



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Mecanismos de regulación fisiológica y molecular de la cinasa WNK4

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Silvana Bazúa Valenti

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Gerardo Gamba Ayala

[IIB-UNAM e INCMNSZ](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

[Facultad de Química-UNAM](#)

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

[IIB-UNAM e INCMNSZ](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2018



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.

A mis padres Giovanna y Fernando

El jurado de examen para optar por el grado de Doctorado en Ciencias estuvo constituido por:

Dra. Herminia Pasantes Ordóñez	Presidente
Dr. Jesús Adolfo García Sáinz	Secretario
Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas	Vocal
Dr. José de Jesús García Valdés	Vocal
Dr. Armando Roberto Tovar Palacios	Vocal

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros del jurado por las valiosas correcciones y contribuciones que hicieron a la tesis.

Agradecimientos académicos

El trabajo que sustenta esta tesis doctoral se realizó bajo la asesoría del Dr. Gerardo Gamba con quien estoy eterna y enormemente agradecida. Le agradezco haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, y con ello haberme dado una de las mejores épocas de mi vida. No hay palabras suficientes para expresar todas las formas en que me ha ayudado en mi carrera y a formarme como persona y como investigadora.

A los miembros de mi Comité Tutorial, la Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta y el Dr. Alejandro Zentella, por sus apreciables orientaciones personales y académicas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Investigaciones Biomédicas, al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por darme una formación académica de excelencia e inigualable. Un agradecimiento especial a Julio Ignacio Palacios y Rosa Lilia de la Rocha y la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias, ¡quiénes hacen posible que todo esto suceda! Y a quiénes debemos un ¡programa de posgrado de muy alta calidad!

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado, por el apoyo económico.

Mis estudios de doctorado fueron apoyados por una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a quien agradezco la oportunidad que me brindó. Adicionalmente, el trabajo realizado fue financiado por el programa "Fronteras de la ciencia" beca No.23, CONACyT-188712, y CONACyT-165815.

A mi familia, amigos y colegas del laboratorio y hospital, quienes tienen un lugar especial en mis afectos, recuerdos y alegrías. A mi hermana no genética, Aura Perroni, por todo el apoyo, compañía, y la revisión del texto.

A Mariano Benlliure, mi mejor amigo y esposo, por la felicidad, apoyo y comprensión que me brinda todos los días y por compartir conmigo innumerables retos para convertirme en una mejor persona.

“The romance of science lies in its explorations. Equipped with his five senses, man explores the universe around him and calls the adventure Science.”

— Edwin Powell Hubble
In “The Exploration of Space”

Índice

Resumen	3
Capítulo I. Introducción	5
Introducción a la fisiología renal y la homeostasis de los líquidos corporales	5
Reabsorción de sodio a lo largo de la nefrona	7
Reabsorción en el túbulo contorneado distal: actividad de NCC.....	11
Regulación de la actividad de NCC por una cascada de cinasas	17
Regulación de las WNKs por degradación: más explicaciones sobre el pseudohipoaldosteronismo tipo II	22
Capítulo II. De la regulación molecular a la fisiológica de WNK4.....	25
WNK4 como reguladora de la actividad de NCC	25
WNK4 como inhibidor de NCC.....	26
WNK4 como activador de NCC.....	26
El cloruro como regulador de la actividad de WNK4	32
Planteamiento del problema.....	35
Hipótesis	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
Resultados	36
Resumen de resultados	36
Resultados no publicados.....	37
Actividad de la mutante WNK4-L322F en células HEK-293.....	37
Conclusiones.....	39
Discusión y perspectivas.....	40
Capítulo III. De la regulación molecular de WNK4 a la fisiología de la reabsorción de NaCl en el túbulo distal	43
Regulación del calcio por el Receptor-sensor de calcio	43
Patologías asociadas a mutaciones en el CaSR	44
Detalles estructurales del CaSR	45
Señalización intracelular del CaSR.....	47
El CaSR en la nefrona y su relación con la reabsorción de sodio	48
Regulación de NCC por otros GPCRs	51

Planteamiento del problema.....	53
Hipótesis	53
Objetivo principal	53
Objetivos específicos	53
Resultados	55
Resumen de resultados	55
Resultados no publicados.....	56
Conclusiones.....	57
Discusión y perspectivas.....	58
Capítulo IV. Materiales y Métodos	61
Animales	61
Experimentos <i>in vivo</i>	61
Perfusión <i>ex vivo</i>	62
Inmunofluorescencia	62
Mutagénesis sitio dirigida de WNK4	63
Expresión heteróloga y ensayos de función en <i>Xenopus laevis</i>	63
Expresión y ensayo funcional	63
Medición de cloruro intracelular	65
Cultivo celular y transfección transitoria en células HEK-293	65
Inmunoprecipitación	66
<i>Western blot</i>	67
Análisis estadístico.....	68
Referencias	69
Anexo 1. Otras publicaciones	82

Resumen

La cinasa *with-no-lysine 4* (WNK4) juega un papel principal en la regulación de la actividad del cotransportador de Na⁺-Cl⁻ sensible a tiazidas (NCC), que es fundamental en la reabsorción renal de sodio en el túbulo contorneado distal (TCD) y, por lo tanto, en el manejo de la presión arterial. WNK4 fosforila y activa a la cinasa *Sterile20-related proline-alanine-rich kinase* (SPAK) que, a su vez, fosforila y activa a NCC. Mutaciones con ganancia de función en WNK4 causan el pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII), una patología que se caracteriza por hipertensión arterial. El efecto de WNK4 sobre NCC es un tema controvertido, ya que hay evidencias positivas y negativas al respecto. Recientemente se demostró que otra cinasa de la familia, la WNK1, tiene un sitio de unión a cloruro y que la unión de este ión inhibe la actividad de la cinasa, por lo que planteamos la posibilidad de que la actividad de WNK4 sobre NCC podría ser modulada por la concentración intracelular de cloruro ([Cl⁻]_i). La hipótesis se probó en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAc de NCC y WNK4. En estado basal, la [Cl⁻]_i de los ovocitos se encuentra alrededor de 50 mM y en estas condiciones, WNK4 no está activa y está desfosforilada. La actividad de NCC está disminuida, o bien, no es afectada por WNK4. Al reducir experimentalmente la [Cl⁻]_i, ya sea por estrés hipotónico bajo en cloruro o por la coexpresión del intercambiador de aniones SLC26A9, encontramos que cuando la [Cl⁻]_i baja WNK4 se fosforila, se activa y aumenta la actividad de NCC. La sustitución de la leucina 322 por fenilalanina (WNK4-L322F), hómologa a la leucina de WNK1 que determina el sitio de unión a cloruro, convirtió a WNK4 en una cinasa constitutivamente fosforilada y activadora de NCC, incluso en condiciones basales. La eliminación de la actividad catalítica de la mutante WNK4-L322F (por la mutación D321A) o del sitio de activación por fosforilación (por la mutación S335A) anuló el efecto positivo sobre NCC. Estas observaciones sugieren que WNK4 es una cinasa sensible a cloruro y que puede ejercer distintos efectos sobre NCC dependiendo de la [Cl⁻]_i.

En otra parte del proyecto de investigación que sustenta esta tesis nos planteamos una pregunta fisiológica en relación con WNK4. La reabsorción de NaCl y de calcio en la nefrona tiene una integración particular en dos segmentos adyacentes de la nefrona, la rama ascendente del asa de Henle (AAH) y el TCD. En respuesta a un aumento en la concentración de calcio sérico (hipercalcemia), el Receptor-Sensor de calcio (CaSR) en la membrana basolateral de la AAH promueve la calciuria reduciendo la reabsorción de calcio al inhibir la de NaCl por NKCC2. ¿Cómo se recupera el NaCl que no se reabsorbe? El CaSR también se expresa en la membrana apical del TCD; sin embargo, su papel en la regulación de la reabsorción de NaCl no es claro aún. Recientemente se demostró que el receptor de Angiotensina II, que es un receptor de la misma familia que el CaSR, activa a WNK4 a través de la Proteína Cinasa C (PKC). Por lo que planteamos la posibilidad de que en la

hipercalcemia, el calcio que llega aumentado al TCD enciende al CaSR que, a su vez, activa a NCC para recuperar el NaCl. En ovocitos de *Xenopus laevis* encontramos que el CaSR activo aumenta la actividad de NCC de manera dependiente de WNK4. En células HEK-293, la estimulación del CaSR con el calcimimético R-568 aumentó la fosforilación de SPAK, que es un surrogado de la activación de NCC. Además, la activación del CaSR en las células condujo a la fosforilación por PKC de Kelch3 (KLHL3), una proteína que forma el complejo de ubiquitinación que degrada a WNK4, resultando en un aumento de la abundancia y actividad de WNK4. Finalmente, corroboramos que *in vivo* la administración aguda de R-568 condujo a la fosforilación de NCC y WNK4 en ratones silvestres. Nuestros resultados sugieren que el CaSR activa a NCC por una vía de señalización que involucra a PKC-WNK4-SPAK. Con esto proponemos un mecanismo fisiológico mediante el que la activación de NCC recupera el NaCl al mismo tiempo que permite la excreción de calcio.

Capítulo I. Introducción

“Recognizing that we have the kind of blood we have because we have the kind of kidneys that we have, we must acknowledge that our kidneys constitute the major foundation of our physiological freedom. Superficially, it might be said that the function of the kidneys is to make urine; but in a more considered view one can say that the kidneys make the stuff of philosophy itself.”

— Homer Smith
In From Fish to Philosopher

Introducción a la fisiología renal y la homeostasis de los líquidos corporales

Alrededor de 60% del peso de un individuo adulto sano equivale al líquido corporal, que incluye dos grandes compartimentos: el líquido intracelular (que representa 2/3 partes) y el líquido extracelular (que representa 1/3 parte)¹. El líquido extracelular se divide a su vez en el líquido intersticial, es decir, el fluido que se encuentra rodeando a las células en los tejidos y en el líquido intravascular, también conocido como volumen intravascular o volumen sanguíneo². Mantener este volumen es de vital importancia para el organismo ya que de esto depende la presión arterial y la correcta perfusión de los tejidos. Dado que la distribución del agua depende del número de iones y partículas que componen los líquidos, un paso fundamental para mantener un volumen constante es controlar la concentración de estos. Los principales iones del líquido corporal son el sodio (Na^+), el potasio (K^+), el cloruro (Cl^-), el calcio (Ca^{2+}), el magnesio (Mg^{2+}), también lo son los hidrogeniones (H^+) y el bicarbonato (HCO_3^-), que además son importantes para el pH del organismo³. Aunque los líquidos corporales se encuentren en diferentes compartimentos, existe un intercambio constante entre ellos, por lo que si algún componente, o bien, el volumen del líquido extracelular se desequilibra, también lo hará el medio intracelular, impactando directamente las funciones celulares.

El órgano encargado de mantener la homeostasis del líquido extracelular es el riñón. Para esto, el riñón ajusta de manera muy fina la excreción urinaria de iones y agua de acuerdo con la ingesta variante de estos a lo largo el día². Más aún, este órgano es capaz de regular individualmente la excreción de cada uno de los iones según lo que el organismo necesite excretar. Esta regulación individual de la excreción no es trivial, ya que en algunas ocasiones se deben integrar mecanismos reguladores que permiten excretar un ion al mismo tiempo

que recupera otro. El presente estudio propone uno de estos mecanismos integradores mediante el que el riñón mantiene la homeostasis de dos iones en particular: la sal (NaCl) y el calcio (Ca²⁺).

La unidad funcional del riñón es la nefrona y cada riñón humano contiene alrededor de un millón de nefronas^{2,3,4}. La nefrona está formada por dos componentes: el glomérulo, que es una red esférica de capilares flanqueada por dos arteriolas (la aferente, por donde llega la sangre, y la eferente, por donde sale), y un túbulo renal formado por células epiteliales polarizadas contiguas. En un corte transversal del riñón se puede observar que los glomérulos se encuentran en la corteza, mientras que los túbulos empiezan en la corteza pero se extienden hasta la parte más interna del riñón, conocida como médula renal^{3,5}. El glomérulo está delimitado por la cápsula de Bowman que está compuesta de células epiteliales que forman el espacio urinario que recibe el plasma que se filtra de los capilares. El contenido del espacio urinario del glomérulo drena hacia el túbulo contorneado proximal y a partir de aquí es en donde ocurre la modificación del filtrado glomerular para la formación de la orina, dependiendo de dos procesos: reabsorción y secreción. La reabsorción consiste en recuperar iones o sustancias que se ultrafiltraron y la secreción consiste en mover iones desde el intersticio renal hacia el lumen tubular^{2,3}. Estos procesos ocurren de manera heterogénea a lo largo del túbulo renal, ya que este está formado por distintos segmentos que difieren entre sí por su función y el tipo de célula que lo conforma. Los segmentos que conforman el túbulo renal son: el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el conducto colector (figura1).

El túbulo proximal se encuentra en la corteza renal y está compuesto anatómicamente por tres segmentos: S1 (túbulo contorneado proximal), S2 y S3 (*pars recta*), que desciende ligeramente hacia la médula. El asa de Henle empieza inmediatamente después del segmento *pars recta* y se divide en la rama descendente delgada, la rama ascendente delgada y la última parte que es la ascendente gruesa. La longitud del asa varía dependiendo de la nefrona, pero en general, se extiende hasta la médula renal. La última parte de la rama ascendente se reencuentra con el glomérulo en la corteza. Esta región, donde el túbulo pasa entre las arteriolas, se conoce como mácula densa^{3,6} (hablaré de esta región más adelante). Después de la mácula densa, los siguientes segmentos se agrupan en una entidad que se conoce como la nefrona distal, que está compuesta por tres segmentos. El segmento que existe inmediatamente después de la mácula densa es el túbulo contorneado distal (TCD) y es el objeto de estudio de este proyecto. Siguen el túbulo conector, y el conducto colector que se extiende hasta la parte más interna de la médula renal. En los conductos colectores se unen varias nefronas y esto desemboca en los cálices renales y finalmente en la pelvis

renal. La pelvis renal es la primera parte del uréter, el conducto que conecta al riñón con la vejiga (figura1).

Como se mencionó arriba, todos los segmentos de la nefrona están compuestos por varios tipos de células que tienen características morfológicas distintas y, por lo tanto, diferentes capacidades fisiológicas. Visto desde un panorama muy general antes de entrar en la parte más específica de esta tesis, el túbulo proximal y el asa de Henle son los segmentos encargados de reabsorber el mayor porcentaje del plasma filtrado (90%), mientras que la nefrona distal se encarga de la regulación fina de la reabsorción (10%) y/o secreción de los iones para formar la orina final de acuerdo con las necesidades del organismo.

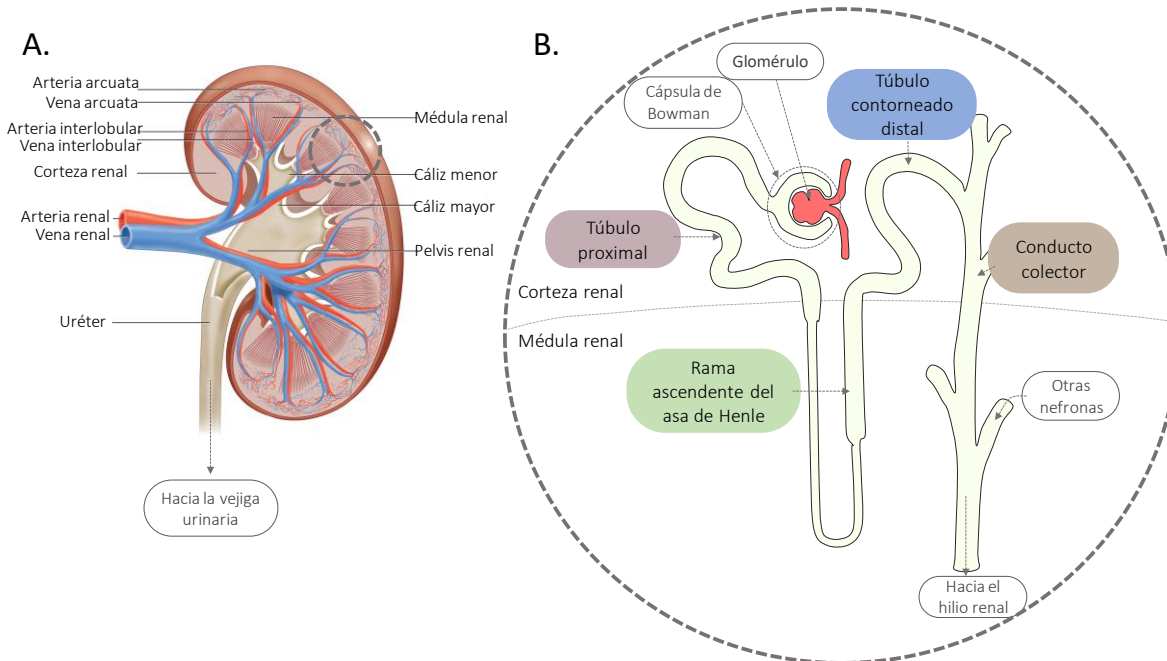


Figura 1. El riñón y la nefrona. A. Esquema de un corte transversal del riñón en donde se muestran las principales arterias y venas, la corteza y la médula renal, los cálices que desembocan hacia la pelvis renal, que se convierte en el uréter (imagen tomada de <http://www.interactive-biology.com/3254/the-anatomy-of-the-kidney/>). B. Retrato de la nefrona y los diferentes segmentos que la conforman.

Reabsorción de sodio a lo largo de la nefrona

El sodio es el componente predominante del líquido extracelular y, en consecuencia, su concentración afecta directamente la osmolaridad del líquido intravascular¹. Si aumenta la cantidad de sodio, el agua debe aumentar proporcionalmente. De ahí que la concentración de sodio en el líquido extracelular determina el volumen circulante. Mantener en equilibrio este ion es entonces uno de los requerimientos fisiológicos más importantes del organismo ya que tiene un impacto directo sobre el volumen intravascular y, por lo tanto, sobre la

presión arterial (PA). Explicaré esto con más detalle. La PA está íntimamente ligada al volumen del líquido intravascular. Si hay mucho sodio en este líquido, aumenta la osmolaridad y el organismo necesitará retener agua para equilibrarlo*. Al aumentar el volumen intravascular, aumentará el retorno venoso, y esto, según los mecanismos de Frank-Starling, hará que el corazón se contraiga más fuerte y aumentará el gasto cardiaco (gasto cardiaco = volumen sistólico x frecuencia cardiaca). Entonces, para lograr que la PA se mantenga en equilibrio, el riñón varía la excreción urinaria de sodio en relación a la presión arterial, mecanismo conocido como natriuresis de presión^{2,9}. Si la PA aumenta, la natriuresis aumenta paralelamente, lo que disminuye el volumen circulante y eventualmente la presión. Al contrario, si la PA disminuye, la natriuresis también disminuye y el riñón retiene sodio y agua para aumentar el volumen sanguíneo, logrando normalizar la presión.

El riñón filtra alrededor de 180 litros al día en los que incluye a 26,000 mEq de sodio (que a su vez equivalen a alrededor de 1 Kg de NaCl)^{2,10}. Si el riñón excretara en la orina esta cantidad de sodio, se requeriría de una ingesta similar para estar en balance, por lo que la homeostasis de este ion depende de cuánto se reabsorbe a lo largo de los diferentes segmentos del túbulo renal para regresar a la circulación sistémica, es decir, para que vuelva a formar parte del líquido intravascular. En un individuo normal y sano se reabsorbe el >99% del sodio filtrado¹. Dado que cada segmento es diferente, la vía y el tipo de transporte por que se reabsorben los iones difiere de uno a otro. Existen dos vías principales: la paracelular, que es una vía pasiva que ocurre a través de las uniones celulares y la transcelular, que involucra la función de proteínas transmembranales. El sodio se reabsorbe por la vía transcelular gracias a la actividad de la ATPasa de Na⁺-K⁺ presente en la membrana basolateral de todas las células del túbulo renal. Esta ATPasa activamente intercambia dos iones de potasio hacia el interior de la célula por tres de sodio hacia fuera, generando un gradiente electroquímico[†] que favorece la entrada de sodio por canales o transportadores en la membrana apical^{1,3} (figura 2).

En el túbulo proximal se recupera la mayor parte del sodio filtrado (alrededor de 65%) mediante la operación simultánea del intercambiador de Na⁺-H⁺ (NHE3) y cotransportadores de Na⁺ acoplados a glucosa (SGLT2 y SGLT1), amino ácidos (BOAT1) y fosfatos (NaPi2)^{10,11}.

* La regulación del volumen involucra mecanismos más allá de los renales. Existe un eje osmoreceptor neuroendocrino hipotálamo-neurohipofisiario que, por un lado, regula la secreción de la hormona antidiurética (o vasopresina), y, por otro lado, regula los mecanismos que inducen la sed. Osmoreceptores ubicados en los órganos circunventriculares, por ejemplo, el órgano vascular de la lámina terminal y órgano subfornical, son capaces de detectar la concentración iónica de la sangre. Pequeños cambios en la osmolalidad plasmática dentro del rango fisiológico estimulan la transcripción de vasopresina en las células vasopresinérgicas ubicadas en los núcleos para ventricular y supraóptico, los axones de estas neuronas llegan hasta la neurohipófisis donde la hormona se libera a la sangre⁷. En el riñón, la vasopresina promueve la inserción de la acuaporina 2 (AQP2) en la membrana apical del conducto colector para aumentar la reabsorción de agua⁸.

† La ATPasa de Na⁺-K⁺ mantiene la concentración intracelular de Na⁺ alrededor de 20 a 30 mEq/L, mientras que la concentración extracelular se encuentra alrededor de 145 mEq/L. Además, la actividad de la ATPasa genera potencial de membrana al expulsar 3 cationes y solo meter dos¹.

Todo el sodio que se reabsorbe genera un gradiente osmótico que promueve la reabsorción de agua; y dado que las uniones celulares y las membranas de las células del epitelio de este segmento son permeables al agua, esta se reabsorbe de manera proporcional manteniendo la concentración luminal de sodio constante.

En la rama ascendente gruesa del asa de Henle se reabsorbe alrededor de 25% del sodio filtrado principalmente a través del cotransportador de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2)¹⁰. Dos mecanismos además de la ATPasa facilitan la actividad de NKCC2. Primero, la expulsión basolateral de cloruro a través del canal ClC-Kb ; y segundo, el reciclaje apical de potasio a través del canal medular de potasio (ROMK). El reciclaje de potasio promueve la acumulación de cargas positivas en el lumen tubular, generando un voltaje transepitelial, entre el lumen positivo y el intersticio negativo, que proporciona una fuerza motriz que promueve la reabsorción paracelular de cationes como sodio, calcio y magnesio^{12,13,14}. La presencia de mutaciones inactivantes de NKCC2, ROMK o ClC-Kb resultan en el síndrome de Bartter tipo I, II y III, respectivamente. Los pacientes con síndrome de Bartter tienen una tubulopatía caracterizada por grandes pérdidas de NaCl y agua que llevan a hipotensión, hipokalemia, alcalosis metabólica, hipercalciuria (que aumenta el riesgo de nefrolitiasis), e hipertrofia del aparato juxtaglomerular^{15,13}.

