCC1 observada en repetidas ocasiones, sugiere que la cinasa WNK4 puede realizar una función de andamiaje para que la cinasa SPAK pueda ejercer la fosforilación del cotransportador. Esta idea adquiere confiabilidad cuando se analiza el patrón de localización de SPAK en donde se puede observar que es más “difuso”.

Las aproximaciones tomadas en este trabajo para identificar al dominio en WNK4 que realiza la interacción con NKCC1 surgen del siguiente razonamiento. Mediante análisis de predicción de dominios globulares se determinó que WNK4 posee dos dominios globulares adicionales al dominio cinasa. Estos dos potenciales dominios globulares no han sido estudiados extensivamente. Estas dos regiones globulares poseen un alto grado de conservación en secuencia entre los miembros de la familia de las WNKs, lo que sugiere que su función debe de estar conservada de igual manera. La primera región con potencial globular se ha estudiado con anterioridad y se le denominó “dominio autoinhibitorio”, debido a que se observó que tenía la capacidad de ejercer un efecto negativo sobre la actividad de WNK1 (Xu et al. 2002). El “dominio autoinhibitorio” posee una estructura similar a la del dominio PF2 de SPAK (Moon et al. 2013). Además, en el mismo trabajo se muestra que este dominio posee la capacidad de unir motivos RFXV/I, por lo que, se propuso que en condiciones fisiológicas podría mediar interacciones con motivos RFXV/I presentes en otras moléculas. Dado que en los experimentos se observa una interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK, pensamos en la posibilidad de que el dominio PF2 de WNK4 pudiera estar mediando la interacción. El

cotransportador contiene dos motivos RFXV/I en su región N-terminal. Para evaluar esta posibilidad, se eliminó la propiedad hidrofóbica del dominio PF2 en WNK4, al mutar dos residuos de Fenilalanina conservados universalmente en los dominios PF2. Un resultado interesante es que al mutar el dominio PF2 en WNK4 se disminuyó la fosforilación de SPAK en la S373. Este resultado va en contra de la función autoinhibitoria propuesta para este dominio. Apoyando nuestro resultado, en un trabajo reciente de Ponce-Coria et al, se demostró que el dominio PF2 en WNK4 es necesario para activar al cotransportador NKCC1 (Ponce-Coria et al. 2014). En cuanto a la interacción WNK4-NKCC1, las mutaciones introducidas en el motivo PF2 de WNK4 no afectaron la interacción, como se muestra en la Figura III.11. Esta observación no necesariamente indica que el dominio PF2 no está implicado en la interacción, ya que, el que la interacción se conserve podría explicarse de dos maneras; 1) Que ocurra una interacción indirecta, sabemos, por ejemplo, que las cinasas WNK pueden heterodimerizar lo cual permite a WNK4 formar dímeros con WNKs expresadas de manera endógena en las células HEK293. Por lo tanto, la interacción de la mutante de WNK4 con una WNK endógena, podría mediar la interacción indirecta con NKCC1; 2) Que exista otro dominio dentro de WNK4 que también participe en la interacción con NKCC1 y que sea necesario afectar a ambos para que se pierda la interacción. En este sentido, el grupo del Dr. Ellison mostró que la región C-terminal de WNK4 tiene la capacidad de interactuar con NCC (Yang et al. 2005).

Para abordar las dos posibilidades anteriores se diseñaron una serie de mutantes en WNK4 que carecen de regiones en el C-terminal. Los datos sugieren que la región C-terminal también está implicada en la dimerización de las cinasas WNK. En este segmento, existe un dominio hélice helicoidal que está conservado en todas las WNKs y que participa en la homo- y hetero-dimerización (Thastrup et al. 2012). Esta región está ausente en la mutante WNK4 más pequeña R996X. Además, en esta mutante, no existe “motivo 2 RFXV/I”, por lo que, tampoco puede unir a SPAK. Sin embargo, a pesar de carecer de estas dos propiedades, la mutante WNK4-R996X sigue haciendo interacción con NKCC1. Algo que queda pendiente por evaluar es que en esta mutante el dominio PF2 sea quien esté mediando la interacción. Además del dominio PF2, el segundo dominio globular presente en las WNKs presenta una estructura predicha similar a la de un dominio PF2, por lo que ha sido llamado dominio PF2’. Por lo tanto, en un futuro también evaluaremos si este dominio está implicado en interacciones con motivos RFXV/I.