El NKCC2 es el blanco de los diuréticos de asa (como la Furosemida) que se utilizan mucho en el tratamiento de pacientes con hipertensión arterial o estados edematosos, como insuficiencia cardíaca, enfermedad hepática crónica, enfermedad renal crónica o síndrome nefrótico. La última porción de la rama ascendente del asa de Henle contiene un grupo de células especializadas llamado mácula densa. La mácula densa funciona como un sensor que detecta la cantidad de NaCl del líquido intratubular gracias a la expresión y actividad de NKCC2^{16,17}. Lo que reabsorbe NKCC2 en estas células cambia la concentración intracelular de iones, en particular de cloruro, si este se detecta por debajo de lo normal, las células de la mácula densa activan cascadas de señalización con el fin de vasodilatar la arteriola aferente del glomérulo y favorecer la secreción de renina^{18,19}. La renina es una proteasa que tiene un papel limitante en la producción de la hormona hipertensora angiotensina II y que provoca la vasoconstricción de la arteriola eferente. El efecto de vasodilatar la arteriola aferente y de generar vasoconstricción de la eferente, es aumentar la presión hidrostática capilar para incrementar la tasa de filtración glomerular (TFG). Al contrario, si la concentración de cloruro es mayor, todos estos mecanismos se inhiben y se favorece la vasoconstricción de la arteriola aferente para bajar la TFG. Este mecanismo regulatorio se conoce como sistema de retroalimentación túbuloglomerular y su función principal es regular la TFG de acuerdo con la necesidad del organismo de reabsorber más o menos sodio^{2,20}.

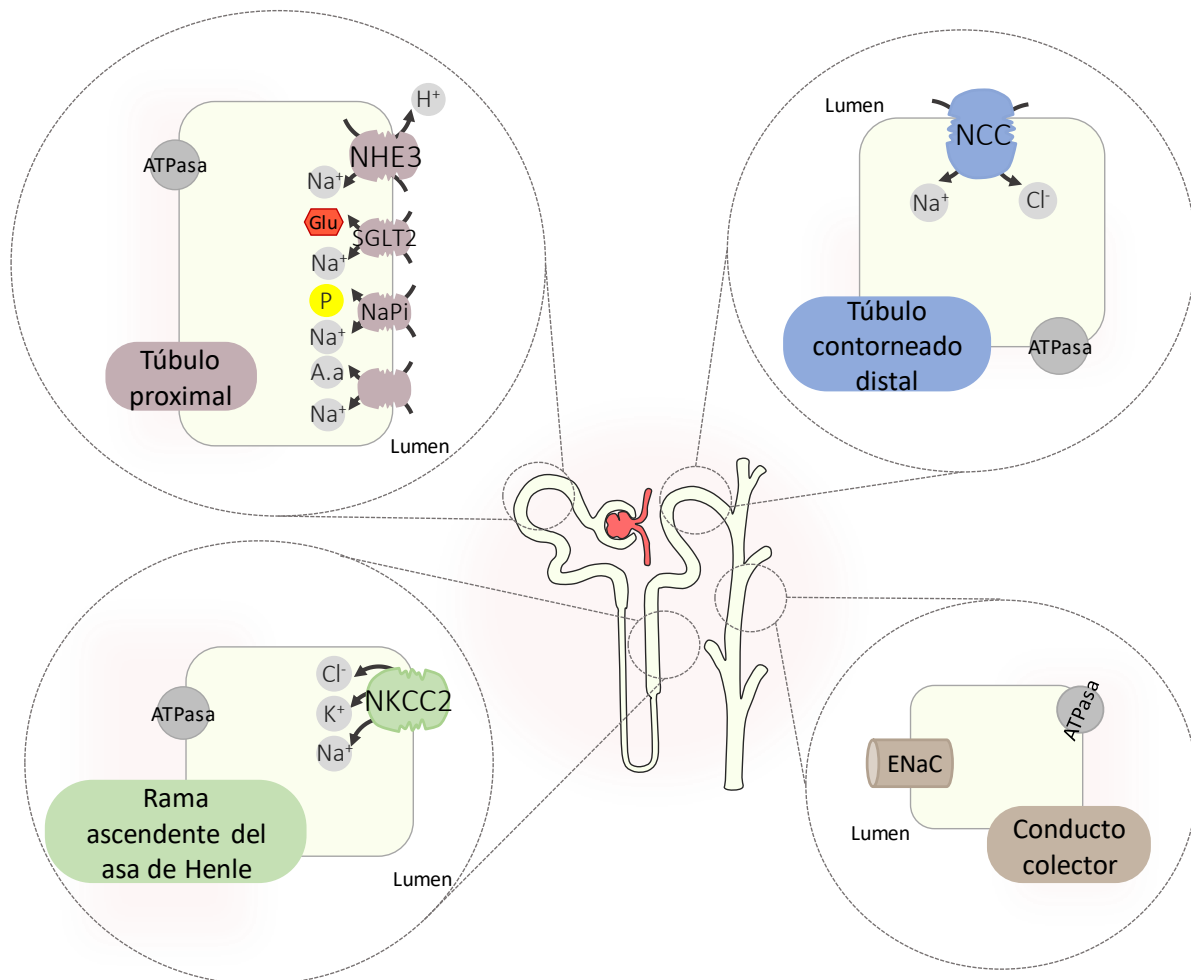


Figura 2. Reabsorción de sodio a lo largo de la nefrona. Se muestran los principales transportadores y/o canales de sodio en los diferentes segmentos de la nefrona.

Dado que toda la reabsorción de NaCl que ocurra antes de la mácula densa será compensada por este sistema, la única reabsorción que afectará directamente la concentración intravascular de NaCl es aquella que ocurre después de este segmento, es decir, en la nefrona distal. Por esta razón, este segmento de la nefrona (que contiene el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el conducto colector) es donde ocurre la regulación fina de la excreción de NaCl, calcio y agua^{10,21}. De hecho, es el blanco de hormonas como la aldosterona, la angiotensina II, la hormona paratiroidea y la vasopresina. Todas estas son efectoras de mecanismos que controlan el volumen y la osmolaridad del líquido extracelular.

En la primera parte de la nefrona distal se encuentra el túbulo contorneado distal. Aquí se reabsorbe alrededor de 5 al 10% del sodio filtrado¹⁰. Aunque comparado con el porcentaje de reabsorción de la nefrona proximal 10% suena poco, este segmento es determinante para la concentración de NaCl del líquido intravascular. Esto es por dos razones: la primera, que se mencionó arriba, es que se encuentra después de la mácula densa y, por lo tanto, lo que

reabsorbe no es regulado por ningún mecanismo; la segunda es que el 10% equivale a 50 g de sodio cada 24 horas, que no es una cantidad despreciable. En el túbulo contorneado distal se distinguen anatómicamente tres subsegmentos: la primera parte del túbulo contorneado distal 1 (TCD1), luego la segunda parte (TCD2) y, después, el túbulo conector. En el TCD1, la reabsorción de NaCl ocurre a través del cotransportador de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ sensible a tiazidas (NCC)²², que es el objeto de estudio de este proyecto. El TCD2 es un epitelio de transición, por lo que posee células que tienen NCC y células que tienen otra vía de entrada de sodio de la nefrona distal: el canal epitelial de sodio (ENaC)^{22,23}. Se ha demostrado que conforme la nefrona avanza en dirección distal (desde TCD1 a TCD2 y al túbulo conector) la expresión de NCC disminuye y la de ENaC aumenta²⁴.

El conducto colector, la última parte de la nefrona distal, reabsorbe alrededor de 1% del sodio filtrado y es un segmento heterogéneo formado por tres tipos de células: las principales y las intercaladas tipo A y B¹⁰. ENaC se encuentra en las células principales y, dado que es un canal, la reabsorción de sodio no se acompaña de aniones, como es el caso de los cotransportadores electroneutros mencionados arriba. La consecuencia de esto es que la reabsorción de sodio a través de ENaC genera una carga eléctrica negativa en el lumen tubular que lleva a una diferencia de voltaje entre el medio intracelular y el lumen negativo que promueve la secreción de potasio a través de ROMK.

Reabsorción en el túbulo contorneado distal: actividad de NCC

En 1993 el doctor Gerardo Gamba y sus colaboradores clonaron el DNAC de NCC a partir de la vejiga urinaria del lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*) utilizando lo que fue entonces una novedosa e ingeniosa estrategia de clonación por expresión funcional heteróloga en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*²⁶. La estrategia, a grandes rasgos, consistía en inyectar RNAm aislado de la vejiga del pez y analizar cuál de estos fragmentos promovía la captación de sodio radioactivo sensible a tiazida y dependiente de cloruro (equivalente al transporte de sodio radioactivo al interior del ovocito). Una vez establecido el ensayo, fraccionaron el RNAm por tamaño para encontrar la fracción mínima que indujera el efecto funcional y a partir de este construyeron una genoteca de DNAC de la que aislaron finalmente el DNAC que codifica para el NCC de lenguado. Con esta sonda, fueron entonces capaces de aislar por homología el DNAC de genomas de mamíferos, entre ellos el humano, y caracterizar más allá su estructura y función en el riñón. Gracias a la clonación del NCC, se encontraron otros genes que codifican para cotransportadores como el $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2)²⁷, que pertenecen a la misma familia de cotransportadores.

En cuanto a la estructura del NCC, el análisis de hidrofobicidad sugiere que tiene un dominio hidrofóbico central con 12 pases transmembranales flanqueado por un amino terminal corto

y un carboxilo terminal largo, ambos intracelulares^{28,29} (figura 3). La estructura del NCC de rata y de lenguado sugiere que existen dos sitios de glicosilación, Asn404 y Asn426, en el asa extracelular que conecta la hélice transmembrana 7 con la 8, estos sitios son fundamentales para que el cotransportador llegue a la membrana apical^{30,31}. Algunos estudios realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAc de NCC marcado con FLAG y/o HA y construcciones de concatámeros sugieren que el NCC puede formar homodímeros; sin embargo, todavía no se ha demostrado si estos dímeros impactan la función o tienen alguna relevancia fisiológica^{32,33}.

Ahora bien, el NCC transporta cloruro junto con el sodio, por lo que la reabsorción de sodio es electroneutra. Este transporte en las células del túbulo contorneado distal está facilitado por procesos que es importante mencionar y tomar en cuenta (figura 4). La ATPasa de Na⁺-K⁺ en la membrana basolateral genera el gradiente electroquímico que permite que la entrada de sodio por NCC sea un transporte activo secundario. El sodio atraviesa la célula epitelial y sale por la ATPasa, mientras que el cloruro sale por la membrana basolateral a

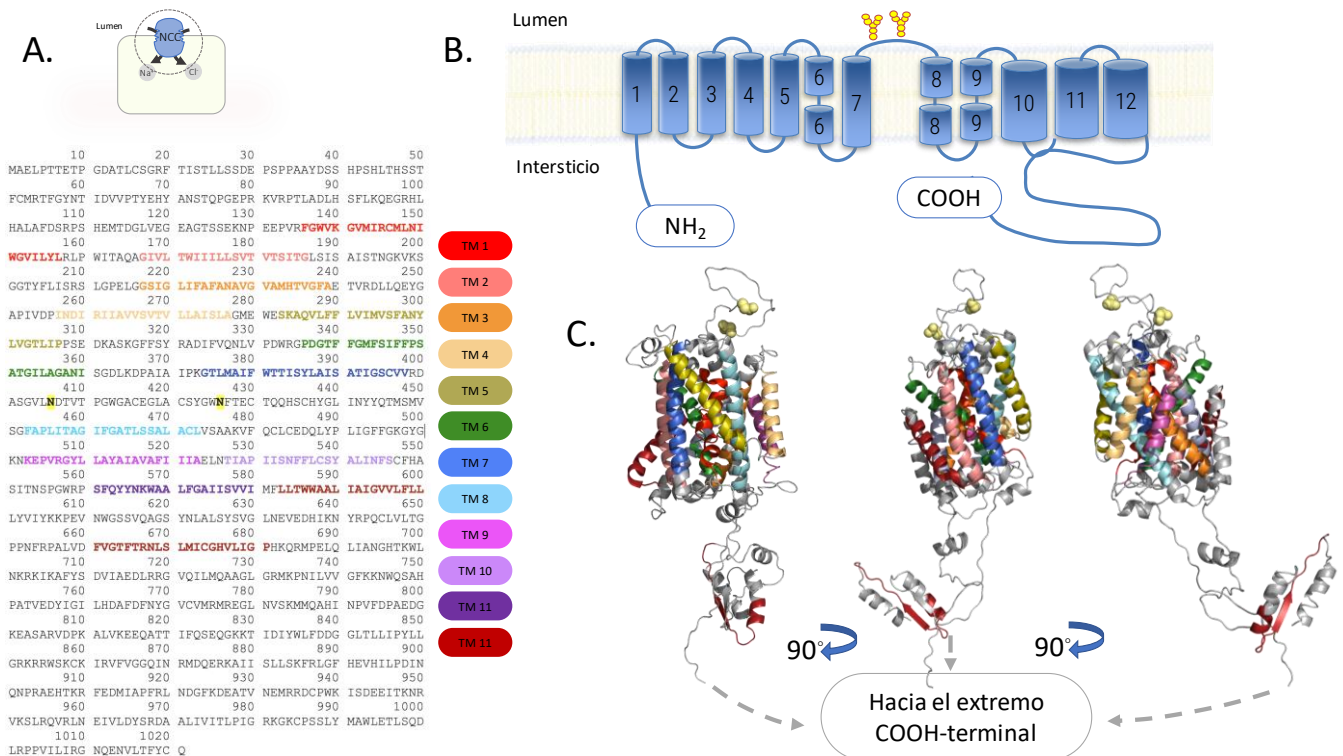


Figura 3. Estructura de NCC. A. Estructura primaria del cotransportador en donde se resaltan las hélices transmembranales predichas por un análisis de hidrofobicidad. B. Esquema de las hélices y los sitios de glicosilación (esferas amarillas). C. Predicción de la estructura terciaria de los dominios transmembrana de NCC. Modelo generado con el programa RaptorX y modelado con PyMol para MacOSX. Las esferas amarillas representan los sitios de glicosilación. Para mejorar el modelado, sólo se incluyeron los aminoácidos que forman el dominio transmembrana, la secuencia de los dominios amino y carboxilo terminal no se metieron al programa.

través del canal CIC-Kb²³. Por un lado, la salida basolateral de cloruro también favorece el gradiente de entrada de sodio y, por el otro, mantiene la concentración intracelular baja, lo que es un estímulo muy potente que activa a NCC³⁴. El potasio que entra a la célula por la ATPasa se recircula al medio extracelular (es decir, al intersticio renal) a través de canales basolaterales de potasio formados por las subunidades Kir4.1/Kir5.1. Este reciclaje de potasio es muy importante para que la ATPasa siga funcionando³⁵. De hecho, mutaciones en el gen *KCNJ10* que codifica para la subunidad Kir4.1 causan el síndrome SeSAME (o síndrome EAST) que se caracteriza por epilepsia, ataxia, sordera neurosensorial, déficit intelectual y trastornos electrolíticos característicos de una tubulopatía que afecta la reabsorción de sodio por NCC (conocida como síndrome de Gitelman)^{36,37,38} y de la que hablaré en el siguiente párrafo.

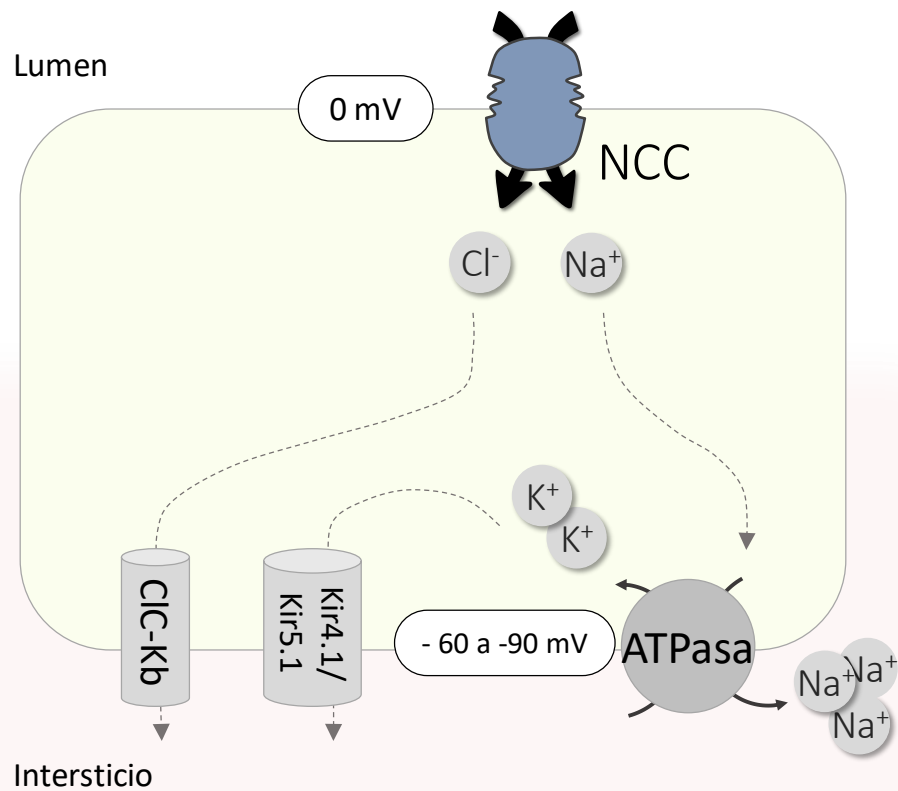


Figura 4. Esquema de la reabsorción de NaCl en el túbulo contorneado distal por NCC.

Como se mencionó arriba, el NCC se encuentra después de la mácula densa, por lo que todo el sodio que se reabsorba a través de este cotransportador no se regula por el sistema de retroalimentación túbuloglomerular e impacta directamente en la excreción final de NaCl y, por ende, en el volumen del líquido intravascular. La evidencia más sólida acerca de la

importancia del NCC en la homeostasis del líquido intravascular, es que las tiazidas (inhibidores específicos del cotransportador) son el pilar del tratamiento de la hipertensión arterial^{29,39}. Al inhibirlo, las tiazidas reducen la reabsorción de NaCl en el túbulo contorneado distal, provocando un aumento en la natriuresis que baja la presión arterial (figura 5).

Además del papel de las tiazidas, existen otras evidencias que resaltan la importancia del NCC; por ejemplo, el hecho de que existen síndromes renales en los que la patogénesis se explica por la disminución de la actividad del cotransportador, como es el caso del síndrome de Gitelman, o por una sobre estimulación de la actividad, como es el caso del síndrome de Gordon (Tabla 1).

El síndrome de Gitelman es una enfermedad monogénica causada por mutaciones en el gen *SLC12A3* que codifica para el NCC⁴⁰. La mayoría de las mutaciones interrumpen su plegamiento, por lo que la proteína se queda atrapada en el retículo endoplásmico y se manda a degradación^{36,41,42}. El síndrome de Gitelman se hereda de manera autosómica recesiva y se caracteriza por hipotensión, hipokalemia, alcalosis metabólica, hipocalciuria e hipomagnesemia⁴³.

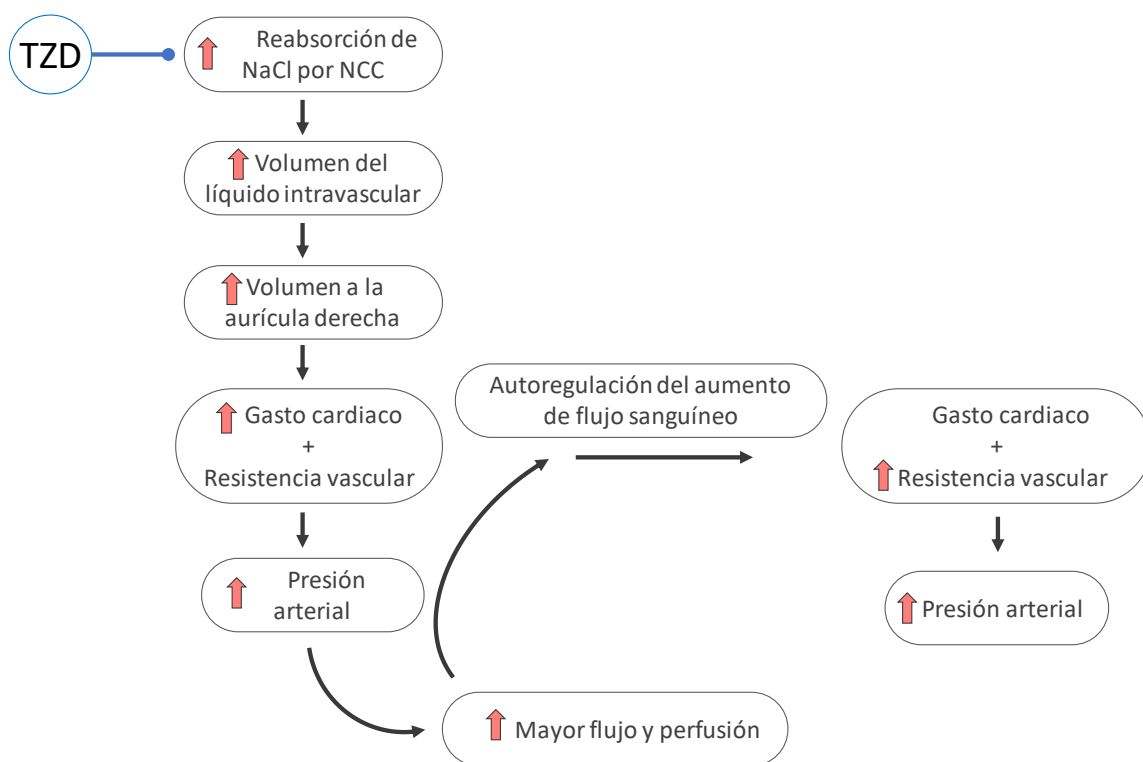


Figura 5. Del NCC a la presión arterial. Diagrama que explica la relación de la reabsorción de NaCl por NCC y la regulación de la presión arterial. Figura modificada de Lifton R.P, Gharavi A.G and Geller D.S. Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell*, 104, (2001).