## Conclusiones

- El “motivo RFXV 1” en WNK4 reside en el extremo C-terminal del dominio cinasa y, de acuerdo a la predicción de la estructura tridimensional, este motivo reside en una región desordenada.
- El “motivo 1 RFXV/I” de WNK4 es necesario para activar a la cinasa SPAK, mientras que el “motivo 2 RFXV/I” media una interacción fuerte entre las dos cinasas.
- La adición del motivo RFXV/I conservado en los demás miembros excepto en WNK4 no rescata la activación de SPAK en la ausencia del “motivo1 RFXV/I”. De la misma manera, tampoco rescata la interacción con SPAK que se pierde en ausencia del “motivo 2”.
- El complejo WNK4-SPAK se localiza en vesículas de un tamaño aproximado de 500 nm. WNK4 permanece en las vesículas a pesar de no hacer interacción con SPAK.
- Existe una interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK.
- El dominio PF2 no es indispensable para la interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK.
- El segmento C-terminal de WNK4 que comprende los aminoácidos 996-1211 no es indispensable para la interacción WNK4-NKCC1 independiente de SPAK.

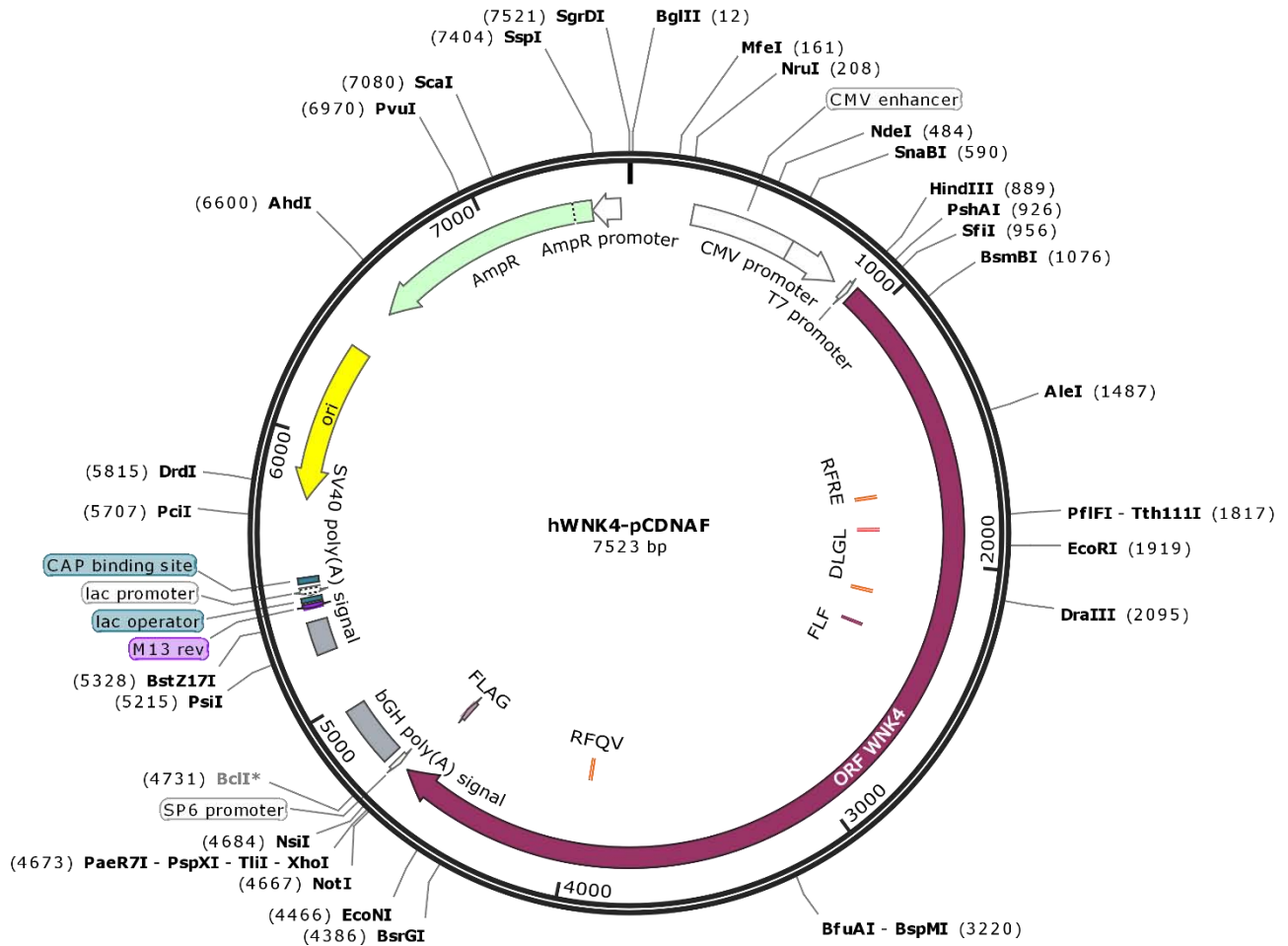
## Anexos

### Anexo I

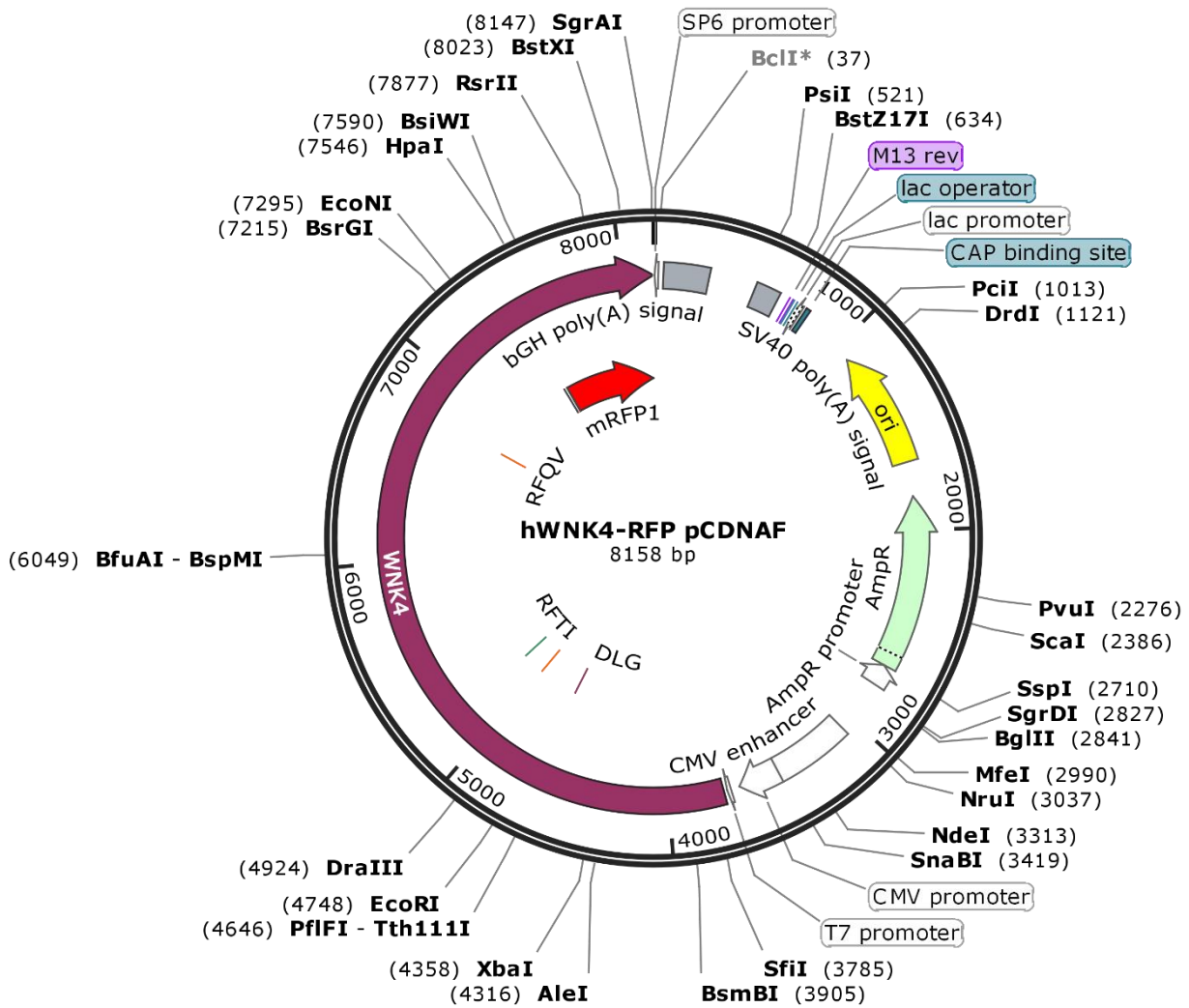
<i>Clona cDNA</i>	<i>Secuencia Oligonucleótido</i>
hWNK4 F421A	5'-CGCACGGATAAGAACGAGAGGGCCACCATCCAGGACCTC-3'
hWNK4 RF1016,1017AA	5'-GGAAAGCCGCAGCTTGTGGGGCTGCCCAAGTGACTTCATCC-3'
hWNK4 E271V	5'-CTGAGGCGGTTCCGGGTGATGAAGCCGCGGGTC-3'
hWNK4 D321A	5'-CAAAATCGGGGCCCTGGGCCTG-3'
hWNK4 FF476,478AA	5'-CAACCAGGCCATCGAGGCCCTGGCCCAGCTGGGCCGGGAC-3'
s hW4 FC RFP	5'-CCTATTCTATAGTGTCACCTAAATGCTAGAGC-3'
as hW4 FC RFP	5'-CTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATCCT-3'
s FC RFP	5'-CAAGGACGACGACGACAAGATGGCTTCCTCCGAAG-3'
as FC RFP	5'-AGGTGACACTATAGAATAGGTTAAGCACCGGTGGAG-3'

**Tabla AI.1:** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR para las mutagénesis dirigidas y construcción de la clona WNK4-mRFP1.