Al igual que con las tiazidas, la pérdida de función de NCC en este síndrome promueve la pérdida de NaCl, que lleva a hipovolemia y a hipotensión. La hipotensión aumenta la secreción de renina y de otras hormonas secundarias a la activación de la renina como la angiotensina II y la aldosterona. En el conducto colector, la aldosterona actúa a través del receptor de mineralocorticoides aumentando la actividad de ENaC⁴⁴. Dado que la reabsorción de sodio por este canal es electrogénica (ver último párrafo de “Reabsorción de sodio a lo largo de la nefrona”), la negatividad del lumen tubular se compensa con la secreción excesiva de potasio e hidrogeniones. Esto último lleva, por un lado, al desarrollo de hipokalemia y, por otro, contribuye a la alcalosis metabólica[‡]. El TCD1, donde se encuentra NCC, no es un segmento en el que se secrete o se reabsorban cantidades importantes de potasio⁴⁷, por lo que siempre se ha pensado que cuando hay una pérdida de función de NCC lo que lleva a la hipokalemia es la llegada aumentada de sodio al conducto colector y, por lo tanto, hay más actividad de ENaC y más secreción de potasio. Sin embargo, estudios recientes sugieren que además del efecto de aumentar el flujo distal, hay procesos moleculares y estructurales (o morfológicos) de adaptación en el conducto colector, por ejemplo, un aumento en el número de mitocondrias e hipertrofia^{48,49,50}.

La razón de la hipocalciuria y la hipomagnesemia es un tema interesante que sigue en estudio y en espera de una explicación más contundente. En el túbulo contorneado distal el calcio se reabsorbe a través del canal TRPV5 (“*Transient Receptor Potential channel subfamily V member 5*”) y el magnesio a través del canal TRPM6 (“*TRP channel subfamily M member 6*”). Las evidencias sobre el TRPM6 son las siguientes: por un lado, se ha descrito que la expresión del TRPM6 está disminuida en modelos animales del síndrome de Gitelman⁵¹; por otro, se sabe que el voltaje de membrana establecido por la ATPasa de Na⁺-K⁺ es fundamental para la apertura del canal^{36,52}. La posible explicación de la hipomagnesemia en el síndrome de Gitelman es que además de la expresión disminuida del canal, la baja actividad de la ATPasa inhibe su función. De hecho, los pacientes con síndrome SeSAME también tienen hipomagnesemia.

Hay numerosas observaciones que sugieren que la actividad de NCC es inversamente proporcional a la reabsorción de calcio; mientras más NaCl se reabsorbe, menos calcio se reabsorbe y viceversa. La hipocalciuria en el síndrome de Gitelman es una evidencia que respalda esta relación inversa. Otra evidencia es el hecho de que las tiazidas se utilizan como tratamiento para la nefrolitiasis⁵³, ya que al inhibir a NCC, aumenta la reabsorción de calcio

‡ La hipokalemia *per se* también puede contribuir a la alcalosis metabólica a través de diversos mecanismos. Primero, la disminución de potasio en el medio extracelular genera un gradiente que promueve la salida de potasio intracelular y, para compensar la pérdida de cationes intracelulares, la célula mete hidrogeniones¹. Segundo, en el túbulo proximal, la hipokalemia promueve la amoniogénesis y, por lo tanto, promueve la excreción excesiva de ácido⁴⁵. Tercero, la secreción aumentada de potasio en el conducto colector promueve la actividad del intercambiador de K⁺-H⁺ en la membrana apical, que hace que se pierdan todavía más hidrogeniones en la orina⁴⁶.

Enfermedad	Actividad de NCC	Gen mutado	Efecto de la mutación	Características clínicas
Gitelman	↓	<i>SLC12A3</i>	Existen alrededor de 100 mutaciones en el gen que afectan la función del transportador, el plegamiento de la proteína y el tráfico de la proteína a la membrana	Hipotensión o PA normal Hipokalemia Alcalosis metabólica Hipomagnesemia Hipocalciuria
PHAIIB	↑	<i>WNK1</i>	Delección del intrón 1 que resulta en sobreexpresión de WNK1 (L-WNK1 y KS-WNK1)	Hipertensión Hiperkalemia
PHAIIC	↑↑	<i>WNK4</i>	Mutaciones en el dominio ácido que interrumpen la degradación por KLHL3-CUL3 resultando en un aumento de WNK4.	Hipercloremia Acidosis metabólica Hipercalciuria
PHAIID	↑↑↑	<i>KLHL3</i>	Mutaciones que afectan la unión a los sustratos y a CUL3. Esto resulta en una falta de degradación de WNK1 y WNK4	Renina plasmática suprimida Niveles de aldosterona variables pero generalmente se encuentra suprimida por la hiperkalemia
PHAIIE	↑↑↑↑	<i>CUL3</i>	Delección del exón 9 que resulta en una proteína que degrada KLHL3. Mutación de "ganancia de función".	

Tabla 1. Síndromes asociados a la función de NCC. PHAI: Pseudohipoaldosteronismo tipo II.

y esto disminuye la probabilidad de que se precipite más adelante. Los mecanismos que explican esta relación inversa son controversiales. Bindels *et al.* sugieren que las tiazidas aumentan la reabsorción de calcio en los túbulos proximales, basados en resultados que muestran que el efecto hipocalciúrico de la tiazida no se ve afectado en un modelo de ratón *knock-out* para el TRPV5^{51,54}. Sin embargo, los resultados de Lee *et al.* muestran que las tiazidas reducen la hipercalciuria incluso en presencia de suplementos de sal, lo que bloquearía la potenciación de la reabsorción proximal⁵⁵. Adicionalmente, el TRPV5 es más abundante en un modelo de ratón con fenotipo Gitelman y en un modelo *in vitro* de células del túbulo contorneado distal^{56,57}. Será interesante conocer los resultados de futuras investigaciones que puedan ayudar a aclarar estas controversias sobre el manejo del calcio y el sodio en el síndrome de Gitelman.

En resumen, la pérdida de función NCC lleva cambios estructurales y funcionales en el riñón que resultan en hipotensión arterial, hipokalemia, alcalosis metabólica e hipocalciuria.

Algo muy interesante es que el escenario clínico opuesto al síndrome de Gitelman ocurre en el síndrome de Gordon, también conocido como pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAI). Este síndrome se hereda de manera autosómica dominante y se caracteriza por hipertensión, hiperkalemia, acidosis metabólica y, en algunos casos, hipercalciuria⁵⁸. Aunque las mutaciones que causan este síndrome no ocurren en el gen que codifica para NCC, las alteraciones fisiológicas de estos pacientes ocurren por una sobre-activación del cotransportador (Tabla 1). Esto es claro por la manera en la se resuelve el cuadro clínico con

la administración de dosis bajas de tiazidas^{58,59} y porque la ausencia de NCC en un modelo *in vivo* de ratones corrige el fenotipo⁶⁰.

Regulación de la actividad de NCC por una cascada de cinasas

La causa del pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) fue desconocida por muchos años, hasta que en 2001 el grupo de investigadores liderado por el doctor Richard Lifton identificó los genes mutados en esta enfermedad. A partir de este hallazgo, se creó un amplio campo de estudio dirigido a comprender cómo el producto de estos genes modula la actividad de NCC. Existen cuatro genes mutados en esta enfermedad, dos de estos genes codifican para cinasas de la familia *with-no-lysine (K) kinases* (WNKs), WNK1 y WNK4⁶¹, y los otros dos son genes que codifican para las proteínas Kelch-Like 3 (KLHL3) y Cullin 3 (CUL3), que juntas forman un complejo de ubiquitina ligasa (del tipo E3-RING) que degrada a las WNKs⁶² (Tabla 1).

Las WNKs son una familia de cinasas de serina/treonina compuesta, en mamíferos, por cuatro miembros: WNK1, WNK2, WNK3 y WNK4. WNK1 tiene dos isoformas, una larga, llamada L-WNK1, y una corta carente del dominio cinasa, específica de riñón, llamada KS-WNK1 [por kidney-specific]). WNK2 se expresa únicamente en sistema nervioso central y en corazón, mientras que L-WNK1, WNK3 y WNK4 tienen una expresión extensa en diversos tejidos, incluyendo el riñón⁶³. Estas cinasas fueron identificadas por la doctora Melanie Cobb mientras intentaba clonar isoformas de las cinasas MEK del sistema nervioso⁶⁴. En sus investigaciones, la doctora Cobb y su grupo, encontraron una cinasa diferente a lo que estaban buscando. Esta cinasa no fosforilaba a ERK y estructuralmente era única entre el amplio grupo de cinasas que ya se conocían, porque en el subdominio II del dominio cinasa no tenía un residuo de lisina que es fundamental para la unión del ATP y, por lo tanto, para la actividad catalítica de la enzima. Las WNKs tienen esta lisina en el subdominio I en la posición 233 (Lys233)⁶⁵. De ahí que esta nueva cinasa y las isoformas que se encontraron después se llamaran *with-no-lysine (K) kinases*. Las dos isoformas de WNK1 y la WNK4 son las cinasas que han demostrado tener un papel importante en la regulación del transporte de sodio en la nefrona distal, por lo que los párrafos siguientes se dedicarán básicamente a su descripción.

El dominio cinasa de las WNKs está muy conservado entre ellas (comparten 95% de identidad de secuencia⁶⁶) y, en general, el dominio amino terminal es más corto que el carboxilo terminal y ambos están mucho menos conservados que el dominio cinasa (20 a 40%)⁶⁶ (figura 6A). Todas las WNKs tienen una serina (por ejemplo, S382 en L-WNK1) en el asa de

activación dentro del dominio cinasa, cuya fosforilación o autofosforilación es necesaria para la activación^{63,67}.

Los grupos de Cobb y Goldsmith resolvieron la estructura del dominio cinasa de L-WNK1 por cristalografía⁶⁵, lo que permite explicar con un poco más de detalle cómo funciona esta proteína. El dominio cinasa, como el de todas las demás cinasas, está formado por dos lóbulos (o subdominios): un subdominio amino terminal y uno carboxilo terminal conectados entre sí por un asa flexible. El amino terminal está compuesto por seis hebras beta, mientras que el subdominio carboxilo por varias hélices alfa (figura 6B). El sitio activo se encuentra entre estos dos subdominios, por lo que es aquí donde se une el ATP⁶⁵; respecto a este sitio, un estudio reciente describió la purificación de un inhibidor específico de las WNKs que hace un enlace con el residuo Met304 impidiendo que la adenosina del ATP lo haga⁶⁸. El asa flexible, o asa de activación, tiene el motivo DLG (Asp368-Leu369-Gly340) al principio y el motivo APE (Ala391-Pro392-Glu393) al final. El motivo DLG es otra particularidad de las WNKs, ya que en la mayoría de las cinasas la secuencia de este motivo es Asp-Phe-Gly (motivo DFG). El asa de activación adquiere una conformación estable sólo cuando está fosforilada y esta conformación es lo que proporciona estabilidad al dominio cinasa; esta es la razón por la que la fosforilación es necesaria para la activación. Como mencionamos arriba, en el caso de las WNKs, en el asa de activación se fosforila la serina 382 en L-WNK1 y la Ser335 en WNK4 (figura 6). Es interesante mencionar que el ácido aspártico del motivo DLG coordina la unión del Mg²⁺ que a su vez es importante para la interacción con los fosfatos β y γ del ATP. De hecho, la mutación de este residuo produce una WNK catalíticamente inactiva⁶⁹.

Después del dominio cinasa sigue otra región conservada que consiste en un dominio autoinhibidor que interacciona con el sitio activo; hace unos años el grupo de la doctora Cobb identificó dos residuos de fenilalanina (Phe524 y Phe526) en la L-WNK1 de rata que son fundamentales para el efecto inhibidor^{70,71}.

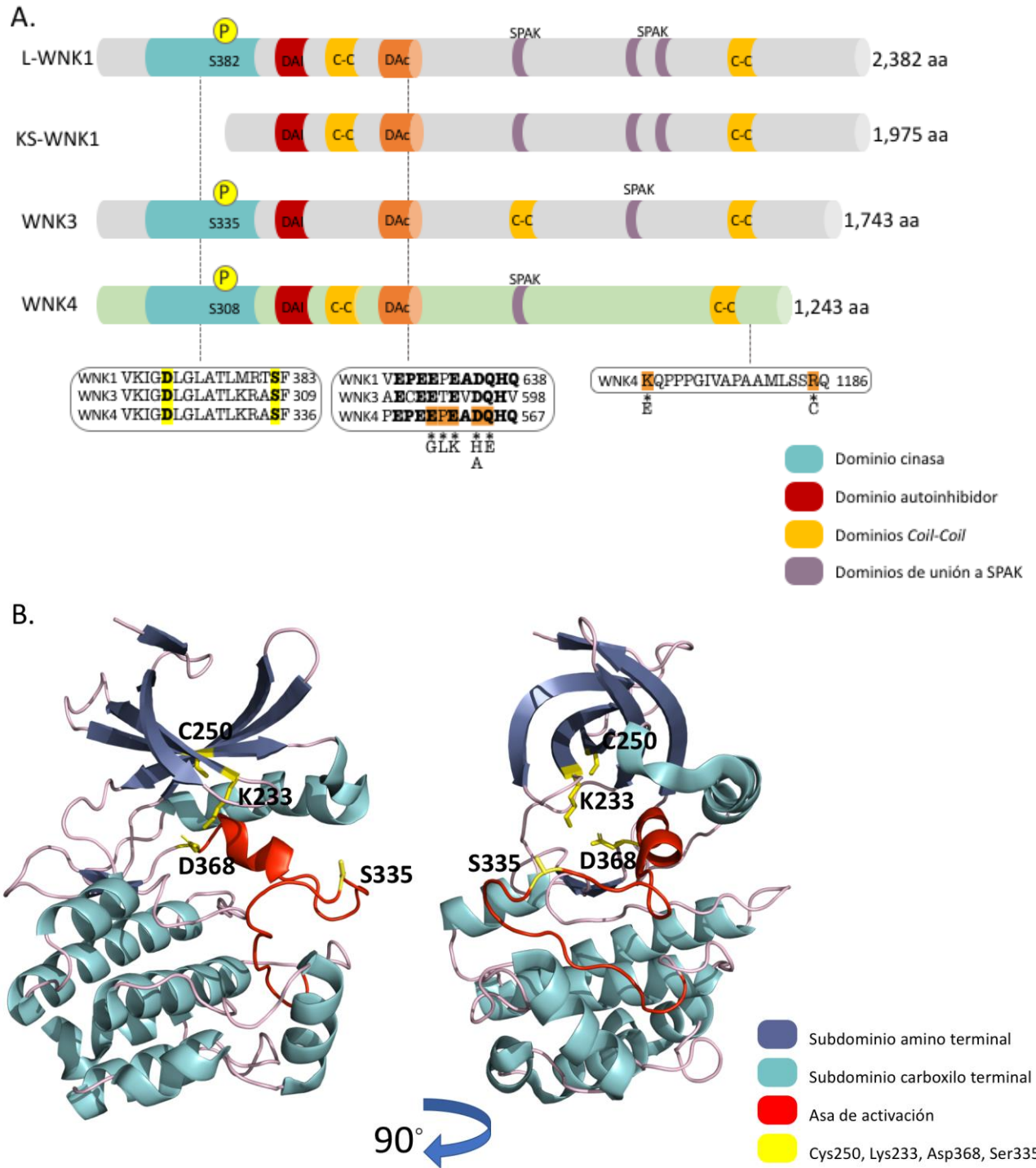


Figura 6. Estructura de las WNKs. A. Representación esquemática de la estructura general de las WNKs. B. Modelo de la estructura del dominio cinasa de L-WNK1 trabajado en PyMOL para MacOSX (PDB 4q2a). Las hélices alfa se muestran en azul claro, las hojas beta en azul oscuro y las asas conectoras en rosa. Figura basada en Min X. et al. Crystal Structure of the Kinase Domain of WNK1, a Kinase that Causes a Hereditary Form of Hypertension. *Structure*, 12, (2004).

Después del dominio autoinhibidor, las WNKs tienen motivos de hélices helicoidales (motivos C-C por el inglés *coil-coil*), en WNK1 y WNK4, el primero se encuentra justo después del dominio autoinhibidor, mientras que en WNK3 se encuentra más hacia el dominio carboxilo terminal. Estos motivos tienen en su estructura primaria residuos con cargas por lo que facilitan las interacciones entre proteínas. En el contexto de las WNKs, se propuso que juegan un papel en la interacción con proteínas río arriba o abajo de la cascada de señalización, e incluso en la formación de hetero u homodímeros. Hace unos años el grupo del doctor Dario Alessi demostró que dentro de los motivos C-C hay dos residuos, H1145 y Q1156, que son fundamentales para la interacción WNK-WNK⁷². Es interesante señalar que las mutantes HQ (mutantes de las WNKs en las que sustituyeron por alaninas, H1145A/Q1156A) no solo dejan de interactuar unas con otras⁷², sino que también reducen su actividad⁷³, sugiriendo que la formación de hetero y homodímeros puede ser importante para la activación. En este sentido, lo que encontraron los autores es que la interacción entre WNKs promueve la transfosforilación de la serina del asa de activación⁷².

Después del dominio autoinhibidor, se encuentra una región conocida como región ácida, que está conservada en todas las WNKs y que consiste en la secuencia EPEEPEADQH (figura 6). La mayoría de las mutaciones en WNK4 que causan el síndrome de Gordon caen en esta región, D564HA, D564A, Q565E, E560G, P561L y E562K^{61,74,75}. Existen otras dos mutaciones, la R1185C y K1169E, que se localiza después del segundo motivo C-C, es decir en el dominio carboxilo terminal. Todavía no se sabe con certeza cuál es el efecto de estas mutaciones, pero se ha especulado que puede tener alguno sobre la localización del NCC en la membrana apical⁷⁶. Por otro lado, se sabe que las mutaciones de la región ácida impiden la interacción con KLHL3, deteniendo la degradación de WNK4.

Se ha demostrado que tanto L-WNK1 como KS-WNK1 y WNK3 pueden actuar como activadores de NCC, mientras que WNK4 puede activarlo o inhibirlo⁷⁷. Sin embargo, río arriba de estas hay otras cinasas. En 2002 Delpire y colaboradores demostraron que dos cinasas, la *Sterile20-related proline-alanine-rich kinase* (SPAK) y *oxidative stress response kinase 1* (OSR1) fosforilan y activan a la familia de cotransportadores a la que pertenece NCC⁷⁸. A pesar de la homología entre SPAK y OSR1 (hasta 96 % en la región catalítica⁷⁹), las evidencias sugieren que SPAK, más que OSR1, se encuentra predominantemente en el túbulo contorneado distal y que las dos cinasas tienen papeles diferentes. Datos *in vivo* de ratones *knock-out* específicos de riñón para OSR1 y SPAK sugieren que SPAK afecta la fosforilación de NCC y que OSR1 tiene un papel más importante en la fosforilación de NKCC2^{80,81,82}.

Un año después el mismo grupo del doctor Delpire demostró que SPAK por sí sola no es suficiente para la activación de los cotransportadores y demostró, mediante un ensayo de

doble híbrido en levadura, que SPAK interactúa con más cinasas, entre ellas WNK4⁸³. También, el grupo del doctor Alessi demostró que para fosforilar y activar a NCC, las WNKs deben interactuar y fosforilar a SPAK quien a su vez fosforila a NCC⁸⁴. En estos mismos años se formó el campo de estudio de las WNKs por el hallazgo del doctor Lifton, por lo que estos dos campos se fusionaron y muchos grupos de investigación se enfocaron en descifrar la cascada de señalización de las WNKs-SPAK. Para cerrar el círculo, por esos años en el laboratorio del doctor Gamba se demostró que la activación de NCC se asocia con fosforilación de las Thr55 y Thr60 del extremo amino terminal, lo que abrió la posibilidad de estudiar la función de NCC en modelos *in vivo* mediante un surrogado que es la determinación de la fosforilación de dichos sitios³⁴.

Hoy sabemos que las WNKs se encuentran río arriba de SPAK^{85,86} (figura 7), y que estas cinasas la fosforilan en dos residuos Thr233 del asa de activación (o *T-loop*) y en otros dos residuos Ser373 y Ser325 del motivo "S"⁸⁷. La fosforilación del *T-loop* es el paso necesario para activar a SPAK, mientras que la fosforilación del motivo "S" es una consecuencia de la activación. Sin embargo, el motivo "S" se ha usado por muchos años como un subrogado de la activación de SPAK. La interacción entre las WNKs y SPAK se da gracias a la presencia de los motivos RFXV en diferentes regiones de las WNKs y de los dominios PF2 en SPAK. La mutación del dominio PF2 de SPAK (mutación L502A) afecta la hidrofobicidad del dominio y por lo tanto la interacción con el RFXV, provocando un fenotipo con las características típicas del síndrome de Gitelman, hipotensión, hipokalemia, hipomagnesemia e hipocalciuria⁸⁸.

Asimismo, SPAK se une al dominio amino terminal de NCC también gracias al motivo RFXV. Al unirse, fosforila al cotransportador en respuesta a diferentes estímulos que modulan la actividad del cotransportador como la concentración intracelular baja de cloruro, y la angiotensina II, entre otros. El NCC se fosforila en tres residuos principales: Thr46, Thr55 y Thr60 y esto se asocia a la activación del cotransportador^{84,34}. Existen dos modelos *in vivo* que demuestran que la fosforilación de NCC en estos residuos por SPAK es esencial para la actividad. El primero es un *knock-out* global^{82,89,90}, y el segundo es un ratón *knock-in* de SPAKT243 (SPAK^{T243A/T243A}) que consiste en la introducción de una mutación sin sentido (T243A) que inactiva el *T-loop* de SPAK, impidiendo la activación de esta por las WNKs⁹¹. En ambos modelos, la fosforilación de NCC se reduce drásticamente, se inactiva el cotransportador y en consecuencia se hipotrofia la primera parte del túbulo contorneado distal. El fenotipo de ambos modelos tiene todas las características del síndrome de Gitelman.

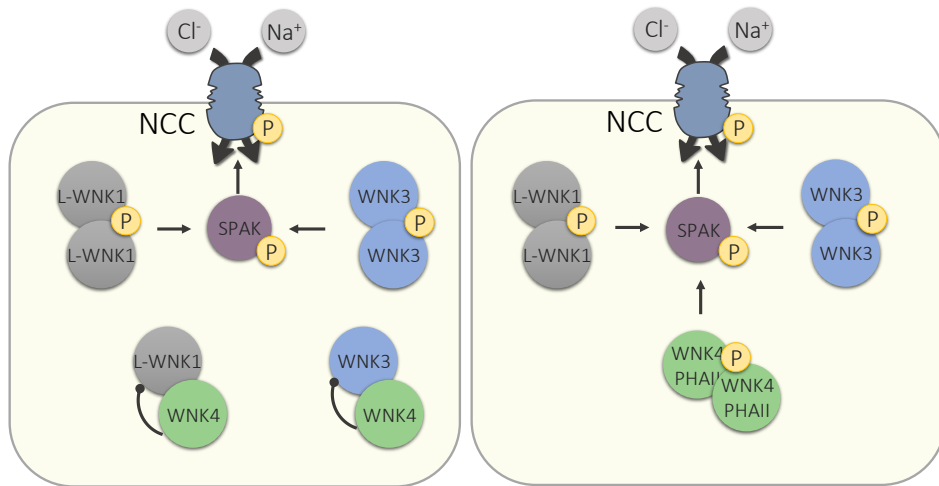


Figura 7. Regulación de NCC por una cascada de cinasas. Las WNKs activan a NCC a través de una cinasa intermedia, la cinasa *Sterile20-related proline-alanine-rich kinase* (SPAK). Las WNKs fosforilan los residuos **Thr233**, **Ser373** y **Ser325** de SPAK para activarla. SPAK a su vez fosforila a NCC en los principales residuos **Thr55** y **Thr60**, resultando en la activación del transportador.

Regulación de las WNKs por degradación: más explicaciones sobre el pseudohipoaldosteronismo tipo II

Las WNKs son reguladas por degradación gracias al complejo de ubiquitina-ligasa formado por Kelch 3 (KLHL3) y Cullin 3 (CUL3) (figura 8). El proceso de ubiquitinación depende de tres componentes: la enzima activadora de ubiquitina E1, la enzima de conjugación E2 y la ligasa de ubiquitina E3^{92,93}. Existen muchos tipos de ligasas E3, pero las ligasas CRLIN-RING (CRL) constituyen la familia más grande. CUL3 actúa como la proteína de andamiaje que reúne a la proteína que reconoce el sustrato con el resto de la maquinaria de ubiquitinación^{94,95}. La proteína que reconoce al sustrato pertenece a la familia de proteínas BTB (*Bric-a-brac*, *Tramtrack and Broad complex*)⁹³. En el riñón, CUL3 se asocia a KLHL3, que es la proteína BTB. CUL3 se expresa en toda la nefrona, con mayor expresión en el túbulo proximal, mientras que KLHL3 se expresa principalmente en la rama ascendente del asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el conducto colector^{62,96,97}. KLHL3 tiene tres principales dominios estructurales. Los dos primeros, BTB y BACK (BTB y COOH-terminal kelch), son responsables de la interacción con CUL3⁹⁵. El tercero, el dominio kelch, está ubicado hacia el extremo carboxilo terminal y consta de seis repeticiones de kelch que forman seis láminas beta en una conformación de propulsor beta que es conocida por ser importante para la unión del sustrato^{62,98}. En general, las mutaciones que causan PHAII en KLHL3 alteran la unión de CUL3 o la unión al sustrato, inhabilitando la capacidad de ubiquitinación del complejo.

Con la demostración de que estas mutaciones provocaban PHAII (que de ahora en adelante llamaré "mutaciones PHAII"), los investigadores del campo se dieron a la tarea de demostrar

que estas proteínas regulan la degradación de las WNKs. Primero, Ohta *et al.*⁹⁹ demostraron que el complejo KLHL3-CUL3 se une y ubiquitina a WNK1, promoviendo su degradación. Además, mostraron que este fenómeno no se produjo en presencia de KLHL3 con mutaciones PHAII y que las mutaciones en el dominio ácido de WNK1, que eran similares a las mutaciones PHAII de WNK4, impiden la interacción KLHL3-WNK1. Este resultado sugirió que las mutaciones en el dominio ácido de WNK4 también podrían evitar la interacción de WNK4 con KLHL3. De hecho, tres grupos independientes demostraron que KLHL3 interactuaba con WNK4 para ubiquitinarla y que este fenómeno se previene en las mutantes PHAII de WNK4 o KLHL3^{98,100,101}.

KLHL3 también es un sustrato de CUL3 y la ubiquitinación de KLHL3 lleva a su degradación^{97,99}. Las mutaciones PHAII de CUL3 dan como resultado la delección del exón 9⁶², produciendo una forma trunca de la proteína (Cul3 Δ 403-459) que se acopla a KLHL3 de manera mucho más eficiente y promueve su degradación por dos vías, la ubiquitina y se degrada por vía del proteasoma; y/o se degrada por una vía lisosomal mediada por autofagia^{97,102}. En ausencia de KLHL3, el complejo de ubiquitina ligasa no puede unir a las WNKs, que entonces no se degradan y se vuelven más abundantes.

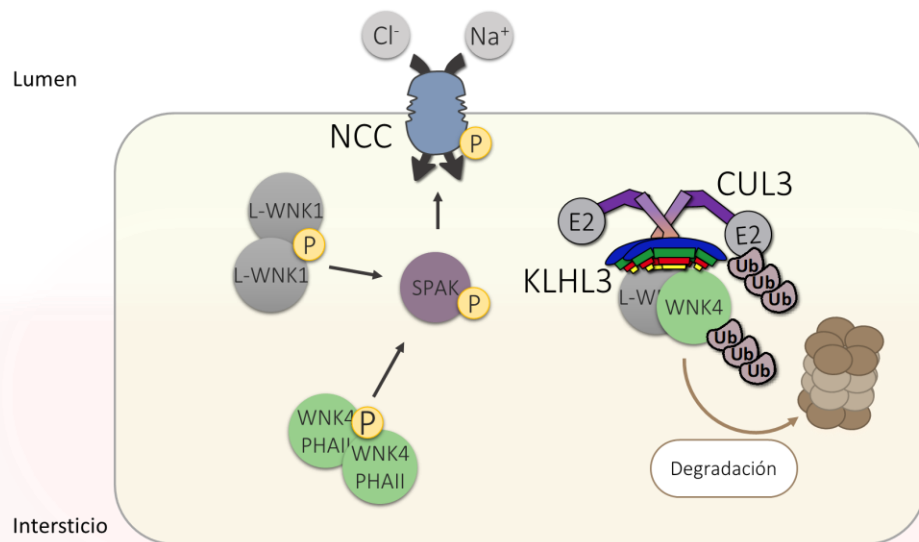


Figura 8. Regulación de WNKs por el complejo KLHL3-CUL3. KLHL3 reconoce la región ácida de las WNKs. A través de los dominios *Bric-a-brac*, *Tramtrack* and *Broad complex* (BTB) KLHL3 se une a CUL3 que trae el resto del complejo de ubiquitina ligasa. Las WNKs ubiquitinadas se mandan a degradación por vía del proteasoma.

En resumen, el PHAII parece ser el resultado de una mayor expresión de WNK4 y WNK1. Para WNK1, las delecciones intrónicas del primer intrón de WNK1 provocan su sobre expresión.

Esto último puede ser atribuible a la eliminación de elementos represivos dentro del primer intrón de WNK1. Para WNK4, el aumento en la abundancia de la proteína se debe a las mutaciones en la región ácida que interrumpen la degradación mediada por el complejo KLHL3-CUL3. Las mutaciones en KLHL3 y CUL3 causan PHAI1 al disminuir la tasa de degradación tanto de WNK1 como de WNK4. La gravedad del fenotipo PHAI1 respalda todas estas observaciones moleculares. Las mutaciones en CUL3 producen los fenotipos más severos y afectan a los pacientes desde edad temprana, seguido en orden de severidad por mutaciones recesivas en KLHL3, dominantes en KLHL3, mutaciones en WNK4 y, finalmente, por mutaciones intrónicas de WNK1, que sin duda producen el cuadro clínico menos grave⁶² (Tabla 1).

Es interesante mencionar que se ha descrito un mecanismo de regulación de NCC por ubiquitinación mediado por una familia distinta, la ligasa NEED4-2 E3 de la familia HECT, en lugar de un complejo de CRL, como KLHL3-CUL3^{103,104}. Sin embargo, también existe evidencia que apoya la interacción directa de KLHL3 con NCC y sugiere que el complejo KLHL3-CUL3 podría modular directamente la integridad del cotransportador⁹⁶. Hasta ahora se requieren más experimentos para explorar esta hipótesis y demostrar que KLHL3 también tiene un papel en la regulación directa de NCC.

Capítulo II. De la regulación molecular a la fisiológica de WNK4

“Biochemistry is the science of life. All our life processes – walking, talking, moving, feeding– are essentially chemical reactions. So biochemistry is actually the chemistry of life, and it’s supremely interesting.”

— Aaron Ciechanover
Interview by Rotem Elizera

WNK4 como reguladora de la actividad de NCC

WNK4 se expresa en el epitelio de diversos órganos, como riñón, colon, testículo, hígado y páncreas. Estos epitelios son polarizados y contienen transportadores que regulan el cloruro intracelular, por lo que siempre se ha propuesto que WNK4 es una cinasa involucrada en este proceso¹⁰⁵. En el riñón, esta cinasa se expresa en los podocitos (células epiteliales especializadas del glomérulo), en la rama ascendente del asa de Henle, en el túbulo contorneado distal y en el conducto colector^{61,106}.

Como vimos en el capítulo anterior, el fenotipo del PHAI se da por una sobre activación del NCC y dado que hoy sabemos que la mayoría de las mutaciones PHAI culminan en el aumento de la cantidad de WNK4 es lógico pensar que WNK4 funcionaría como una cinasa activadora de NCC. Sin embargo, las primeras mutaciones PHAI que se encontraron fueron en WNK4 o L-WNK1 y en ese momento no se sabía que la región ácida era el sitio de unión a KLHL3. Más adelante, cuando se describieron las mutaciones PHAI en KLHL3 y CUL3 se supo que todas estas mutaciones intervenían en la cantidad de WNK4. Durante más de una década el papel de WNK4 como reguladora de la actividad de NCC fue un tema muy controversial debido a que si bien la lógica dictaba que la WNK4 debería ser activadora de NCC, la mayoría de los estudios mostraban que el efecto de la cinasa sobre el transportador era negativo. De hecho, el primer estudio al respecto lo realizó el grupo del doctor Gamba en colaboración con el doctor Lifton¹⁰⁷. Por otro lado, el también esperado efecto positivo de L-WNK1 sobre NCC tampoco pudo verse sino hasta muchos años después cuando la doctora María Chávez-Canales *et al.*²⁹ demostró que la L-WNK1 activa de forma importante al NCC. Entonces, en un principio se pensó que WNK4 era un inhibidor de NCC, y que las mutaciones PHAI en WNK4 reducían el efecto inhibitorio sobre NCC (Figura 7).

WNK4 como inhibidor de NCC

Dos grupos independientes fueron los primeros en demostrar el efecto negativo de WNK4. Primero Wilson *et al.* reportaron que la coexpresión de NCC y WNK4 en ovocitos de *Xenopus laevis* disminuía la actividad de NCC y que este efecto se prevenía usando la forma catalíticamente inactiva de WNK4 (WNK4-D321A) o una WNK4 con una mutación PHAI (WNK4-Q562E)¹⁰⁷. Este resultado sugirió que el efecto inhibidor de WNK4 sobre NCC dependía de la actividad catalítica de la cinasa y que la mutación PHAI previene el efecto inhibidor. Después, Yang *et al.* reportaron observaciones similares al analizar tres mutaciones PHAI: WNK4-E559K, WNK4-D561A y WNK4-Q562E; sin embargo, observaron que solo la mutante WNK4-Q562E prevenía parcialmente el efecto inhibidor de WNK4 sobre NCC¹⁰⁸. Este hallazgo en sí es interesante y empezó a llamar la atención ya que sugirió que no todas las mutaciones PHAI necesariamente alteraban la actividad de WNK4 a nivel de su efecto inhibidor sobre NCC^{108,109}. El efecto inhibidor de WNK4 sobre NCC fue corroborado por un tercer grupo usando ovocitos de *Xenopus laevis*¹¹⁰ y por un cuarto grupo usando células transfectadas de mamífero⁷⁶. En este último estudio, al utilizar células COS-7, Cai *et al.* observaron que la WNK4 silvestre reduce los niveles de NCC en la membrana plasmática, mientras que la WNK4 con mutaciones PHAI no lo hace.

Para complicar más el panorama, el efecto inhibidor de WNK4 también se corroboró utilizando modelos animales. Mu *et al.*¹¹¹ estudiaron un modelo de ratón de hipertensión sensible a la sal, inducida por norepinefrina. Observaron que el ratón desarrolla hipertensión en respuesta a la dieta alta en NaCl por la activación por epinefrina del receptor renal β 2-adrenérgico y que esto induce cambios epigenéticos en el gen del receptor de glucocorticoides, lo que a su vez provoca reducción de la expresión de WNK4 de manera simultánea a un aumento en la expresión y fosforilación de NCC. Aunado a esto, Lalioti *et al.* construyeron un ratón con sobreexpresión de WNK4 silvestre (cuatro genes) lo que resultó en inhibición de NCC con un cuadro similar al síndrome de Gitelman. En resumen, entre 2003 y 2010, los modelos *in vitro* e *in vivo* apuntaron a que WNK4 era un inhibidor de NCC, por lo que era difícil entender la explicación de la enfermedad PHAI (Tabla 2).

WNK4 como activador de NCC

La otra cara de la moneda mostraba que WNK4 es un activador de NCC (Tabla 3). En un estudio con ovocitos de *Xenopus laevis*, Wu *et al.*¹⁰¹ observaron que la coexpresión de NCC y WNK4 aumenta la actividad de NCC. Los autores explican que hay diferencias metodológicas con los estudios previos. La primera es que estos investigadores utilizaron RNAc de WNK4 de humano, mientras que los estudios anteriores utilizaron RNAc de ratón.

La segunda es que utilizaron diferentes condiciones durante los experimentos de captación, aunque esto no se analizó con mayor detalle. También, un estudio en células inmortalizadas de túbulo contorneado distal (células mDCT) mostró, que la ciclosporina, inhibidor de calcineurina, aumenta la expresión de WNK4 y que esta se asocia con un aumento en la expresión de NCC¹¹². En esta misma línea de investigación de los efectos de la ciclosporina sobre NCC algunos resultados en modelos animales también sugieren que WNK4 es un activador de NCC. Hoorn *et al.*¹¹³ demostraron que la hipertensión inducida por tacrolimus se asocia con un aumento de los niveles de expresión de WNK4, junto con un aumento en el nivel de fosforilación de SPAK y NCC.

La evidencia más clara de que WNK4 es una cinasa que activa a NCC se encontró al estudiar los modelos *knock-out* de WNK4. El primer modelo fue descrito por María Castañeda-Bueno y colaboradores. En este trabajo reportaron una dramática disminución en la expresión y fosforilación de NCC, que se correlacionó con un fenotipo estilo Gitelman (hipokalemia y alcalosis metabólica)¹¹⁴. El segundo modelo fue desarrollado por Wakabayashi *et al.*¹⁰⁰ utilizando una estrategia en la que aumentaron el número de alelos de WNK4. Generaron dos líneas transgénicas, una con un bajo número de copias y otra con un alto número de copias de WNK4, y lograron un nivel de expresión de 1.7 y 9.1 veces mayor que los ratones de control, respectivamente. Los autores encontraron que la sobreexpresión de WNK4 silvestre lleva a un aumento en la expresión y fosforilación de SPAK y NCC que se acompaña del desarrollo de un fenotipo estilo PHAI. El hecho de que la ausencia total de WNK4 resulta en la disminución de la expresión de NCC sugiere que esta cinasa también puede ser un activador del cotransportador.

Lo interesante de todas las evidencias que mencioné arriba es que, aunque todos los investigadores utilizaron estrategias y modelos experimentales similares, los resultados reportados son contradictorios (Tablas 2 y 3). Esto último sugiere que ambos estados, WNK4 como inhibidor y como activador, podrían coexistir y quizá uno predomina sobre otro dependiendo del contexto fisiológico. Esto a su vez permite plantear la hipótesis de que WNK4 funciona como un interruptor molecular, activando o inhibiendo al NCC dependiendo de las necesidades fisiológicas. La pregunta que nació a partir de esta hipótesis es ¿qué y cómo se modula el efecto de WNK4?

Esta hipótesis que propone a WNK4 como un interruptor molecular empezaba a formarse ya desde hace unos años cuando el grupo de investigación liderado por el doctor Gerardo Gamba demostró que el efecto inhibitorio de WNK4 sobre NCC puede prevenirse por la angiotensina II¹¹⁵. Curiosamente, la angiotensina II solo aumenta la actividad de NCC cuando en los ovocitos se coexpresa WNK4. Este hallazgo sugiere que el efecto de la angiotensina II

sobre NCC depende de WNK4 y que aun cuando esta es un inhibidor en condiciones basales, si el contexto fisiológico cambia el interruptor molecular, es esta misma cinasa la que activa a NCC. Esto se demostró inicialmente *in vitro* en ovocitos de *Xenopus laevis*¹¹⁵ y posteriormente en el modelo *in vivo*¹¹⁴. Estas evidencias responden a la pregunta de qué puede modular el efecto de WNK4. Sin embargo, la pregunta de cómo se modula seguía sin ser estudiada.

Modelo	Clona o estrategia	Tipo de análisis de NCC	Efecto sobre NCC	Referencia
ovocito <i>X. laevis</i>	mWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad) y expresión en la membrana	↓↓	Wilson FH, et al. Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The NaCl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. <i>ProcNatlAcadSciUSA</i> , 100, (2003).
ovocito <i>X. laevis</i>	mWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad) y expresión en la membrana	↓↓	Yang CL, et al. WNK kinases regulate thiazide-sensitive NaCl cotransport. <i>JClinInvest</i> , 111, (2003).
ovocito <i>X. laevis</i>	WNK4-WT (fragmentos)	Ensayo funcional (actividad)	↓↓	Yang CL, et al. Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. <i>JClinInvest</i> , 115, (2005).
ovocito <i>X. laevis</i>	WNK4-WT	Ensayo funcional (actividad)	↓↓	Golbang AP, et al. Regulation of the Expression of the NaCl cotransporter by WNK4 and WNK1: evidence that accelerated dynamin-dependent endocytosis is not involved. <i>AmJPhysiolRenalPhysiol</i> , 291, (2006).
Células M1	hWNK4-WT	Expresión en la membrana	↓↓	Cai H, et al. WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. <i>Kidney International</i> , 69, (2006).
Células COS-7	hWNK4-WT	Expresión en la membrana	↓↓	
Ratón BAC	WNK4-WT sobreexpresión	Expresión en riñón completo/parámetros fisiológicos	↓↓↓↓ Fenotipo Gitelman	Lalioti MD, et al. Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. <i>NatGenet</i> , 38, (2006).
	WNK4-Q562E sobreexpresión	Expresión en riñón completo/parámetros fisiológicos	↑↑↑↑ Fenotipo PHAI	
ovocito <i>X. laevis</i>	WNK4 fragmento (445-1222)	Ensayo funcional (actividad)	↓↓	Yang CL, et al. The thiazide-sensitive NaCl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. <i>JClinInvest</i> , 117, (2007).
ovocito <i>X. laevis</i>	mWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad)	↓↓	San Cristobal P, et al. WNK3 and WNK4 Amino Terminal Domain Defines Their Effect on the Renal NaCl Cotransporter. <i>AmJPhysiolRenalPhysiol</i> , 295, (2008).
ovocito <i>X. laevis</i>	mWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad)	↓↓ Cambia en presencia de angiotensina II	San Cristobal P, et al. Angiotensin II signaling increases activity of the renal NaCl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. <i>ProcNatlAcadSciUSA</i> , 106, (2009).
ovocito <i>X. laevis</i>	mWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad)	↓↓	Glover M, et al. The activity of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is

				regulated by protein phosphatase PP4. <i>CanJPhysiol Pharmacol</i> ,88, (2010).
ovocito <i>X. laevis</i>	Variante de la hWNK4	Ensayo funcional (actividad)	↓↓	Glover M, et al. Renal and brain isoforms of WNK3 have opposite effects on NCCT expression. <i>JAmSocNephrol</i> ,20, (2009).
Células COS-7	WNK4-WT	Expresión en la membrana y vida media	↓↓	Zhou B, et al. WNK4 Enhances the Degradation of NCC through a Sortilin-Mediated Lysosomal Pathway. <i>JAmSocNephrol</i> ,21,(2010).
Células mDCT15 (de TCD)	Knock-down de WNK4 (con shRNA)	Ensayo funcional (actividad) y expresión en la membrana	↑↑	Ko B, et al. A New Model of the Distal Convoluted Tubule. <i>AmJPhysiolRenalPhysiol</i> ,303,(2012).
Ratones WT	Isoproterenol-induced decrease of WNK4	Expresión y fosforilación	↑↑	Mu S, et al. Epigenetic modulation of the renal b-adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. <i>NatMed</i> ,17,(2011).
Células mDCT15 (de TCD)	Sobreexpresión de WNK4-WT	Expresión	↓↓	Zhou B, et al. WNK4 inhibits NCC protein expression through MAPK ERK1/2 signaling pathway. <i>AmJPhysiolRenalPhysiol</i> ,302,(2012).
Células mDCT15 (de TCD)	Knock-down de WNK4 (con shRNA)	Expresión	↑↑	
Ratones WT y Células mDCT15 (de TCD)	Aumento de la expresión de WNK4 al bloquear Per1	mRNA	↓↓	Richards J, et al. A role for the circadian clock protein Per1 in the regulation of the NaCl co-transporter and the with-no-lysine kinase cascade in mouse distal convoluted tubule cells. <i>JBiolChem</i> ,289,(2014).
ovocito <i>X. laevis</i>	mWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad) y fosforilación	↓↓	Chávez-Canales M, et al. WNK-SPAK-NCC Cascade Revisited: WNK1 Stimulates the Activity of the Na-Cl Cotransporter via SPAK, an Effect Antagonized by WNK4. <i>Hypertension</i> ,64, (2014).
Células mDCT15 (de TCD)	Knock-down de WNK4 (con shRNA)	Ensayo funcional (actividad) y expresión en la membrana	↑↑	Ko B, et al. Mechanisms of Angiotensin II Stimulation of NCC Are Time-Dependent in mDCT15 Cells. <i>AmJPhysiolRenalPhysiol</i> ,(2015)

Tabla 2. Evidencia del efecto negativo de WNK4 sobre NCC. mWNK4: WNK4 de ratón, hWNK4: WNK4 de humano, WNK4-WT: WNK4 silvestre, WNK4-Q562E: WNK4 con mutación que causa Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII). shRNA: short-hairpin RNA. TCD: túbulo contorneado distal. mRNA: RNA mensajero.