## Anexo II

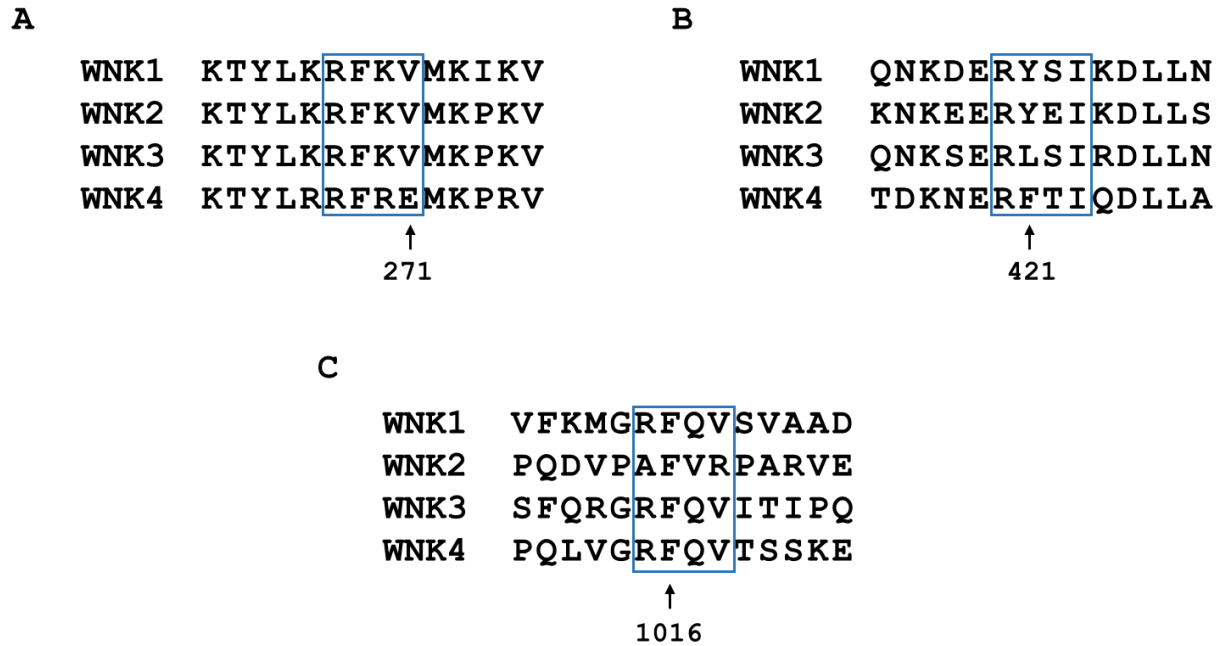


**Figura AII.1:** Esquema del plásmido hWNK4-pCDNAF. Se muestran las mutaciones realizadas en el plásmido, así como las principales características funcionales, sitios de restricción.



**Figura AII.2:** Esquema de la construcción hWNK4-RFP-pCDNAF. La inserción de mRFP1 en el extremo C-terminal se realizó mediante el método de FastCloning (Li et al. 2011). Por medio de un diseño de oligonucleótidos complementarios Tabla AI.1.

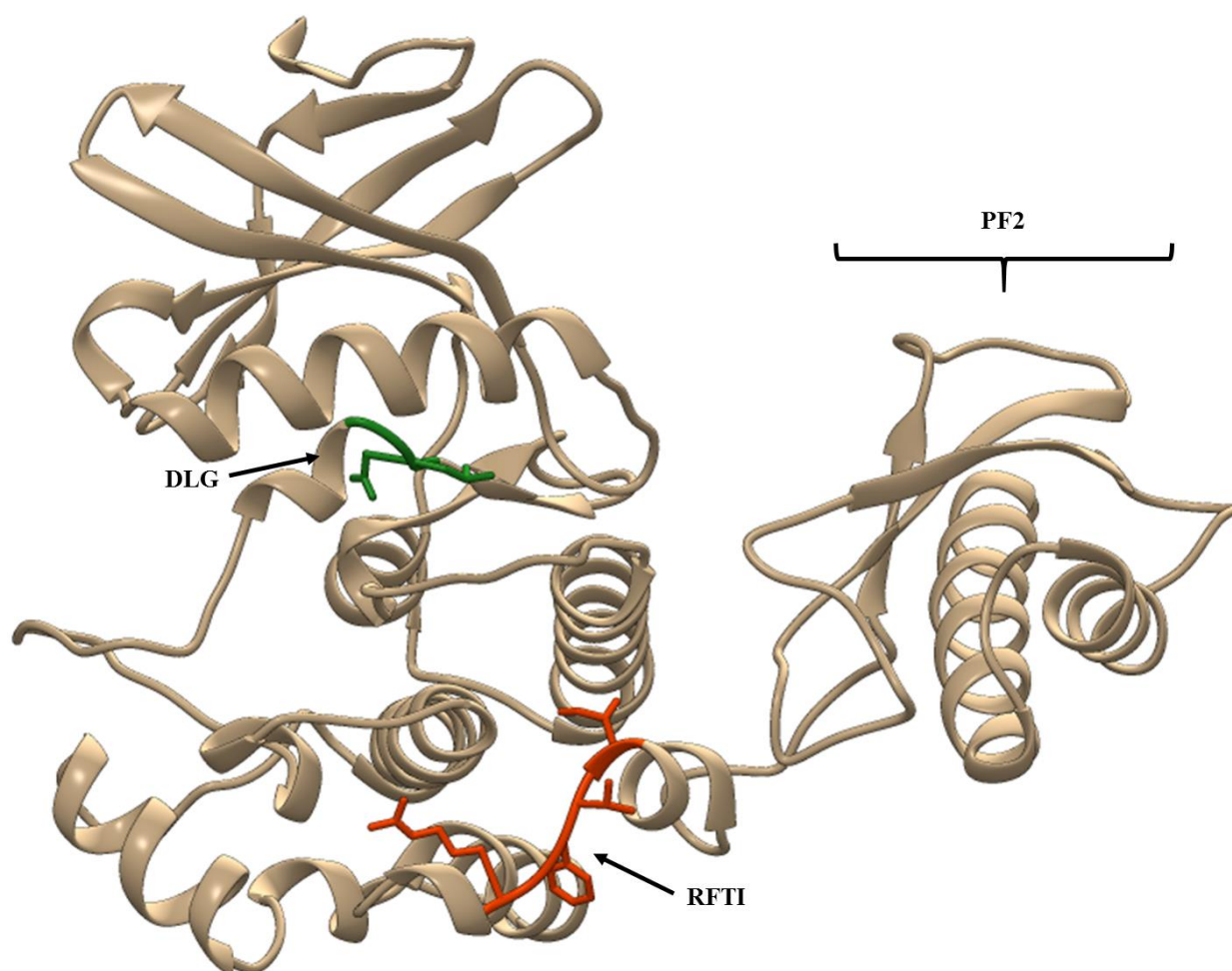
## Anexo III



**Figura AIII.1:** Alineamientos de las diferentes WNKs en las regiones de motivos RFxV/I. A) Se muestra el alineamiento del motivo RFxV/I localizado en el dominio cinasa que se conserva en todas las cinasas WNK excepto en WNK4. B) Alineamiento del motivo RFTI localizado en el dominio cinasa de WNK4, solo se conserva en este miembro. C) Alineamiento del motivo RFxV/I C-terminal de las diferentes WNKs, el motivo RFQV se conserva en los tres miembros a excepción de WNK2 que presenta un motivo RFSV con localización 1784 y 1787. Todas las secuencias utilizadas derivan de *H. sapiens*, el número de aminoácido indicado corresponde a la secuencia de WNK4.



## Anexo IV



**Figura AIV.1:** Modelo tridimensional del dominio cinasa de WNK4, junto con el dominio PF2. Se muestra el motivo DLG, así como el motivo RFTI. La localización del motivo RFTI es restringida al termino del dominio cinasa seguido de una región desestructurada que antecede al dominio PF2. Modelo generado en el servidor I-TASSER a partir de los aminoácidos 163-522 de WNK4 de humano.