Modelo	Clona o estrategia	Tipo de análisis de NCC	Efecto sobre NCC	Referencia
ovocito <i>X. laevis</i>	mWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad)	↑↑ Activa en presencia de angiotensina II	San Cristobal P, et al. Angiotensin II signaling increases activity of the renal NaCl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. <i>ProcNatlAcadSciUSA</i> ,106,(2009).
ovocito <i>X. laevis</i>	hWNK4-WT	Ensayo funcional (actividad)	↑↑	Wu G & Peng JB. Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation. <i>FEBS letters</i> 587, (2013).
Ratón BAC	WNK4-WT sobreexpresión	Expresión en riñón completo/parámetros fisiológicos y fosforilación	↑↑↑	Wakabayashi M, et al. Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. <i>Cell reports</i> ,3,(2013).
Células mDCT15 (de TCD)	WNK4-WT sobreexpresión con ciclosporina	Expresión y fosforilación	↑↑	Melnikov S, et al. Cyclosporine metabolic side effects: association with the WNK4 system. <i>EurJClinInvest</i> (2011).
Ratones WT	WNK4-WT sobreexpresión con tacrolimus	Expresión y fosforilación	↑↑	Hoorn EJ, et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. <i>NatMed</i> 17, (2011).
Ratón <i>knock-out</i> de WNK4	<i>Knock-out</i> global de WNK4	Expresión y fosforilación, parámetros fisiológicos, respuesta a dieta baja en sodio y a infusión de angiotensina II	↓↓ Fenotipo Gitelman	Castaneda-Bueno M, et al. Activation of the renal NaCl cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. <i>ProcNatlAcadSciUSA</i> ,109, (2012).
Ratón con WNK4 hipomórfica	Deleción del exón 7 de WNK4	Expresión y fosforilación, parámetros fisiológicos	↓↓ Fenotipo Gitelman	Ohta A, et al. Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of NaCl cotransporter, increases Na excretion, and lowers blood pressure. <i>HumMolGenet</i> ,18, (2009).

Tabla 3. Evidencia del efecto positivo de WNK4 sobre NCC. mWNK4: WNK4 de ratón, hWNK4: WNK4 de humano, WNK4-WT: WNK4 silvestre, TCD: túbulo contorneado distal.

El cloruro como regulador de la actividad de WNK4

El cloruro es el anión acompañante del sodio, por lo que está íntimamente relacionado con su transporte a lo largo de la nefrona y también se encuentra implicado en la regulación del volumen intravascular y la presión arterial. Además, es un ion importante para varios procesos celulares como la homeostasis del volumen celular¹¹⁶, la regulación del transporte iónico celular y, en células más especializadas como en las neuronas, el cloruro es fundamental para la excitabilidad neuronal¹¹⁷. Dependiendo de la naturaleza del estímulo, la regulación de la concentración intracelular de cloruro está mediada por diferentes familias de proteínas como cotransportadores o canales. Por ejemplo, se sabe que los cambios osmóticos activan a la familia de cotransportadores SLC12A, a la que pertenece NCC. Esta familia transporta sodio, potasio y cloruro a través de las membranas plasmáticas de manera electroneutra. En esta familia se distinguen dos ramas. La primera está compuesta por tres miembros, los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ 1 y 2 (NKCC1 y NKCC2) y el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (NCC). Estos tres cotransportadores transportan sodio acoplado a cloruro hacia el medio intracelular y se activan por fosforilación. La segunda rama está compuesta por cuatro miembros, los cotransportadores de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ (KCC1 a KCC4), que transportan potasio acoplado a cloruro hacia el medio extracelular y se inhiben por fosforilación^{33,118,119}.

Los cambios en la concentración intracelular de cloruro, específicamente la concentración baja, se asocian con la fosforilación y activación de la cascada de señalización que involucra a SPAK. Dowd y Forbush fueron los primeros en demostrar que SPAK media la activación de NKCC1 en respuesta a la depleción de cloruro intracelular¹²⁰. Los autores también demostraron que la activación del cotransportador se relaciona con la fosforilación de los residuos Thr184, Thr189 y Thr202 del dominio amino terminal del NKCC1 de tiburón. Estos sitios están conservados tanto en NKCC2 como en NCC, y corresponden a los residuos Thr55, Thr60 y Ser73 en el NCC de humano, que se han reportado como sitios fundamentales en la activación del cotransportador por WNKs mediada por diferentes estímulos que van desde el cloruro y la osmolaridad hasta la angiotensina II^{86,34,87,114,121,122}. Ahora bien, al fosforilar a los miembros de la familia SLC12 se activa la entrada al mismo tiempo que se inhibe la salida de cloruro, resultando en un aumento en su concentración intracelular. Por el contrario, si el cloruro intracelular está alto, los cotransportadores se desfosforilan, activando solo a los KCCs y con esto promoviendo la salida de cloruro¹²³(figura 9). La manera en la que este mecanismo regulador del cloruro se desenvuelve, hace razonable proponer que existen cinasas sensoras de cloruro que fosforilan a estos transportadores para mantener el equilibrio iónico del medio intracelular.

El papel que cumplen las WNKs en la regulación de transportadores electroneutros, las hace excelentes candidatas para ser las sensoras de cloruro. De hecho, ya existen evidencias en ovocitos de *Xenopus laevis* y en células HEK-293 que demuestran que la actividad de una cinasa de la familia, la WNK3, se modifica dependiendo del cloruro intracelular^{124,125,126}.

Durante el transcurso del proyecto de investigación, se demostró en un estudio por cristalografía que el dominio cinasa de L-WNK1 tiene un sitio de unión a cloruro¹¹⁷. Este sitio de unión se encuentra en el motivo DLG del asa de activación. Este motivo DLG es una particularidad del dominio cinasa de las WNKs, ya que mientras que el resto de las cinasas tienen un residuo de fenilalanina en este motivo (motivo DFG), las WNKs tienen un residuo de leucina (Leu369). El reemplazo de este residuo le permite a las WNKs formar un puente de hidrógeno entre el cloruro y la Leu369 principalmente, aunque también establece interacciones los residuos Phe283, Leu299 y Leu371 (que es parte del asa de activación) (Figura 10 A y B). La unión del cloruro estabiliza a la proteína en una conformación inactiva e impide que la serina (Ser382) del asa de activación se fosforile. Como habíamos mencionado anteriormente, la fosforilación de esta serina es fundamental para la activación de la cinasa. En este sentido los autores también demostraron mediante ensayos funcionales *in vitro* que

A.

	[Cl _i ⁻] baja	[Cl _i ⁻] alta
NKCC 1 y 2	P Activan	Inhiben
NCC	P Activa	Inhibe
KCC 1 a 4	P Inhiben	Activan
Resultado	Entra cloruro	Sale cloruro

B.

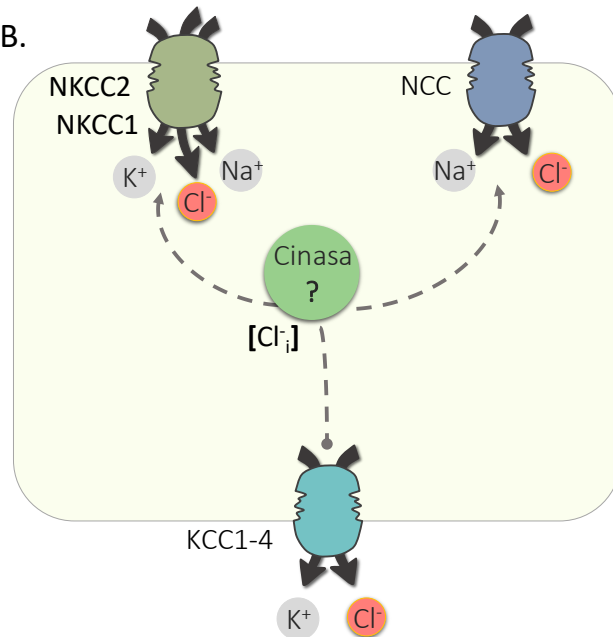


Figura 9. Función de la familia de cotransportadores SLC12A. A. Tabla que explica el efecto de la fosforilación de los cotransportadores. B. La concentración intracelular de cloruro baja se asocia a la fosforilación de los cotransportadores, el NKCC1 y 2 y NCC se activan por fosforilación, mientras que los KCCs (KCC1 a 4) se inhiben. Al contrario, la desfosforilación inhibe a los NKCC y a NCC, pero activa a los KCCs, es decir, activa la salida de cloruro. Esto ha llevado a plantear que existe una cinasa capaz de detectar el cloruro.

la autofosforilación de L-WNK1 se inhibe en presencia de cloruro con una IC_{50} alrededor de 20 mM. Más aún, al mutar este residuo de leucina por fenilalanina, el cloruro ya no se une y se pierde la inhibición de la autofosforilación.

Ahora bien, estas leucinas del motivo DLG se encuentran altamente conservadas en todas las WNKs⁶⁵(figura 6), sugiriendo que el mecanismo mediante el que la L-WNK1 detecta la concentración intracelular de cloruro es común entre estas cinasas. Esto nos llevó a pensar que el modelo de regulación de la actividad de las WNKs por cloruro podría explicar el efecto dual de WNK4 en los diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Por ello, planteamos el objetivo de demostrar que WNK4 también es una cinasa sensor de cloruro y que modula su efecto activador o inhibidor hacia NCC dependiendo de la concentración intracelular del anión.

Las implicaciones que este nuevo modelo de regulación de WNK4 pueden tener sobre la regulación de NCC por diversos estímulos fisiológicos son interesantes, ya que podría acercarnos al entendimiento de los mecanismos moleculares de los reguladores del transporte de sodio en la presión arterial.

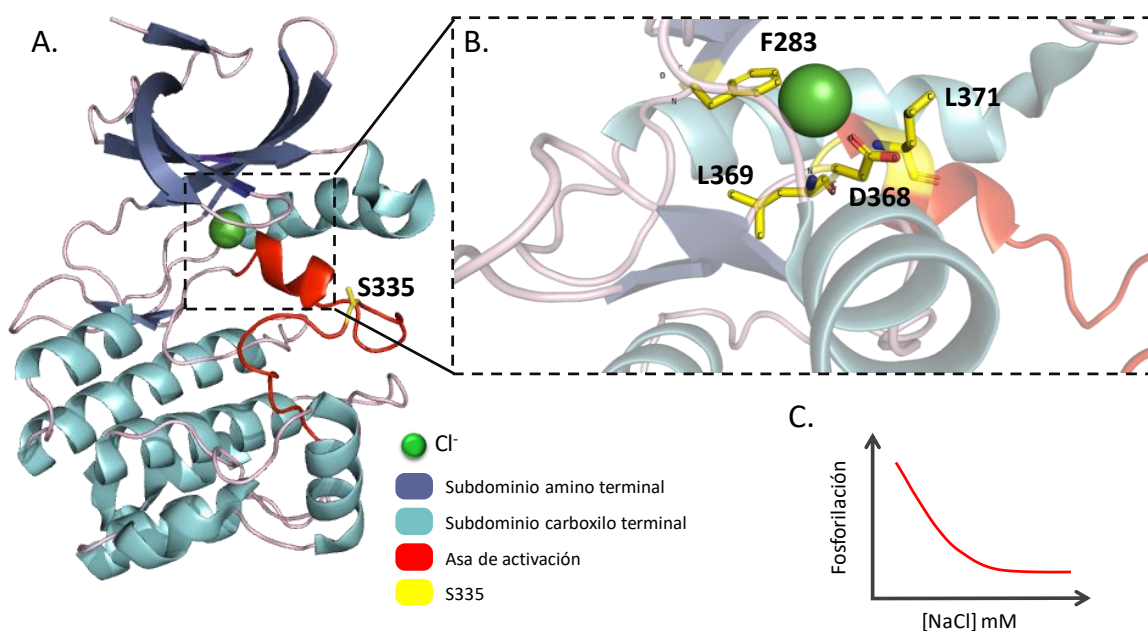


Figura 10. Sitio de unión a cloruro en el dominio cinasa de L-WNK1. A. Modelo de la estructura del dominio cinasa de L-WNK1 con un ión de cloruro (verde) trabajado en PyMOL para MacOSX (PDB 3FPQ). B. El recuadro muestra un acercamiento al sitio de unión a cloruro. Se resaltan los principales residuos que hacen interacción con el ión. C. Gráfica construida con datos hipotéticos del efecto que tiene la concentración de cloruro sobre la fosforilación del asa de activación de las WNKs. Figura basada en Piali, A.T *et al.* Chloride sensing by WNK1 Involves Inhibition of Autophosphorylation. *Sci Signal*, 7, (2014).

Planteamiento del problema

El papel de WNK4 sobre la actividad de NCC es controversial. Hay reportes utilizando las mismas estrategias experimentales que muestran que la cinasa activa e inhibe a NCC, lo que sugiere que los efectos inhibidores y activadores de WNK4 pueden coexistir y quizá modularse de acuerdo con las necesidades fisiológicas del organismo. En este sentido se sabe que la disminución de la concentración intracelular de cloruro se asocia con una mayor actividad y fosforilación de NCC³⁴ mediada por SPAK⁸⁴, que a su vez está modulada por las WNKs. Por lo tanto, es posible que la concentración intracelular de cloruro pudiera modular el efecto de WNK4 hacia NCC, y explicar el efecto dual de la cinasa. La propuesta fue que a una concentración elevada de cloruro la cinasa permanecerá inactiva, al bloquearse la activación de la cascada SPAK-NCC, mientras que, en las concentraciones bajas de cloruro, la WNK4 se fosforila y con esto activa la vía SPAK-NCC, incrementando la actividad del cotransportador.

Hipótesis

La cinasa WNK4 es un sensor de cloruro y actúa como inhibidor o activador del NCC dependiendo de la concentración intracelular de cloruro ($[Cl^-]_i$).

Objetivo general

Determinar si la actividad de WNK4 sobre NCC es sensible a los cambios en la $[Cl^-]_i$. Así como determinar si el sitio de unión a cloruro caracterizado en L-WNK1 existe en WNK4.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el efecto dual de WNK4 sobre la actividad y la fosforilación de NCC en un sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* con el fin de establecer un modelo que permita estudiar la hipótesis.
2. Analizar la relación entre la concentración de cloruro intracelular y la actividad dual de WNK4 sobre NCC utilizando diferentes maniobras que depletan a la célula de cloruro para demostrar si el cloruro puede modular a esta cinasa.
3. Estudiar en ensayos funcionales el efecto de mutaciones puntuales en las leucinas que forman el sitio de unión al cloruro en WNK4 para estudiar la posibilidad de que la unión de este ion module la actividad de la cinasa.
4. Evaluar el efecto de las mutaciones en las leucinas sobre la fosforilación del NCC para corroborar la relación con la actividad dual de WNK4.

Resultados

Los resultados de la caracterización de la actividad dual de WNK4 sobre NCC en diferentes concentraciones intracelulares de cloruro, así como la caracterización del efecto de mutaciones puntuales en el sitio de unión putativo a cloruro fueron publicados en un artículo original en 2015, que contiene los resultados en detalle correspondientes a esta parte de la investigación. El artículo se encuentra al final de este capítulo y la referencia es la siguiente:

The effect of WNK4 on the Na⁺-Cl⁻ Cotransporter is Modulated by Intracellular Chloride. Silvana Bazúa-Valenti, María Chávez-Canales, Lorena Rojas-Vega, Xochiquetzal González-Rodríguez, Norma Vázquez, Alejandro Rodríguez-Gama, Eduardo R. Argáiz, Zesergio Melo, Consuelo Plata, David H. Ellison, Jesús García-Valdés, Juliette Hadchouel and Gerardo Gamba. *J Am Soc Nephrol*, 2015; 26(8):1781-6.

Resumen de resultados

A continuación, presento un resumen de los resultados⁵:

Para probar nuestra hipótesis, primero evaluamos el efecto de la depleción de cloruro intracelular con estrés hipotónico bajo en cloruro (EHBC) sobre la actividad de WNK4. En condiciones basales WNK4 no tiene ningún efecto, o bien inhibe a NCC. Como se ha reportado en otros estudios, el EHBC aumentó la actividad de NCC medida por la captación de ²²Na⁺ (sodio radiactivo) sensible a tiazidas³⁴, pero este efecto fue hasta tres veces mayor en presencia de WNK4 (Figura 1 A y B). La maniobra del EHBC redujo la concentración intracelular de cloruro de 59 mM a 35 mM, en ovocitos inyectados con RNAs complementarios de NCC y WNK4, lo que representa una reducción de 30% a 40% de la concentración basal de cloruro (Figura 1 C). Resulta interesante que una hora de EHBC no fue suficiente para activar a NCC por sí solo, y únicamente con la expresión de WNK4 se logra un aumento significativo (Figura 1 D). Esto sugiere que la presencia de WNK4 aceleró el efecto de la depleción de cloruro sobre NCC, o quizá hace a la célula más sensible a la concentración de cloruro. Debido a que el EHBC puede tener varios efectos sobre los ovocitos, utilizamos una segunda maniobra para depletar a los ovocitos de cloruro. Esto fue mediante la coexpresión del cotransportador SLC26A9, que en ausencia de cloruro extracelular actúa como vía de salida del cloruro¹²⁷. En estas condiciones, el EHBC por solo 30 minutos redujo significativamente la concentración intracelular de cloruro en ovocitos que expresaban el SLC26A9 y aún más en los que expresaban el SLC26A9 con WNK4 (Figura 1 E). En consecuencia, la actividad de NCC aumentó al decrecer la concentración de cloruro y, otra vez, este efecto se potenció drásticamente por la presencia WNK4 (Figura 1 F).

⁵ El número de la figura se refiere al número de la figura del artículo que se encuentra al final del capítulo.

Piala *et al.* identificaron dos residuos de leucina (L369 y L371), conservados entre las WNKs, que fungen como el sitio de unión de cloruro¹¹⁷. Para probar si estos residuos tienen la misma función en WNK4, reemplazamos los residuos homólogos (L322 y L324 de WNK4 humana) por fenilalaninas generando tres principales mutantes: WNK4-L322F, WNK4-L324F y la doble mutante WNK4-LL-FF. La mutante WNK4-LL-FF promueve una notable activación de NCC en condiciones de basales, sin embargo, el efecto de la mutante WNK4-L322F es mucho mayor, similar a lo que se observa con la WNK4 silvestre en el EHBC (Figura 2 B). Corroboramos el efecto de la mutante WNK4-L322F sobre NCC estudiando la fosforilación del cotransportador por *western blot* utilizando un fosfoanticuerpo contra las Thr45, 50 y 55. Encontramos que en condiciones basales la mutante fosforila a NCC, mientras que la WNK4 silvestre no tiene efecto sobre la fosforilación del NCC (Figura 1 C).

Para estudiar el efecto del cloruro sobre la actividad de WNK4 analizamos la fosforilación del asa de activación de la cinasa por *western blot*. WNK4 silvestre no está fosforilada en condiciones basales, pero la depleción de cloruro promueve la fosforilación de la Ser335 (Figura 3 A y B). Como controles, estudiamos otras WNKs. El nivel de fosforilación de L-WNK1 en la Ser382 también aumentó, mientras que fue similar en ambas condiciones para la Ser308 de WNK3 (Figura 3 D y E). Como era de esperarse, la mutante WNK4-L322F se encuentra fosforilada aún en condiciones basales incluso con concentraciones normales de cloruro (Figura 3 D y E). Esto último sugiere que la sustitución de la Leu322 por fenilalanina convierte a WNK4 en una cinasa constitutivamente fosforilada y activadora de NCC. La eliminación de la actividad catalítica de la cinasa (mutación D321A) (Figura 2 B) y del sitio de fosforilación (mutación S335A) (Figura 3 F) elimina el efecto activador de la mutante WNK4-L322F.

Resultados no publicados

Actividad de la mutante WNK4-L322F en células HEK-293

El modelo de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* es, sin duda, un excelente modelo para estudiar la expresión funcional de los cotransportadores. Sin embargo, no deja de ser un modelo *in vitro* alejado de las características funcionales de una célula de mamífero. Por esta razón quisimos complementar los resultados anteriores con experimentos realizados en células inmortalizadas de riñón humano. Hicimos las mutantes de WNK4: WNK4-L322F, WNK4-L324F, la doble mutante WNK4-LL-FF y la mutante catalíticamente inactiva WNK4-LL-FF-DA, en un vector de expresión para células de mamífero y transfectamos células HEK-293. Encontramos el mismo efecto sobre la fosforilación de NCC. La mutante WNK4-L322F promueve la fosforilación de NCC aún en condiciones control,

con concentraciones altas de cloruro, mientras que la WNK4 silvestre y la mutante catalíticamente inactiva no lo hacen (figura 11). Estos resultados confirman que en un modelo celular de riñón de humano la mutante L322F también se encuentra constitutivamente activa y por lo tanto activa a NCC.

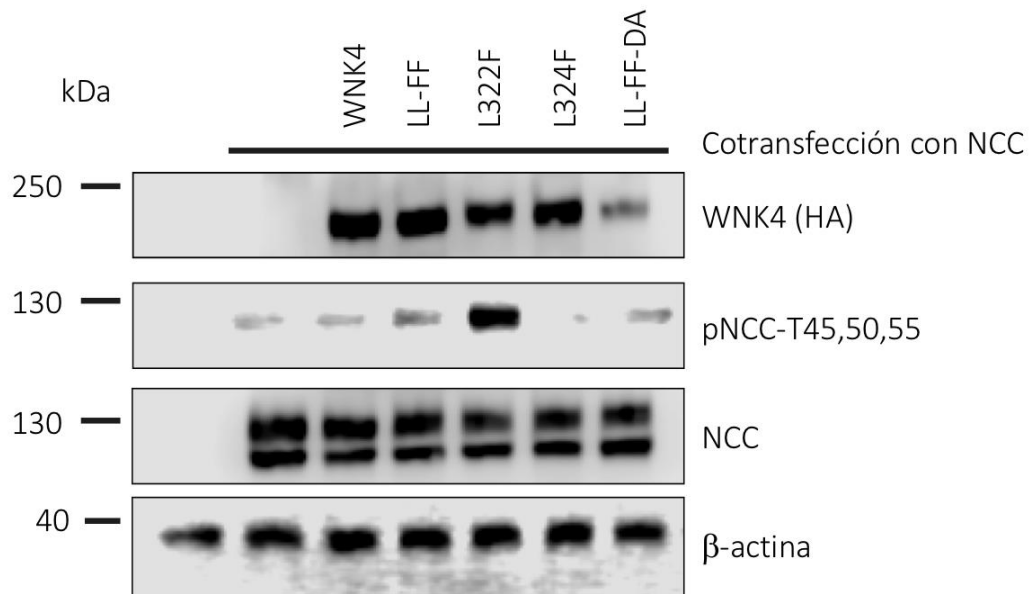


Figura 11. La mutante WNK4-L322F que no se puede unir a cloruro fosforila a NCC en condiciones basales en un modelo celular. *Western blot* de células HEK293 que se cotransfectaron con DNA de NCC y WNK4 humana silvestre (WNK4) o con las diversas mutantes del sitio de unión a cloruro: WNK4-L322F, WNK4-L322F-L324F (WNK4 LL-FF), WNK4-L324F y WNK4-L322F-L324F-D321A (WNK4 LL-FF-DA). Este experimento se realizó en condiciones control (medio isotónico). La mutante WNK4-L322F fosforila a NCC en condiciones basales a diferencia de la silvestre que se encuentra inactiva por la unión del cloruro.