## Referencias

- Alessi DR, Zhang J, Khanna A, Hochdorfer T, Shang Y, Kahle KT. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: Master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci Signal*. 2014;7(July):re3–re3.
- Anselmo AN, Earnest S, Chen W, Juang Y-C, Kim SC, Zhao Y, et al. WNK1 and OSR1 regulate the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Jul 18;103(29):10883–8.
- Austin TM, Nannemann DP, Deluca SL, Meiler J, Delpire E. In silico analysis and experimental verification of OSR1 kinase - Peptide interaction. *J Struct Biol*. Elsevier Inc.; 2014;187(1):58–65.
- Bazua-Valenti S, Chavez-Canales M, Rojas-Vega L, Gonzalez-Rodriguez X, Vazquez N, Rodriguez-Gama A, et al. The Effect of WNK4 on the Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Aug 1;26(8):1781–6.
- Brinkworth RI, Breinl RA, Kobe B. Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Jan 7;100(1):74–9.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach P a, Baird GS, Zacharias D a, et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Jun 11;99(12):7877–82.
- Castaneda-Bueno M, Cervantes-Perez LG, Vazquez N, Uribe N, Kantesaria S, Morla L, et al. Activation of the renal Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 May 15;109(20):7929–34.
- Chávez-Canales M, Arroyo JP, Ko B, Vázquez N, Bautista R, Castañeda-Bueno M, et al. Insulin increases the functional activity of the renal NaCl cotransporter. *J Hypertens*. 2013 Feb;31(2):1.
- Chávez-Canales M, Zhang C, Soukaseum C, Moreno E, Pacheco-Alvarez D, Vidal-Petiot E, et al. WNK-SPAK-NCC cascade revisited: WNK1 stimulates the activity of the Na-Cl cotransporter via SPAK, an effect antagonized by WNK4. *Hypertension*. 2014 Nov;64(5):1047–53.
- Chen W, Yazicioglu M, Cobb MH. Characterization of OSR1, a member of the mammalian Ste20p/germinal center kinase subfamily. *J Biol Chem*. 2004 Mar 19;279(12):11129–36.
- DeAizpurua HJ, Cram DS, Naselli G, Devereux L, Dorow DS. Expression of Mixed Lineage

- Kinase-1 in Pancreatic  $\beta$ -Cell Lines at Different Stages of Maturation and during Embryonic Pancreas Development. *J Biol Chem*. 1997 Jun 27;272(26):16364–73.
- Delpire E, Gagnon KBE. SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. *Biochem J*. 2008;409(2):321–31.
- Gagnon KB, Delpire E. Multiple pathways for protein phosphatase 1 (PP1) regulation of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) function: The N-terminal tail of the Na-K-2Cl cotransporter serves as a regulatory scaffold for Ste20-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) and PP1. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14115–21.
- Gagnon KB, Delpire E. Molecular Physiology of SPAK and OSR1: Two Ste20-Related Protein Kinases Regulating Ion Transport. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1577–617.
- Gagnon KBE, England R, Delpire E. A single binding motif is required for SPAK activation of the Na-K-2Cl cotransporter. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):131–42.
- Gamba G. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiol Rev*. 2005 Apr 1;85(2):423–93.
- Hanks S, Quinn A, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* (80- ). 1988 Jul 1;241(4861):42–52.
- Hendrickx A, Beullens M, Ceulemans H, Den Abt T, Van Eynde A, Nicolaescu E, et al. Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1. *Chem Biol*. 2009;16(4):365–71.
- Hunter T. Signaling—2000 and Beyond. *Cell*. 2000 Jan;100(1):113–27.
- Huse M, Kuriyan J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell*. 2002 May;109(3):275–82.
- Johnson SA, Hunter T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods*. 2005 Jan;2(1):17–25.
- Johnston AM, Naselli G, Gonez LJ, Martin RM, Harrison LC, DeAizpurua HJ. SPAK, a STE20/SPS1-related kinase that activates the p38 pathway. *Oncogene*. 2000 Aug 31;19(37):4290–7.
- Kahle KT, Rinehart J, de los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, et al. WNK3 modulates transport of Cl<sup>-</sup> in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Nov 15;102(46):16783–8.
- Kahle KT, Rinehart J, Ring A, Gimenez I, Gamba G, Hebert SC, et al. WNK protein kinases modulate cellular Cl<sup>-</sup> flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology*. 2006 Oct;21(5):326–35.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* (80- ). 1991 Jul 26;253(5018):407–14.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860–921.