Conclusiones

- i) WNK4 se vuelve una cinasa activadora de NCC cuando la célula se expone a maniobras que disminuyen la $[Cl^-]_i$.
- ii) El efecto activador de WNK4 sobre NCC depende de la actividad catalítica de la cinasa.
- iii) El remplazo de la Leu322 por una fenilalanina inhabilita el sitio de unión al cloruro volviendo a WNK4 una cinasa constitutivamente activadora de NCC.
- iv) La fosforilación de la Ser335 del asa de activación de WNK4 está apagada en condiciones control donde la concentración de cloruro se encuentra alrededor de 60 mM pero se activa (se fosforila) con la depleción de cloruro. La mutante WNK4-L322F está fosforilada aún en condiciones control.
- v) La fosforilación del asa de activación de L-WNK1 se comporta muy parecido a WNK4, mientras que WNK3 está fosforilada aún en condiciones control, sugiriendo que no es sensible al cloruro. Estos resultados revelan la posibilidad de que cada WNK tenga distinta sensibilidad al cloruro.
- vi) Los resultados sugieren que WNK4 también es una cinasa sensible al cloruro, corroborando lo que reportaron Pinal *et al.* En presencia de cloruro la fosforilación del asa de activación de WNK4 también se encuentra inhibida. Cuando se reduce la concentración intracelular de cloruro, el sitio de unión se libera, permitiendo la fosforilación de la Ser335 y la activación concomitante de la cinasa. Estos resultados explican por qué la cinasa se activa y promueve la fosforilación de NCC cuando la célula se depleta de cloruro.

Discusión y perspectivas

Los efectos de WNK4 sobre la actividad de NCC es un aspecto controversial. Hay modelos *in vitro* que respaldan, tanto un efecto activador, como un efecto inhibidor de WNK4 hacia NCC. Incluso hay modelos animales que apoyan las observaciones *in vitro*. Por ejemplo, la sobreexpresión de WNK4 en ratones transgénicos resulta en menor expresión y fosforilación de NCC^{100,114}. Esta actividad dual permite plantear a WNK4 una cinasa con actividad dual sobre NCC o como un interruptor molecular o y, entonces, pensar que deben existir mecanismos reguladores que utilizan este “interruptor”. Los datos que mostramos en este trabajo indican que WNK4 es una cinasa sensible a cloruro, lo que podría explicar el efecto dual sobre NCC. Lo que proponemos es lo siguiente: cuando la concentración de cloruro es alta, este ion se une al dominio cinasa impidiendo la autofosforilación y, por lo tanto, la activación de WNK4. En este escenario WNK4 actúa como un inhibidor de NCC. En el escenario contrario, cuando la célula se depleta de cloruro, el dominio cinasa de WNK4 se libera, se activa, y entonces enciende la cascada de señalización que fosforila y activa a SPAK y a NCC para transportar cloruro al interior de la célula (figura 12).

Es interesante notar que, en nuestros resultados y en trabajos anteriores del grupo de investigación liderado por el doctor Gerardo Gamba en ovocitos, L-WNK1 y WNK3 se encuentran fosforiladas en la serina de activación y activando a NCC aún en condiciones basales donde la concentración de cloruro se encuentra alrededor de 59 mM¹²⁸. Al contrario, WNK4 necesita la salida de cloruro para activarse. Esto nos llevó a pensar que WNK4 es más sensible que otras WNKs, permitiendo diferentes niveles de regulación dependiendo de la WNK que se exprese a lo largo de la nefrona. Recientemente, el grupo del doctor David H. Ellison, en un trabajo en colaboración con el doctor Gamba, dilucidó esto y aclaró el modelo al demostrar, utilizando un ensayo cinasa *in vitro*, que los dominios cinasa de las WNKs tienen distintas sensibilidades por el cloruro. WNK4 es la más sensible, seguida por L-WNK1 y por último WNK3¹²⁹. Estos resultados permiten concluir que en células y ovocitos donde la concentración intracelular de cloruro es alta, WNK4 está inhibida, pero L-WNK 1 y 3 están activas. En estas condiciones WNK4 puede unirse a L-WNK1 o WNK3 e inhibir sus actividades y la actividad de NCC^{73,129,130}. Sin embargo, y en un contexto *in vivo*, considerando que la expresión de L-WNK1 y WNK3 en el TCD1 no parece ser significativa, esta coordinación de las cinasas sobre la actividad de NCC no es muy clara aún. Sin duda, la WNK4 es la cinasa reguladora de NCC más importante *in vivo*. Aunque no sabemos si este efecto depende de L-WNK1 o WNK3, lo que se concluye del presente estudio es que la concentración de cloruro en las células del túbulo contorneado distal es baja (basada en modelos matemáticos)¹³¹⁻¹³³, por lo que cambios pequeños en su concentración podrían modificar el umbral de activación de WNK4 y, en consecuencia, activar o inhibir a NCC.

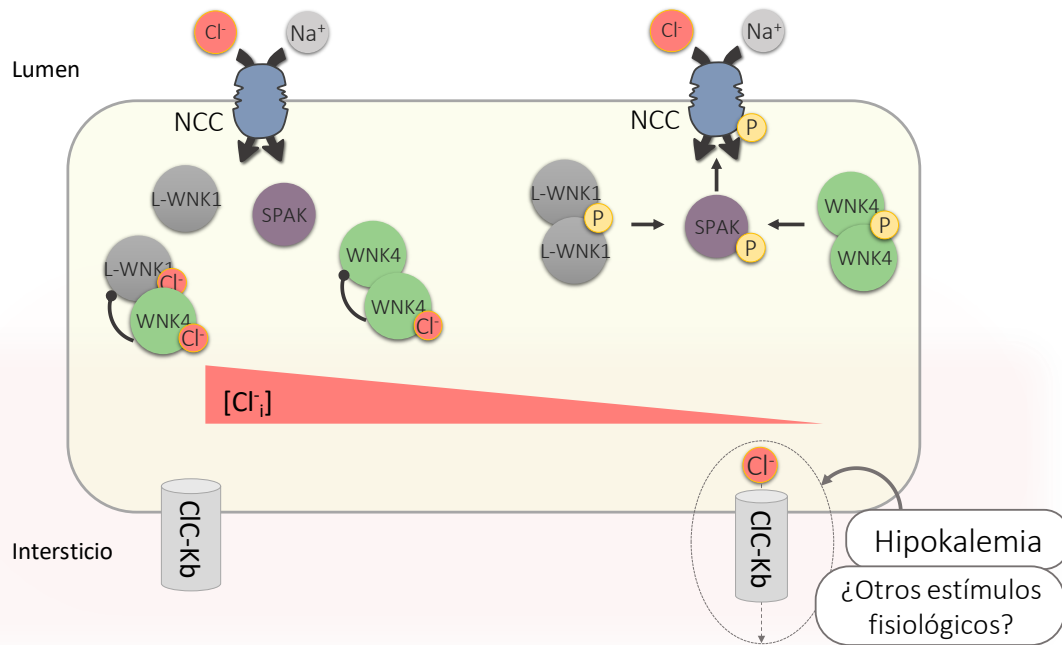


Figura 12. Mecanismo propuesto para la modulación de la actividad de WNK4 y NCC por el cloruro intracelular. En condiciones basales, por ejemplo, en una célula del túbulo contorneado distal, la concentración intracelular de cloruro $[Cl^-]_i$ se encuentra alrededor de 20 mM^{131,132}. En este contexto celular, WNK4 está completamente inhibida y L-WNK1 parcialmente inhibida, por la unión del cloruro al sitio activo impidiendo la fosforilación del asa de activación. Además, WNK4 inactiva puede interactuar con L-WNK1 teniendo un efecto “dominante negativo”. Cualquier estímulo fisiológico, por ejemplo, una disminución en el potasio extracelular (hipokalemia), despolariza la célula estimulando la salida de cloruro de la célula y disminuyendo así la $[Cl^-]_i$ ¹²⁹. En consecuencia, WNK4 y L-WNK1 se liberan del cloruro, se fosforilan y activan a SPAK resultado un aumento de la fosforilación y la activación del NCC.

Si el cloruro es el mecanismo molecular del interruptor ¿quién modula este mecanismo? Los diversos procesos fisiológicos que necesitan encender o apagar la reabsorción de sodio distal por NCC podrían converger en la modulación de la concentración intracelular de cloruro. Varios estudios han reportado que la actividad de NCC aumenta o disminuye según las concentraciones plasmáticas de potasio¹³⁴⁻¹³⁶. Terker *et al.*¹³³ demostraron que cambios en el potasio extracelular regulan el voltaje de la membrana basolateral de las células del túbulo contorneado distal. La disminución en el potasio extracelular hiperpolariza la membrana, promoviendo la salida de cloruro a través del CIC-Kb. La consecuente disminución de la $[Cl^-]_i$ permite la activación de WNK4, que aumenta la actividad de NCC y repone la concentración de cloruro. Lo contrario ocurre si aumenta el potasio extracelular. Estos resultados están respaldados por el hecho de que en ratones *knock-out* de *KCNJ10*¹³⁷ disminuye la expresión y la fosforilación de SPAK y NCC. También, como mencionamos en el capítulo I, mutaciones inactivantes del gen *KCNJ10* producen el síndrome EAST que se caracteriza por un fenotipo renal tipo Gitelman, además de los aspectos neuronales³⁷.

Es necesario considerar que otros procesos fisiológicos que utilicen el interruptor molecular del cloruro en la WNK4. Por ejemplo, aquellos procesos que responden a los cambios de volumen como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). La angiotensina II es un potente activador de NCC¹¹⁴. Existe un estudio que sugiere que la angiotensina II estimula la actividad del ClC-Kb en la membrana basolateral de las células de la rama ascendente del asa de Henle y que este efecto parece ser dependiente del receptor de angiotensina tipo I (AT1R)¹³⁸, que también se expresa en la nefrona distal¹³⁹. La demostración de que WNK4 es sensible a cloruro hace pensar que quizá la angiotensina II aprovecha este mecanismo para activar a NCC. Sin embargo, como veremos en el siguiente capítulo, estudios recientes demuestran que la angiotensina II utiliza otros mecanismos moleculares dependientes de PKC para lograr esto¹⁴⁰. La posibilidad de que se utilicen los dos mecanismos simultáneamente no ha quedado descartada aún.

The Effect of WNK4 on the Na⁺-Cl⁻ Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride

Silvana Bazúa-Valenti,^{*†} María Chávez-Canales,^{*†} Lorena Rojas-Vega,^{*†} Xochiquetzal González-Rodríguez,[‡] Norma Vázquez,^{*†} Alejandro Rodríguez-Gama,^{*†} Eduardo R. Argaiz,^{*†} Zesergio Melo,^{*†} Consuelo Plata,^{*†} David H. Ellison,[§] Jesús García-Valdés,[‡] Juliette Hadchouel,^{||¶} and Gerardo Gamba^{*†}

*Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and †Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, Mexico; ‡Analytical Chemistry Department, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; §Division of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Oregon Health and Science University, Portland, OR; ||INSERM UMR970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France; and ¶Faculty of Medicine, University Paris-Descartes, Sorbonne Paris City, Paris, France

ABSTRACT

It is widely recognized that the phenotype of familial hyperkalemic hypertension is mainly a consequence of increased activity of the renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC) because of altered regulation by with no-lysine-kinase 1 (WNK1) or WNK4. The effect of WNK4 on NCC, however, has been controversial because both inhibition and activation have been reported. It has been recently shown that the long isoform of WNK1 (L-WNK1) is a chloride-sensitive kinase activated by a low Cl⁻ concentration. Therefore, we hypothesized that WNK4 effects on NCC could be modulated by intracellular chloride concentration ([Cl⁻]_i), and we tested this hypothesis in oocytes injected with NCC cRNA with or without WNK4 cRNA. At baseline in oocytes, [Cl⁻]_i was near 50 mM, autophosphorylation of WNK4 was undetectable, and NCC activity was either decreased or unaffected by WNK4. A reduction of [Cl⁻]_i, either by low chloride hypotonic stress or coinjection of oocytes with the solute carrier family 26 (anion exchanger)-member 9 (SLC26A9) cRNA, promoted WNK4 autophosphorylation and increased NCC-dependent Na⁺ transport in a WNK4-dependent manner. Substitution of the leucine with phenylalanine at residue 322 of WNK4, homologous to the chloride-binding pocket in L-WNK1, converted WNK4 into a constitutively autophosphorylated kinase that activated NCC, even without chloride depletion. Elimination of the catalytic activity (D321A or D321K-K186D) or the autophosphorylation site (S335A) in mutant WNK4-L322F abrogated the positive effect on NCC. These observations suggest that WNK4 can exert differential effects on NCC, depending on the intracellular chloride concentration.

J Am Soc Nephrol 26: 1781–1786, 2015. doi: 10.1681/ASN.2014050470

Essential hypertension is a major risk factor for mortality worldwide. Salt reabsorption by the kidney plays a central role in its development. All monogenic diseases featuring high or low blood pressure are caused by mutations in genes encoding the renal salt transporters or their regulatory pathways.¹ Among those are disorders

affecting the activity of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter (NCC). Inactivating mutations of NCC result in Gitelman's syndrome (OMIM 263800) featuring arterial hypotension. In contrast, NCC activation triggers familiar hyperkalemic hypertension (OMIM 145260). This syndrome is caused in some patients by mutations in with

no lysine (K) kinase 4 (WNK4). The understanding of NCC regulation by WNK4 has been complicated by contradictory findings. Many groups have reported that WNK4 reduces activity, phosphorylation, and half-life of NCC *in vitro* and *in vivo*.^{2–7} However, evidence for WNK4-induced NCC activation has also been documented.^{8,9} In this regard, the WNK4 inhibitory effect could be reversed by angiotensin II,¹⁰ suggesting that WNK4 inhibitory and activating effects may coexist and be modulated by the renin-angiotensin system.^{8,10} A reduction of [Cl⁻]_i is associated with increased activity and phosphorylation of NCC¹¹ by Ste20-related proline-alanine rich kinase (SPAK),¹² which in turn is modulated by WNKs.¹³ It has been suggested that WNKs behave as chloride-sensitive kinases.¹⁴ Therefore, we hypothesized that

Received May 13, 2014. Accepted October 30, 2014.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Gerardo Gamba, Molecular Physiology Unit, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico. Email: gamba@biomedicas.unam.mx

Copyright © 2015 by the American Society of Nephrology

[Cl⁻]_i could modulate the effect of WNK4 toward NCC, potentially explaining the dual effect of the kinase.

To test this hypothesis, the functional activity of NCC was assessed in oocytes exposed to control conditions or low chloride hypotonic stress (LCHS) that is known to increase NCC phosphorylation and activity.^{11,12} Coinjection of NCC and mouse WNK4 cRNA resulted in a slight but significant decrease in NCC-mediated Na⁺ uptake. LCHS induced a significant increase in NCC

activity, which was further enhanced by coexpression with either mouse or human WNK4 (Figure 1, A and B).

The [Cl⁻]_i in control oocytes was 49.8±0.7 mM, whereas it was 57.45±0.8 and 58.58±1.4 mM in oocytes injected with NCC or NCC plus WNK4 cRNAs, respectively. NCC probably caused this approximately 15% increase. In contrast, [Cl⁻]_i was significantly reduced by LCHS to a value of approximately 35 mM in all groups, representing a 30%–40% decrease (Figure 1C). The reduction of [Cl⁻]_i

observed in this study is similar to that reported previously by Bertram *et al.*,¹⁵ using an identical LCHS protocol.¹⁶

We next assessed how time of exposure to LCHS altered the regulation of NCC by WNK4 because previous observations have shown that [Cl⁻]_i slowly decreases under these conditions.¹⁶ One hour of LCHS had no effect on Na⁺ uptake in oocytes injected with NCC alone, whereas 16 hours resulted in a significant increase (Figure 1D). In contrast, WNK4 expression led to a significant activation of NCC

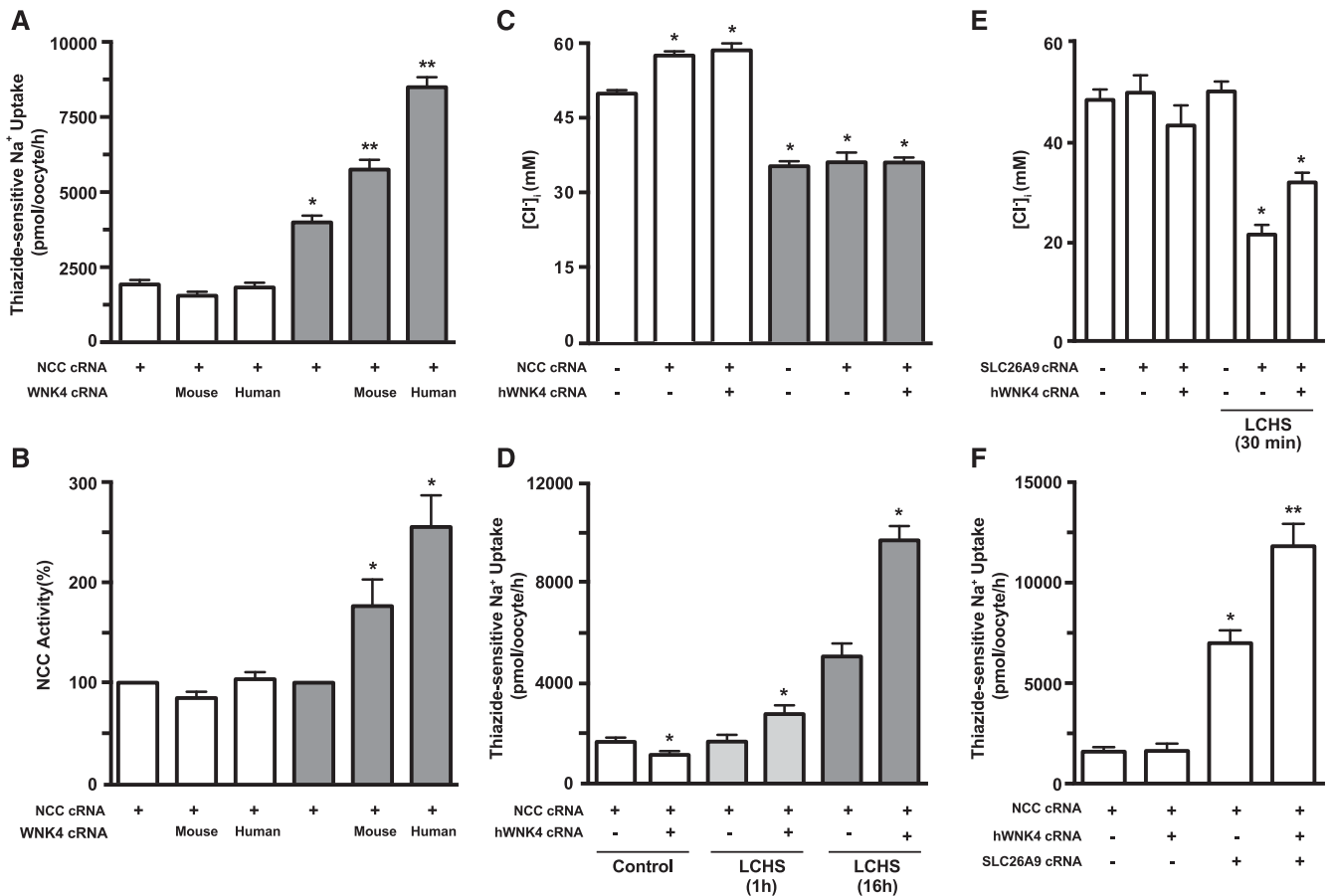


Figure 1. WNK4 effect on NCC is modulated by [Cl⁻]_i. (A) Functional expression assay shows the thiazide-sensitive Na⁺ uptake in groups of oocytes injected with NCC cRNA alone or together with mouse WNK4 or human WNK4 cRNA, as stated. Uptake was performed in control conditions (white bars) or after 16 hours of LCHS (gray bars) (see Supplemental Material). **P*<0.01 versus same group in control conditions. ***P*<0.05 versus NCC in LCHS. *n*=13. (B) Uptake in oocytes injected with NCC alone, in control conditions (white bars) or LCHS (gray bars), was arbitrarily set to 100%, and the corresponding groups were normalized accordingly. **P*<0.01 versus any group in control conditions and versus NCC in LCHS. (C) The [Cl⁻]_i in oocytes was assessed with custom-made glass capillary ion selective microelectrodes 48 hours after injection of water, NCC, or NCC plus WNK4 cRNA, as stated, in control conditions (white bars) or after 16 hours of LCHS (gray bars). **P*<0.05 versus water injected in control conditions. *n*=2 (six oocytes per group, per experiment). (D) Uptake was performed in control conditions (white bars) or in LCHS in 1 hour (light gray bars) and 16 hours (dark gray bars) in groups injected with NCC alone or NCC plus WNK4 group, as stated. **P*<0.05 versus own control. *n*=3. (E) [Cl⁻]_i in oocytes injected with water, SLC26A9, or SLC26A9 plus WNK4 cRNA, as stated, after 48 hours of incubation in ND96 or after 30 minutes of LCHS. **P*<0.05 versus water in control conditions. *n*=3. (F) Thiazide-sensitive Na⁺ uptake in oocytes injected with NCC cRNA alone and NCC plus WNK4 cRNA in the absence or presence of SLC26A9 cRNA. **P*<0.01 versus NCC or NCC plus WNK4 groups. ***P*<0.05 versus NCC plus SLC26A9 cRNA injection.

after only 1 hour and was further increased after 16 hours. Therefore, the presence of WNK4 accelerated the effect of LCHS on NCC.

Because LCHS may have several effects on oocytes, we used an alternative method to reduce $[Cl^-]_i$ by coinjecting SLC26A9 cRNA, which in the absence of extracellular Cl^- performs as a chloride efflux pathway.¹⁷ Indeed, 2 days after injection, the $[Cl^-]_i$ was similar in water, SLC26A9, or SLC26A9 plus WNK4 injected oocytes, whereas LCHS for only 30 minutes significantly reduced the $[Cl^-]_i$ in SLC26A9 or SLC26A9 plus WNK4, but not in water oocytes (Figure 1E). As a consequence, NCC activity was increased, and this effect was dramatically potentiated by WNK4 (Figure 1F).

Activation of NCC under LCHS is associated with increased phosphorylation of key residues in the amino-terminal domain.^{11,12} To determine if the catalytic activity of WNK4 is required for NCC activation in these conditions, we used the catalytically inactive mutant WNK4-D321A.¹³ This mutant not only prevented the activation of NCC by WNK4, but it also decreased its activity below the level of oocytes injected with NCC alone in LCHS (Figure 2A). Because our previous experiments suggested basal NCC activity relies on the endogenous long isoform of WNK1 (L-WNK1),¹⁸ these results suggest WNK4-D321A may prevent the effect of endogenous L-WNK1 during LCHS.

Piala *et al.*¹⁹ showed that L-WNK1 autophosphorylation and activity is inhibited by $[Cl^-]_i$, therefore demonstrating that L-WNK1 is a chloride-sensitive kinase. They identified two leucine residues, conserved among WNKs, in the catalytic domain of L-WNK1 (L369 and L371) that serve as the Cl^- binding site. To test whether these residues display the same function in WNK4, we replaced the homologous residues (L322 and L324) by phenylalanine (WNK4-L322F, WNK4-L324F, and the double mutant WNK4-LL-FF). WNK4-LL-FF induced a remarkable activation of NCC in control conditions (Figure 2B). Mutation of L322 alone resulted in a greater increase in NCC activity, similar to what was observed for WNK4 in LCHS. Moreover, the activation

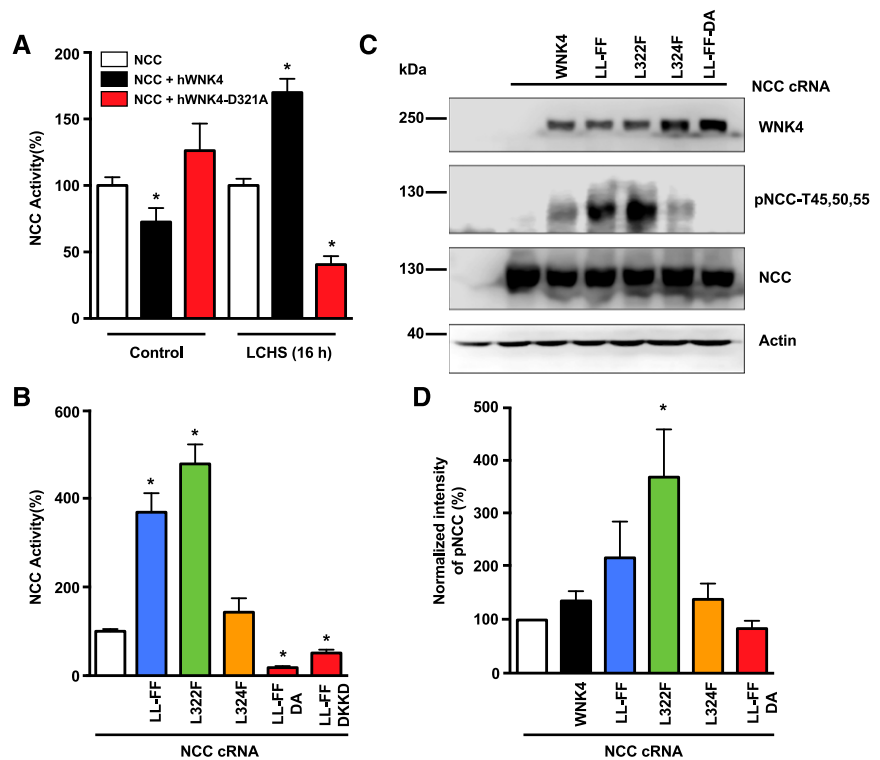


Figure 2. Elimination of the putative Cl^- -binding pocket turns WNK4 into a constitutive activator of NCC. (A) NCC activity in oocytes injected with NCC cRNA (white bars), NCC plus wild-type WNK4 (black bars), or NCC plus catalytically inactive WNK4-D321A (red bars), as stated. Oocytes were incubated in the control solution or LCHS for 16 hours before the measurement of Na^+ uptake. Uptake in oocytes injected with NCC alone and incubated in control or LCHS was arbitrarily set to 100%, and the NCC plus WNK4 or NCC plus WNK4-D321A groups were normalized accordingly. * $P < 0.05$ versus NCC corresponding control. $n = 3$. (B) Uptake in oocytes injected with NCC alone was arbitrarily set to 100% (white bar), and the rest of the groups were normalized accordingly (as stated, WNK4-LL-FF is the blue bar, WNK4-L322F is the green bar, WNK4-L324F is the orange bar, and WNK4-LL-FF-DA and WNK4-LL-FF-DKGD are the red bars). These series of experiments were performed in control conditions only. * $P < 0.01$ versus NCC alone. $n = 6$. (C) Representative Western blot showing the effect of wild-type or mutant WNK4, as stated, on NCC expression and phosphorylation in control conditions. Blot shows WNK4, pNCC, NCC, and actin expression, as stated. WNK4 is present only in oocytes injected with wild-type or mutant WNK4. (D) Densitometric analysis of data compiled from five different experiments. NCC basal phosphorylation (white bar) was arbitrarily set to 100% and the corresponding groups were normalized accordingly (as stated, WNK4 wild-type (black bar), WNK4-LL-FF (blue bar), WNK4-L322F (green bar), WNK4-L324F (orange bar) and catalytically inactive WNK4-LL-FF-DA (red bar). * $P < 0.05$ versus NCC.

of NCC by WNK4-LL-FF is kinase-dependent. The introduction of the D321A or the double-charge D321K-K186D mutations in WNK4-LL-FF not only prevented the activation of NCC, but also abolished most of its activity (Figure 2B). Therefore, elimination of the Cl^- binding site turned WNK4 into a constitutive activator of NCC, in a kinase-dependent manner. This was further confirmed by analysis of

NCC phosphorylation.¹² WNK4-LL-FF and WNK4-L322F stimulated NCC phosphorylation on all three residues tested, whereas WNK4-LL-FF-DA completely prevented it (Figure 2, C and D).

To analyze the effect of $[Cl^-]_i$ on WNK4 activity, we determined the autophosphorylation status of serine residue S335, known to be required for WNK activation. According to Piala *et al.*,¹⁹ phosphorylation of L-WNK1 homologous serine

(S382) is modulated by chloride. No phosphorylation of WNK4 was observed in control conditions, whereas it became evident in oocytes challenged with LCHS (Figure 3, A and B). The phosphorylation level of L-WNK1 S382 was also increased by LCHS, whereas it was similar in both conditions for WNK3 S308 (Figure 3C). Interestingly, WNK4-L322F was strong in basal conditions and was not affected by

LCHS (Figure 3, D and E). These findings suggest WNK3 and WNK4-L322F are less sensitive to $[Cl^-]_i$ than L-WNK1 and WNK4. Supporting that phosphorylation of WNK4-S335 is required for NCC activation; mutation of this residue to alanine in WNK4-LL-FF and WNK4-L322F abrogated their effect on NCC (Figure 3F).

Soon after the recognition that mutations in WNK4 cause familial hyperkalemic

hypertension,²⁰ it was reported that WNK4 reduces the activity of NCC in *Xenopus laevis* oocytes and mammalian cells.^{2–6,21} Animal models supported the *in vitro* observations because overexpression of WNK4 in transgenic mice resulted in decreased expression and phosphorylation of NCC.⁷ However, one study reported increased NCC activity by human WNK4 in *Xenopus* oocytes,²² and inactivation of WNK4 in mice resulted in a reduced NCC phosphorylation and expression.⁸ Moreover, both parameters were increased in a new model of WNK4 overexpression in mice.⁹ Therefore, there is evidence *in vitro* and *in vivo* for both inhibition and activation of NCC by WNK4.

Here we present data indicating that WNK4 is a chloride-sensitive kinase, potentially explaining the dual effects of WNK4 on NCC. In the presence of high Cl^- concentrations, WNK4 is inactive and may reduce basal activity of NCC by its inhibiting interaction with L-WNK1 and WNK3.^{18,21} When $[Cl^-]_i$ is low, WNK4 phosphorylation, and therefore activity, is stimulated, thereby activating the cotransporter (Figure 4). Our results suggest a similar mechanism to the one proposed by Piali *et al.*¹⁹ is probably involved in the switch of WNK4 behavior.

The apparent median inhibitory concentration of Cl^- (IC_{50}) for L-WNK1 is 20 mM. In oocytes and HEK293 cells, $[Cl^-]_i$ is around 40–50 mM,^{16,17,23} therefore allowing partial activity of L-WNK1. This is consistent with our recent observation that basal NCC activity in oocytes and HEK293 cells depends on endogenous L-WNK1.¹⁸ The increased NCC activity induced by LCHS in oocytes injected only with NCC is most likely caused by enhanced endogenous L-WNK1 activity. Coinjection of oocytes with SLC26A9 reduces $[Cl^-]_i$ to approximately 30 mM,¹⁷ leading to activation of NCC without LCHS. In oocytes in basal conditions, the most potent activator of NCC is WNK3,²⁴ followed by L-WNK1,¹⁸ whereas WNK4 may inhibit or have no effect on its basal activity. This difference in WNKs activity toward NCC could be a function of their sensitivity to chloride.¹⁸

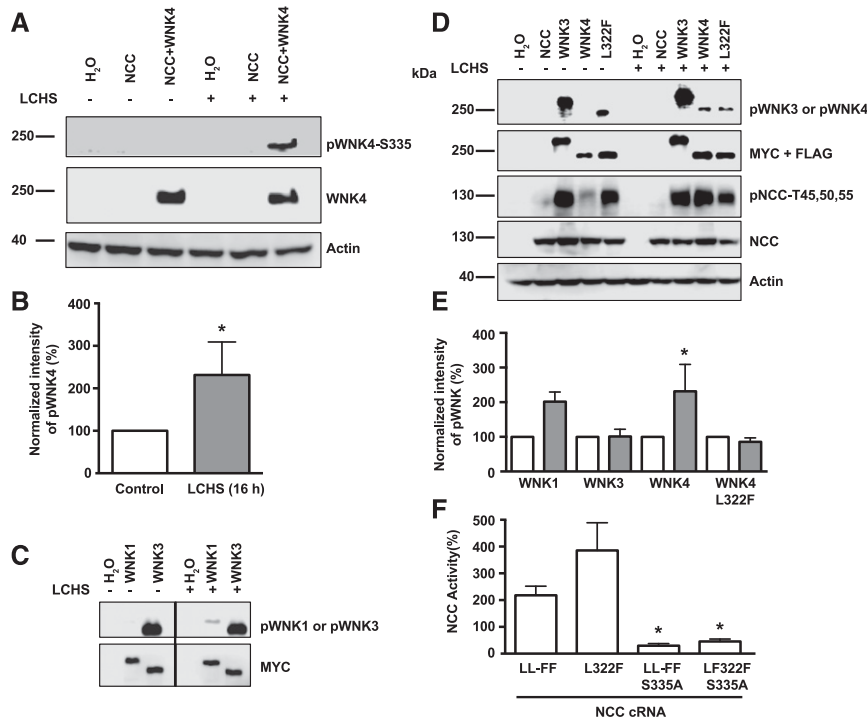


Figure 3. Modulation of WNK autophosphorylation by decrease of $[Cl^-]_i$ induced by LCHS. (A) Representative Western blot showing the effect of LCHS on wild-type WNK4 autophosphorylation, as stated, in control conditions or LCHS. Blot shows pWNK4, WNK4, and actin expression, as stated. Phosphoantibody recognizing S335 in WNK4 was developed and characterized by Thastrup *et al.*³⁰ (B) Densitometric analysis of compiled results from six different experiments. Phosphorylation level of WNK4 in control conditions was arbitrary set to 100% (white bar), and the phosphorylation status in LCHS was normalized accordingly (gray bar). * $P < 0.05$ versus control (Wilcoxon signed-rank test). (C) L-WNK1 and WNK3 autophosphorylation at S382 and S308, respectively, in control and LCHS conditions, as stated. The upper blot depicts phospho-WNK, and the lower blot shows the total amount of L-WNK1 or WNK3 as detected using anti-Myc antibody. Original image was cropped to eliminate empty lanes and show the L-WNK1 and WNK3 lanes only. (D) Representative Western blot of phospho-WNKs (WNK3, WNK4, or mutant WNK4-L322F), total WNKs, phospho-NCC, NCC, and actin in control conditions and after LCHS, as stated. (E) Densitometric analysis of compiled results from six experiments for WNK4: three for WNK3, three for WNK4-L322F, and two for L-WNK1. White bars depict phosphorylation status in control conditions arbitrarily taken as 100%, and gray bars depict the phosphorylation status in LCHS, as normalized for its corresponding white bar. * $P < 0.05$ versus control (Wilcoxon signed-rank test). (F) NCC activity in oocytes injected with mutant WNK4-LL-FF, WNK4-L322F, WNK4-LL-FF-S335A, or WNK4-L322F-S335A, as stated. Uptake in oocytes injected with NCC alone was arbitrarily set to 100%, and the corresponding groups were normalized accordingly. These series of experiments were performed in control conditions only. $n = 4$. * $P < 0.001$ versus corresponding group without S335A substitution.

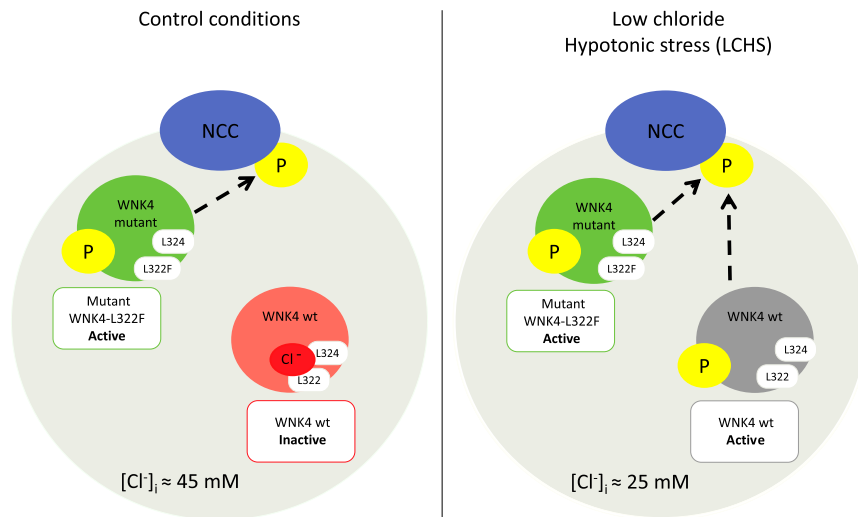


Figure 4. A cell scheme of a *X. laevis* oocyte illustrating the effect of intracellular chloride concentration on wild-type WNK4 and mutant WNK4-L322F effect on NCC. In control conditions, where intracellular chloride concentration fluctuates around 45 mM, wild-type (wt) WNK4 is inactive, resulting in a negative or neutral effect on NCC activity. Disruption of the chloride binding site in mutant WNK4-L322F turns it into a constitutively auto-phosphorylated activate kinase that has a positive effect on NCC activity even without chloride depletion. Reduction of intracellular chloride to around 25 mM (after LCHS) is sufficient to promote wt WNK4 autophosphorylation, turning it into an activator of NCC.

Further experiments are required to define the IC_{50} for each WNK. In this regard, the regulation of WNK4 activity by angiotensin II and $[Cl^-]_i$ may be linked because angiotensin II promotes the opening of chloride channels,²⁵ which would result in a decreased $[Cl^-]_i$. Moreover, a recent study suggests the reduced activity of NCC in EAST/SeSAME syndrome results from *Kcnj10* mutations that inhibit basolateral K^+ conductance, reducing the chloride exit from the cell.²⁶

$[Cl^-]_i$ of distal convoluted tubule cells ranges from 14 to 20 mM.^{27–29} Therefore, small changes in $[Cl^-]_i$ could have an important effect on NCC regulation by WNK4. Further experiments and mathematical modeling are required to explore this hypothesis and the role of $[Cl^-]_i$ in the regulation of NCC in physiologic conditions.

CONCISE METHODS

Mutagenesis and Constructs

All mutant WNK4 constructs were generated by site-directed mutagenesis, and their sequence was checked by automatic DNA sequencing.

Functional Expression of NCC

Our institutional committee on animal research approved the use of *X. laevis* frogs. The functional expression of NCC was assessed in *X. laevis* oocytes microinjected with NCC cRNA alone or together with wild-type WNK4, SLC26A9, or mutant WNK4. Two days later, the thiazide-sensitive $^{22}Na^+$ uptake was assessed in oocytes exposed to control conditions or to LCHS, following our previously published protocol.¹¹ In brief, the night before the uptake assay, groups of oocytes were incubated in two different osmolar conditions: isotonic (ND96, 210 mosm/kg H_2O) or low Cl^- hypotonic stress (Cl^- -free 170 mosm/kg H_2O). Then, tracer $^{22}Na^+$ uptake was assessed in oocytes exposed to isotonicity using our usual isotonic uptake solution or NaCl containing hypotonic uptake medium (see Supplemental Material for details).

Measurement of Intracellular Chloride Concentration

Intracellular chloride concentration was assessed using ion selective microelectrodes. All measurements were performed in a Faraday cage to avoid electromagnetic interference. Each ion selective microelectrode was calibrated

with 10^{-5} to 10^{-1} M KCl standard solution showing a nernstian behavior.

Western Blotting of *X. laevis* Oocyte Proteins

Flag-tagged NCC protein, human Flag-tagged WNK4, Myc-tagged WNK3, and Myc-tagged L-WNK1 protein extracts were analyzed by Western blot. The following commercial HRP-conjugated antibodies were used: anti-Flag 1:5000 (Sigma-Aldrich), anti-Myc 1:1000 (Sigma-Aldrich), and anti-beta-actin 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology). The following sheep antibodies were used at a concentration of 1–2 $\mu g/ml$: anti-NCC (recognizing residues 906–925 of human NCC, CHTKRFEDMIAPFRLNDGFKD); anti-phosphorylated NCC at threonine 45, threonine 50, and threonine 55 (T44, 48, and 53 in rats); anti-WNK4 (recognizing residues 1221–1243 of human WNK4, SSTGSQEQRASKGVTFAGDVGRM); and anti-phosphorylated L-WNK1 at S382. The blots done with the sheep antibodies were incubated for 1.5 hour at room temperature with secondary anti-sheep HRP-conjugated antibody 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology) in blocking solution. The signal was detected by chemiluminescence using the Luminata Forte Western HRP substrate (EMD Millipore).

Statistical Analysis

The significance of the difference between the two groups was tested with *t* test and for three or more groups by one-way ANOVA with multiple comparisons with Bonferroni correction, using GraphPad Prism version 6.00 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dario Alessi, Dundee University, for the gift of the sheep antibodies.

This work was supported by grant 165815 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) and IN200513 from PAPIIT-DGAPA to G.G., and collaborative international grants 188712 from CONACyT and ANR-12-ISVS1-0001-01 from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, France) to G.G. and J.H. S.B.-V. was supported by a scholarship from CONACyT-Mexico and is

a graduate student in the Biochemical Science program of the Universidad Nacional Autónoma de México.

DISCLOSURES

None

REFERENCES

1. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS: Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545–556, 2001
2. Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G, Lifton RP: Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 680–684, 2003
3. Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH: WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 111: 1039–1045, 2003
4. Cai H, Cebotaru V, Wang YH, Zhang XM, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB: WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. *Kidney Int* 69: 2162–2170, 2006
5. Subramanya AR, Liu J, Ellison DH, Wade JB, Welling PA: WNK4 diverts the thiazide-sensitive NaCl cotransporter to the lysosome and stimulates AP-3 interaction. *J Biol Chem* 284: 18471–18480, 2009
6. Ko B, Mistry AC, Hanson L, Mallick R, Cooke LL, Hack BK, Cunningham P, Hoover RS: A new model of the distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F700–F710, 2012
7. Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, Toka HR, Nelson-Williams C, Ellison DH, Flavell R, Booth CJ, Lu Y, Geller DS, Lifton RP: Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet* 38: 1124–1132, 2006
8. Castañeda-Bueno M, Cervantes-Pérez LG, Vázquez N, Uribe N, Kantesaria S, Morla L, Bobadilla NA, Doucet A, Alessi DR, Gamba G: Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7929–7934, 2012
9. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sahara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S: Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep* 3: 858–868, 2013
10. San-Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi FH, Chari D, Kahle KT, Leng Q, Bobadilla NA, Hebert SC, Alessi DR, Lifton RP, Gamba G: Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4384–4389, 2009
11. Pacheco-Alvarez D, Cristóbal PS, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Muñoz E, Díaz A, Juárez ME, Giménez I, Gamba G: The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 281: 28755–28763, 2006
12. Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HK, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, Morrice NA, Alessi DR: Activation of the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* 121: 675–684, 2008
13. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, 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* 391: 17–24, 2005
14. Pacheco-Alvarez D, Gamba G: WNK3 is a putative chloride-sensing kinase. *Cell Physiol Biochem* 28: 1123–1134, 2011
15. Bertram S, Cherubino F, Bossi E, Castagna M, Peres A: GABA reverse transport by the neuronal cotransporter GAT1: Influence of internal chloride depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C1064–C1073, 2011
16. Keicher E, Meech R: Endogenous Na⁺:K⁺ (or NH₄⁺):2Cl⁻ cotransport in *Rana* oocytes; anomalous effect of external NH₄⁺ on pHi. *J Physiol* 475: 45–57, 1994
17. Chang MH, Plata C, Zandi-Nejad K, Sindić A, Sussman CR, Mercado A, Broumand V, Raghuram V, Mount DB, Romero MF: Slc26a9–anion exchanger, channel and Na⁺ transporter. *J Membr Biol* 228: 125–140, 2009
18. Chavez-Canales M, Zhang C, Soukaseum C, Moreno E, Pacheco-Alvarez D, Vidal-Petiot E, Castañeda-Bueno M, Vazquez N, Rojas-Vega L, Meermeier NP, Rogers S, Jeunemaitre X, Yang CL, Ellison DH, Gamba G, Hadchouel J: WNK-SPAK-NCC cascade revisited: WNK1 stimulates the activity of the Na-Cl cotransporter via SPAK, an effect antagonized by WNK4. *Hypertension* 64: 1047–1053, 2014
19. Piala AT, Moon TM, Akella R, He H, Cobb MH, Goldsmith EJ: Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal* 7: ra41, 2014
20. Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP: Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107–1112, 2001
21. Yang CL, Zhu X, Ellison DH: The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest* 117: 3403–3411, 2007
22. Wu G, Peng JB: Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation. *FEBS Lett* 587: 1717–1722, 2013
23. Cruz-Rangel S, Gamba G, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H: Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells. *Pflugers Arch* 464: 317–330, 2012
24. Rinehart J, Kahle KT, de Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G, Lifton RP: WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16777–16782, 2005
25. Wu P, Wang M, Luan H, Li L, Wang L, Wang WH, Gu R: Angiotensin II stimulates basolateral 10-pS Cl channels in the thick ascending limb. *Hypertension* 61: 1211–1217, 2013
26. Zhang C, Wang L, Zhang J, Su XT, Lin DH, Scholl UI, Giebisch G, Lifton RP, Wang WH: KCNJ10 determines the expression of the apical Na-Cl cotransporter (NCC) in the early distal convoluted tubule (DCT1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11864–11869, 2014
27. Beck FX, Dörge A, Rick R, Schramm M, Thurau K: The distribution of potassium, sodium and chloride across the apical membrane of renal tubular cells: Effect of acute metabolic alkalosis. *Pflugers Arch* 411: 259–267, 1988
28. Boettger T, Hübner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ: Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl cotransporter *Kcc4*. *Nature* 416: 874–878, 2002
29. Weinstein AM: A mathematical model of rat distal convoluted tubule. I. Cotransporter function in early DCT. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F699–F720, 2005
30. Thastrup JO, Rafiqi FH, Vitari AC, Pozo-Guisado E, Deak M, Mehellou Y, Alessi DR: SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: Analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochem J* 441: 325–337, 2012

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2014050470/-DCSupplemental>.