- Lenertz LY, Lee B-HH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, et al. Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem*. 2005 Jul 22;280(29):26653–8.
- Li C, Wen A, Shen B, Lu J, Huang Y, Chang Y. FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnol*. BioMed Central Ltd; 2011;11(1):92.
- Lin D-H, Yue P, Rinehart J, Sun P, Wang Z, Lifton R, et al. Protein phosphatase 1 modulates the inhibitory effect of With-no-Lysine kinase 4 on ROMK channels. *AJP Ren Physiol*. 2012 Jul 1;303(1):F110–9.
- Lin S-H, Shiang J-C, Huang C-C, Yang S-S, Hsu Y-J, Cheng C-J. Phenotype and Genotype Analysis in Chinese Patients with Gitelman's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 May;90(5):2500–7.
- Liu Y, Belkina N V., Graham C, Shaw S. Independence of Protein Kinase C- Activity from Activation Loop Phosphorylation: STRUCTURAL BASIS AND ALTERED FUNCTIONS IN CELLS. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):12102–11.
- de los Heros P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vázquez N, San Cristobal P, et al. WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Feb 7;103(6):1976–81.
- Maki N, Komatsuda A, Wakui H, Ohtani H, Kigawa A, Aiba N, et al. Four novel mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl co-transporter gene in Japanese patients with Gitelman's syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jul 1;19(7):1761–6.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* (80- ). 2002 Dec 6;298(5600):1912–34.
- Mayan H, Vered I, Mouallem M, Tzadok-Witkon M, Pauzner R, Farfel Z. Pseudohypoaldosteronism Type II: Marked Sensitivity to Thiazides, Hypercalciuria, Normomagnesemia, and Low Bone Mineral Density. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul;87(7):3248–54.
- Melo Z, Cruz-Rangel S, Bautista R, Vázquez N, Castaneda-Bueno M, Mount DB, et al. Molecular evidence for a role for K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters in the kidney. *AJP Ren Physiol*. 2013a Nov 15;305(10):F1402–11.
- Melo Z, de los Heros P, Cruz-Rangel S, Vázquez N, Bobadilla NA, Pasantes-Morales H, et al. N-terminal serine dephosphorylation is required for KCC3 cotransporter full activation by cell swelling. *J Biol Chem*. 2013b Nov 1;288(44):31468–76.
- Mendes AI, Matos P, Moniz S, Luz S, Amaral MD, Farinha CM, et al. Antagonistic Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Cell Surface Expression by Protein Kinases WNK4 and Spleen Tyrosine Kinase. *Mol Cell Biol*. 2011 Oct 1;31(19):4076–86.
- Min X, Lee BH, Cobb MH, Goldsmith EJ. Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. *Structure*. 2004;12(7):1303–11.
- Moon TM, Correa F, Kinch LN, Pinal AT, Gardner KH, Goldsmith EJ. Solution Structure of

- the WNK1 Autoinhibitory Domain, a WNK-Specific PF2 Domain. *J Mol Biol. Elsevier B.V.*; 2013 Apr;425(8):1245–52.
- Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, et al. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J.* 2013 Nov 1;455(3):339–45.
- Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura SI, Uchida S, Natsume T, et al. WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42685–93.
- Nolen B, Taylor S, Ghosh G. Regulation of Protein Kinases. *Mol Cell.* 2004 Sep;15(5):661–75.
- Ohta A, Schumacher F-R, Mehellou Y, Johnson C, Knebel A, Macartney TJ, et al. 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.* 2013;451(1):111–22.
- Pacheco-Alvarez D, Cristobal PS, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Munoz E, et al. The Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> Cotransporter Is Activated and Phosphorylated at the Amino-terminal Domain upon Intracellular Chloride Depletion. *J Biol Chem.* 2006 Sep 29;281(39):28755–63.
- Pacheco-Alvarez D, Vázquez N, Castañeda- M, Cortes-González C, Meade P, Bobadilla N a., et al. WNK3-SPAK interaction is required for the modulation of NCC and other members of the SLC12 family. *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(1-2):291–302.
- Piala AT, Moon TM, Akella R, He H, Cobb MH, Goldsmith EJ. Chloride Sensing by WNK1 Involves Inhibition of Autophosphorylation. *Sci Signal.* 2014 Jan;7(324):ra41.
- Piechotta K, Garbarini N, England R, Delpire E. Characterization of the Interaction of the Stress Kinase SPAK with the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter in the Nervous System: EVIDENCE FOR A SCAFFOLDING ROLE OF THE KINASE. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):52848–56.
- Piechotta K, Lu J, Delpire E. Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50812–9.
- Ponce-Coria J, Markadieu N, Austin TM, Flammang L, Rios K, Welling P a., et al. A novel Ste20-related Proline/Alanine-rich Kinase (SPAK)-independent pathway involving Calcium-binding Protein 39 (Cab39) and Serine Threonine Kinase with No Lysine Member 4 (WNK4) in the activation of Na-K-Cl cotransporters. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17680–8.
- Ponce-Coria J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de los Heros P, et al. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci.* 2008 Jun 17;105(24):8458–63.
- Richardson C, Alessi DR. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci.* 2008 Oct 15;121(20):3293–304.

- Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HKR, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, et al. Activation of the thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 5):675–84.
- Richardson C, Sakamoto K, de los Heros P, Deak M, Campbell DG, Prescott AR, et al. Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci.* 2011 Mar 1;124(5):789–800.
- Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, et al. Sites of Regulated Phosphorylation that Control K-Cl Cotransporter Activity. *Cell.* Elsevier Ltd; 2009 Aug;138(3):525–36.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010 Apr 25;5(4):725–38.
- San-Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi FH, et al. Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Mar 17;106(11):4384–9.
- Schumacher F-R, Sorrell FJ, Alessi DR, Bullock AN, Kurz T. Structural and biochemical characterization of the KLHL3-WNK kinase interaction important in blood pressure regulation. *Biochem J.* 2014;460(2):237–46.
- Sengupta S, Tu SW, Wedin K, Earnest S, Stippec S, Luby-Phelps K, et al. Interactions with WNK (With No Lysine) family members regulate oxidative stress response 1 and ion co-transporter activity. *J Biol Chem.* 2012;287(45):37868–79.
- Shaharabany M, Holtzman EJ, Mayan H, Hirschberg K, Seger R, Farfel Z. Distinct pathways for the involvement of WNK4 in the signaling of hypertonicity and EGF. *FEBS J.* 2008 Apr;275(8):1631–42.
- Shao L, Ren H, Wang W, Zhang W, Feng X, Li X, et al. Novel SLC12A3 mutations in Chinese patients with Gitelman's syndrome. *Nephron Physiol.* 2008;108(3):p29–36.
- Subramanya AR, Liu J, Ellison DH, Wade JB, Welling P a. WNK4 diverts the thiazide-sensitive NaCl cotransporter to the lysosome and stimulates AP-3 interaction. *J Biol Chem.* 2009;284(27):18471–80.
- Taylor CA, Juang Y, Earnest S, Sengupta S, Goldsmith EJ, Cobb MH. Domain-Swapping Switch Point in Ste20 Protein Kinase SPAK. *Biochemistry.* 2015 Aug 18;54(32):5063–71.
- Terker AS, Zhang C, Erspamer KJ, Gamba G, Yang C-L, Ellison DH. Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis. *Kidney Int. Nature Publishing Group;* 2016 Jan;89(1):127–34.
- Terker AS, Zhang C, McCormick JA, Lazelle RA, Zhang C, Meermeier NP, et al. Potassium Modulates Electrolyte Balance and Blood Pressure through Effects on Distal Cell Voltage and Chloride. *Cell Metab.* 2015 Jan;21(1):39–50.
- Thastrup JO, Rafiqi FH, Vitari AC, Pozo-Guisado E, Deak M, Mehellou Y, et al. SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform

- interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochem J.* 2012 Jan 1;441(1):325–37.
- Ushiro H, Tsutsumi T, Suzuki K, Kayahara T, Nakano K. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Ste20-Related Protein Kinase Enriched in Neurons and Transporting Epithelia. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Jul;355(2):233–40.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304–51.
- Verissimo F, Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene.* 2001 Sep 6;20(39):5562–9.
- Villa F, Goebel J, Rafiqi FH, Deak M, Thastrup J, Alessi DR, et al. Structural insights into the recognition of substrates and activators by the OSR1 kinase. *EMBO Rep.* 2007 Sep;8(9):839–45.
- Vitari AC, Deak M, Morrice N a, Alessi DR. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J.* 2005;391(Pt 1):17–24.
- Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, Karlsson HKR, et al. Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem J.* 2006 Jul 1;397(1):223–31.
- Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science (80- ).* 2001 Aug 10;293(5532):1107–12.
- Xu BE, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH. WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem.* 2000 Jun 2;275(22):16795–801.
- Xu BE, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ, Cobb MH. Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48456–62.
- Yadav SS, Miller WT. The Evolutionarily Conserved Arrangement of Domains in Src Family Kinases Is Important for Substrate Recognition †. *Biochemistry.* 2008 Oct 14;47(41):10871–80.
- Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, Ellison DH. Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1379–87.
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods.* Nature Publishing Group; 2014 Dec 30;12(1):7–8.
- Zagórska A, Pozo-Guisado E, Boudeau J, Vitari AC, Rafiqi FH, Thastrup J, et al. Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. *J Cell Biol.* 2007;176(1):89–100.
- Zhang J, Siew K, Macartney T, O'Shaughnessy KM, Alessi DR. Critical role of the SPAK

protein kinase CCT domain in controlling blood pressure. *Hum Mol Genet.* 2015;24(16):4545–58.

Zhu G, Fujii K, Liu Y, Codrea V, Herrero J, Shaw S. A single pair of acidic residues in the kinase major groove mediates strong substrate preference for P-2 or P-5 arginine in the AGC, CAMK, and STE kinase families. *J Biol Chem.* 2005 Oct 28;280(43):36372–9.