Capítulo III. De la regulación molecular de WNK4 a la fisiología de la reabsorción de NaCl en el túbulo distal

“The fixity of the internal environment [the *milieu intérieur*] is the condition of free, independent life”

— Claude Bernard

In Lectures on the Phenomena of Life Common to Animals and Plants

En la segunda parte del proyecto de investigación que sustenta esta tesis se examina la posible acción de WNK4 en un aspecto muy particular de la fisiología renal que hasta ahora no tenía explicación.

Regulación del calcio por el Receptor-sensor de calcio

El calcio libre ionizado (Ca^{2+}) es un catión con varios roles fisiológicos como contracción muscular, sinapsis neuronal, secreción de hormonas, coagulación, fertilización, entre otros¹⁴¹. El riñón también juega un papel fundamental en la regulación de la concentración sérica de calcio, ya que del mismo modo que pasa con el sodio, la excreción urinaria es uno de los factores determinantes de la cantidad de calcio en el organismo. La manera en la que la reabsorción y la excreción de sodio y calcio son regulados por el riñón tiene una relación particular en dos segmentos adyacentes de la nefrona: la rama ascendente gruesa del asa de Henle (AAH) seguida por el túbulo contorneado distal (TCD). Más aún, existe un balance fino entre la reabsorción y la excreción de estos cationes en estos segmentos.

La homeostasis del calcio involucra a un sistema compuesto por hormonas y tejidos más allá del riñón, y un importante regulador de este sistema es la hormona paratiroidea (PTH). La PTH es sintetizada en las células principales de las glándulas paratiroides y se secreta cuando hay una reducción de la concentración sérica de calcio. Para regresar a la normocalcemia, la PTH inicia varios procesos. Por un lado, a nivel renal, promueve la excreción de fosfato^{**} y aumenta la síntesis de calcitriol, al mismo tiempo que activa la reabsorción de calcio a lo largo de toda la nefrona; por otro lado, aumenta la absorción intestinal de calcio (gracias a la producción de calcitriol) y la resorción ósea¹⁴².

^{**} El efecto fosfatúrico de la PTH produce hipofosfatemia para limitar la precipitación del calcio con el fosfato y aumentar la concentración de calcio ionizado en el líquido intravascular.

La secreción de la PTH a su vez es regulada por la concentración sérica de calcio a través del Receptor-sensor de calcio (CaSR)¹⁴³. Los incrementos en la concentración sérica de calcio, aún dentro de límites fisiológicos, activan el CaSR. El CaSR activo inhibe la secreción de PTH y antagoniza los efectos fisiológicos de la PTH para disminuir los niveles de calcio^{144,145}. Además, a través del CaSR, el calcio tiene un efecto directo sobre su reabsorción renal. Si aumenta el calcio sérico, por efecto directo de la activación del CaSR en el riñón, se reduce la reabsorción renal de calcio, promoviendo su excreción para regresar a la normocalcemia¹⁴⁶.

Patologías asociadas a mutaciones en el CaSR

Cada día hay más evidencias que muestran el papel del CaSR en la homeostasis del calcio en el líquido extracelular. Tanto así que es un blanco terapéutico importante para hipercalcemias en diversos estados patológicos como la enfermedad renal crónica^{147,148}. Más aún, empiezan a encontrarse nuevas funciones del CaSR en diversos procesos patológicos que van desde el cáncer, la osteoporosis y la fibrosis, hasta procesos fisiológicos normales como el desarrollo embrionario¹⁴⁹. Sin embargo, la evidencia más clara de que el CaSR es una proteína fundamental para la homeostasis del organismo es que existen síndromes asociados a la disfunción del receptor. Existen dos enfermedades genéticas asociadas a la pérdida de función del receptor y una a la ganancia de función.

La gravedad de la enfermedad asociada a la pérdida de función del CaSR depende del genotipo. Por ejemplo, las mutaciones inactivantes de una sola copia del gen *CASR* causan un síndrome hereditario llamado hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) con hipercalcemia crónica leve, hipocalciuria e hiperparatiroidismo. Mientras que las mutaciones homocigotas causan una enfermedad conocida como hiperparatiroidismo severo neonatal (NSHPT), que es mucho más grave que la FHH, con hipercalcemias que incluso llegan a ser letales en el 50% de los casos, y que se manifiesta desde los primeros días de vida¹⁵⁰.

Por otro lado, las mutaciones activantes del CaSR causan una enfermedad conocida como hipocalcemia autosómica dominante (ADH) que se caracteriza por hipocalcemia grave e hipomagnesemia asociadas a hipercalciuria e hipermagnesuria y, en algunos casos, asociada a una tubulopatía con pérdida renal de sal, parecida al síndrome de Bartter¹⁵⁰. Esto último se debe a la regulación de la actividad de NKCC2 por el CaSR que explicaré más adelante. En el caso de la ADH, un alelo mutado es suficiente para causar el fenotipo, aunque existen reportes en la literatura de mutaciones homocigotas¹⁵¹.

Detalles estructurales del CaSR

El CaSR fue clonado en 1993 de la glándula paratiroides bovina por el grupo liderado por el doctor Steven Hebert¹⁵². El CaSR es un receptor membranal que se acopla a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés) y juega un papel fundamental en la homeostasis del calcio al funcionar como un detector de calcio que monitorea constantemente el líquido extracelular¹⁵³. El CaSR está compuesto por 1,078 aminoácidos que forman la estructura de un GPCR de clase C, es decir con similitud al receptor metabotrópico de glutamato. A grandes rasgos la estructura consiste en tres principales dominios. Primero un dominio amino terminal extracelular muy extenso (612 aminoácidos), seguido de la estructura distintiva de los GPCRs, de siete dominios transmembranales conectados entre sí por asas hidrofílicas de longitud variable y, por último, el dominio carboxilo terminal intracelular rico en residuos de serina y treonina que son importantes para la regulación del receptor, y que es también muy extenso (216 aminoácidos) en comparación con otros GPCR clase C^{144,154}. El dominio amino terminal extracelular del receptor adopta una conformación “Venus FlyTrap” (dominio VFT)^{††}, es decir una estructura bilobulada separada por una hendidura donde se encuentran sitios putativos de unión a calcio formados principalmente por residuos ácidos¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Recientemente se encontraron otros sitios de unión a magnesio y gadolinio que no están en la hendidura pero que también tienen residuos ácidos¹⁹⁸ (Figura 13). Es interesante mencionar que aunque la mayoría de los sitios de unión se han descrito en el dominio extracelular, hace unos años el grupo del doctor Allen Spiegel creó una construcción del receptor sin este dominio que aun conserva la capacidad de señalización en presencia de calcio, y más en presencia de moduladores alostéricos positivos, sugiriendo que también existe un sitio de unión a calcio en una región rica en residuos ácidos en el dominio de las hélices transmembranales¹⁵⁶. Ahora bien, se sabe que el dominio VFT-like se encuentra abierto cuando no hay agonista unido y que se cierra al unirse el calcio, lo que produce un cambio conformacional que llega al dominio transmembranal y empieza la señalización¹⁵⁵. El dominio VFT y la primera hélice transmembranal están conectados entre sí por un dominio rico en residuos de cisteína que es fundamental para la transducción de la señal del cambio conformacional del dominio VFT hacia el dominio transmembranal¹⁵⁹. Una característica importante del CaSR es que en la membrana plasmática se encuentra glicosilado y

^{††} El dominio Venus FlyTrap es estructuralmente similar a unas proteínas auxiliares de transportadores en bacterias llamadas proteínas periplásmicas de unión. La estructura del dominio VFT resuelta por cristalografía muestra que consiste en dos lóbulos separados por una hendidura en la que se unen los agonistas. Los lóbulos oscilan entre una conformación abierta y cerrada dependiendo de si está o no el agonista, de ahí que le acuñaran el nombre de Venus FlyTrap, como la planta carnívora *Dionaea muscipula* (aunque personalmente me parecen más parecidos a un guante de béisbol, pero quizá el nombre “dominio de guante” no es tan llamativo como el nombre de una planta carnívora). En presencia del agonista, se estabiliza la forma cerrada juntando los dos lóbulos. Las proteínas que tienen estos dominios VFT forman dímeros funcionales constitutivos. Se cree que en algún momento de la evolución de la clase C de los GPCRs, los genes que codifican para las proteínas periplásmicas de unión de las bacterias y los del receptor de rodopsina se unieron por transferencia horizontal dándole una ventaja evolutiva¹⁵⁵.

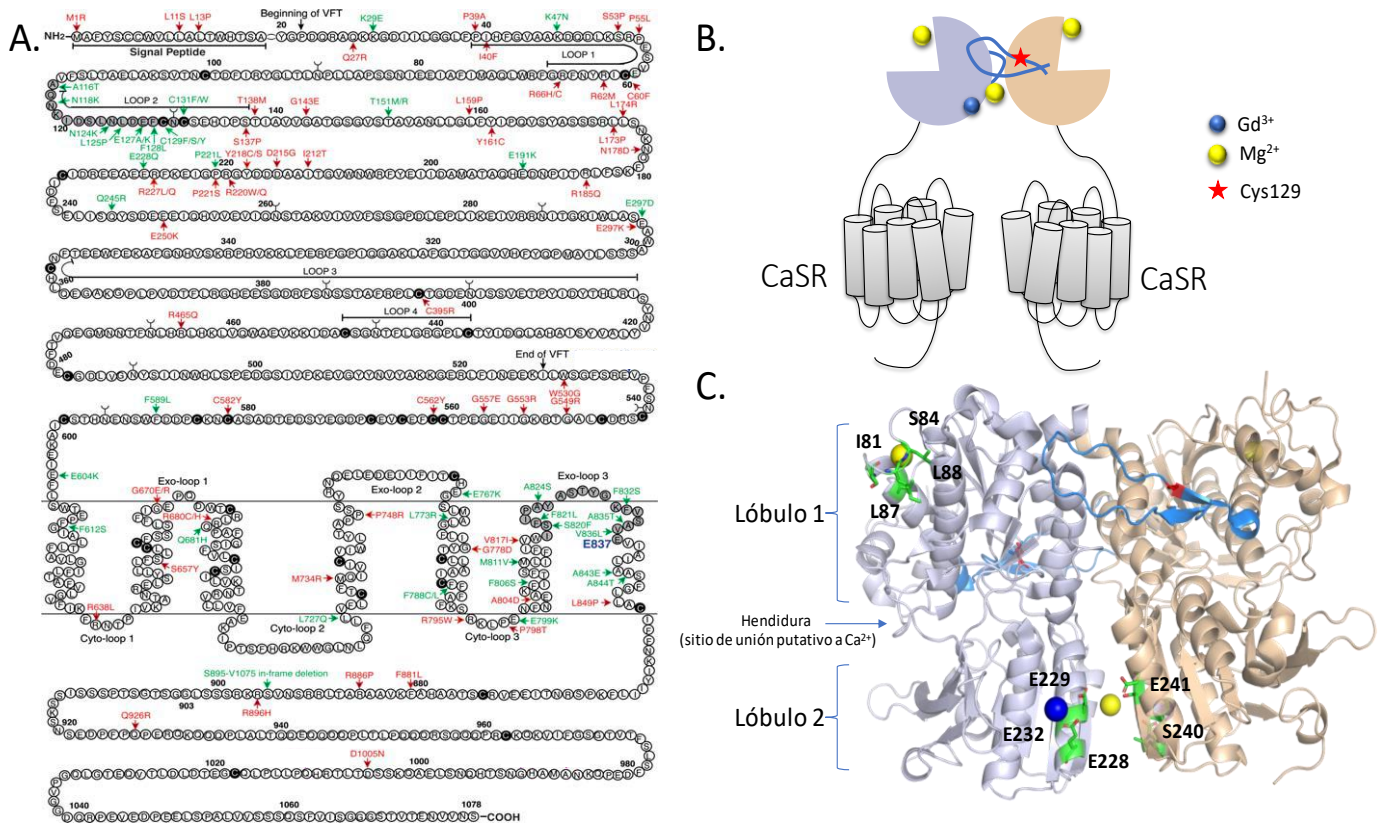


Figura 13. Estructura general del CaSR. A. Imagen tomada de Jianxin Hu & Allen M. Spiegel Structure and function of the human calcium-sensing receptor. *J Cell Mol Med*, 11, (2007). Secuencia de aminoácidos del receptor, los residuos de cisteína se muestran como círculos negros, los sitios de glicosilación se muestran con una Y arriba del aminoácido N. Se señala el péptido señal, los aminoácidos que constituyen el dominio VFT-like y las asas 1 a 4 de los lóbulos. Se señalan en rojo las mutaciones inactivantes del receptor que causan hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) o hiperparatiroidismo severo neonatal (NSHPT), y en verde las mutaciones activantes del receptor que causan hipocalcemia autosómica dominante. Se ha descrito el papel del residuo E837 (marcado en azul) en la unión de moduladores alostéricos positivos del receptor, por ejemplo, el calcimimético NPS R568. B. Diagrama de un homodímero del receptor. Se muestran los sitios de unión de magnesio y gadolinio. La primera asa (en A. “LOOP 1”) que es importante para la dimerización. C. Modelo de la estructura del dominio VFT-like trabajado en PyMOL para MacOSX (PDB 5FBH) donde se muestra los mismo que en B. Figura basada en Zhang, C., *et al.* Structural basis for regulation of human calcium-sensing receptor by magnesium ions and an unexpected tryptophan derivative co-agonist. *Si. Adv.* 2, (2016).

homodimerizado a través de un puente disulfuro entre los residuos Cys129 y Cys131 del dominio VFT de los monómeros¹⁶⁰ (Figura 13).

El CaSR es un receptor “promiscuo” en el sentido de que el calcio no es su único agonista. El CaSR también se activa por otros cationes divalentes como magnesio y con cationes trivalentes como el gadolinio. De igual forma, se activa con moléculas orgánicas con cargas positivas como las poliaminas y antibióticos del grupo de los aminoglucósidos. Todos estos

agonistas se agrupan dentro de los agonistas tipo I. Adicionalmente, existen los agonistas tipo II, que son moduladores alostéricos positivos del receptor y, por lo tanto, requieren de la presencia de calcio para activar al receptor¹⁶¹. Los agonistas tipo II incluyen, por ejemplo, aminoácidos aromáticos y los calcimiméticos (cinacalcet, etelcalcetide), que son frecuentemente utilizados en la clínica para tratar hiperparatiroidismo secundario^{147,148}. Por el contrario, existen inhibidores del receptor (o antagonistas) llamados calciolíticos (NPS 2143, ATF936). En la clínica los calciolíticos han causado mucha controversia y no se utilizan como terapias de primera línea¹⁵⁷. Sin embargo, algunos estudios empiezan a proponerlos para el tratamiento de osteoporosis e hipocalcemias graves^{162,163}. Tanto los calcimiméticos, como los calciolíticos, se unen a sitios dentro del dominio hidrofóbico de las hélices transmembranales para potenciar o inhibir el cambio conformacional que sucede en el dominio extracelular¹⁶⁴.

Señalización intracelular del CaSR

El CaSR se acopla preferentemente a las proteínas $G\alpha_i$ y $G\alpha_{q/11}$ ¹⁵³. A través de la proteína $G\alpha_{q/11}$, el receptor enciende el sistema de transducción de recambio de fosfoinosítidos-calcio al activar la fosfolipasa C- β (PLC β) que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) a inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ provoca la apertura de canales de calcio dependientes de IP₃ en el retículo endoplásmico, resultando en la movilización de calcio desde depósitos internos hacia el medio intracelular. El calcio se une a distintas proteínas sensores de calcio como la calmodulina o la troponina C, que a su vez regulan la actividad de otras proteínas cinasas, fosfatasa y sintasa, entre otras. El otro mensajero, el DAG, permanece en la membrana, donde puede activar isoformas de la proteína cinasa C (PKC). Algunas isoformas de la PKC también se activan por calcio. Esta proteína cinasa de residuos de serina y treonina activa o reprime a otras proteínas cinasas, factores de transcripción, canales iónicos o incluso a otros receptores¹⁶⁵. Una familia de cinasas río abajo de la PKC que se conoce muy bien y cuya activación del CaSR se ha demostrado que culmina en su fosforilación, son las cinasas MAP¹⁶⁶. También se ha descrito que el CaSR puede activar a la fosfolipasa A₂ (PLA₂), pero no directamente con la proteína G, si no que a través de cinasas río abajo como ERK1/2¹⁶⁷. Al activar a la PLA₂, el CaSR promueve la síntesis de ácido araquidónico que, en el riñón, se metaboliza gracias a la enzima CYP4A2 (o citocromo p450) a eicosanoides, como por ejemplo, el 20-hidroxeicosatetraenoico (20-HETE), que mencionaremos más adelante¹⁶⁰ (Figura 14).

Por otro lado, a través de la proteína $G\alpha_i$, el CaSR inhibe la adenilil ciclasa (AC) reduciendo la concentración de AMP cíclico (AMPC) intracelular. Es interesante mencionar que también se

ha demostrado que la subunidad $\beta\gamma$ de estas proteínas G tienen la capacidad de activar a la PLC β y, por lo tanto, el sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio¹⁶⁸ (Figura 14).

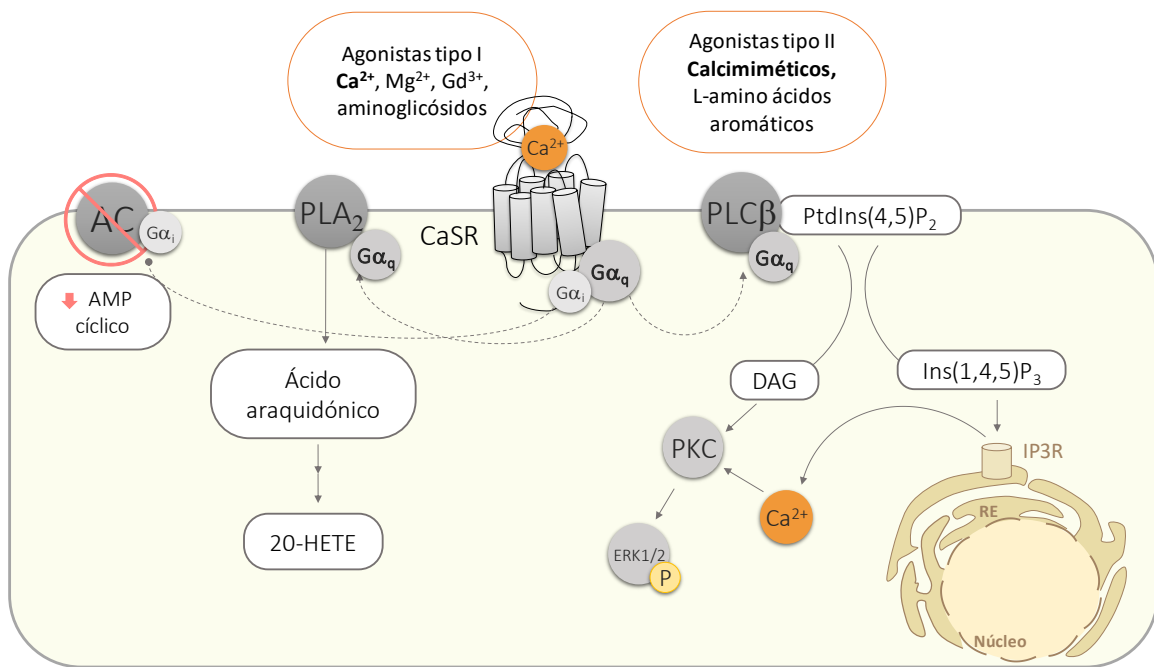


Figura 14. Vía de señalización del CaSR. El receptor funciona como homodímero, pero para facilitar los diagramas se dibujará como monómero.

El CaSR en la nefrona y su relación con la reabsorción de sodio

Como mencioné arriba, cuando hay un aumento en la concentración de calcio en el líquido extracelular, el CaSR promueve la excreción renal de calcio. Se ha demostrado que este efecto es independiente de la PTH, ya que en un modelo *knock-out* del CaSR condicional y específico de riñón, los ratones pierden la capacidad de promover la excreción de calcio cuando se retan con una dieta alta en calcio^{169,170}. Esto último quiere decir que la presencia del CaSR en el riñón le permite detectar los cambios en la concentración de calcio y actuar inmediatamente para regresar a la normocalcemia. Para lograr esto, el CaSR se expresa a lo largo de toda la nefrona: en la membrana apical del túbulo contorneado proximal, en la membrana basolateral de la rama ascendente del asa de Henle (AAH), en el túbulo contorneado distal (TCD) y en la membrana apical de la porción medular del conducto colector; sin embargo, su papel fisiológico en algunos segmentos no está claro aún¹⁷¹⁻¹⁷³.

El segmento en el que se ha descrito con mejor detalle el papel del CaSR es en la AAH. En esta región, el sodio se reabsorbe principalmente a través de una ruta transcelular por el cotransportador NKCC2, mientras que el calcio se reabsorbe por una vía paracelular que

depende en gran medida de la reabsorción de sodio^{10,141}. La reabsorción de sodio a través de NKCC2 se acompaña de la secreción de potasio hacia el lumen por el canal ROMK³³. La secreción de potasio hacia el lumen genera una diferencia de voltaje transepitelial (entre el lumen positivo y el intersticio negativo) que proporciona una fuerza motriz que promueve la reabsorción paracelular de calcio¹⁷⁴ (Figura 15). Así, en la AAH, a mayor reabsorción de sodio, mayor será la reabsorción de calcio. La relación funcional entre la reabsorción de calcio y sodio se puede corroborar en dos escenarios. Primero, se sabe que los pacientes síndrome de Bartter, que resulta de mutaciones inactivantes en NKCC2 (tipo I) o ROMK (tipo II), presentan pérdida renal de sal acompañada de hipercalciuria¹⁷⁵. Segundo, los diuréticos de asa, como la furosemida, cuyo blanco terapéutico es el NKCC2, se utilizan en la clínica para tratar casos de hipercalcemia grave al promover la pérdida renal de calcio¹⁷⁶.

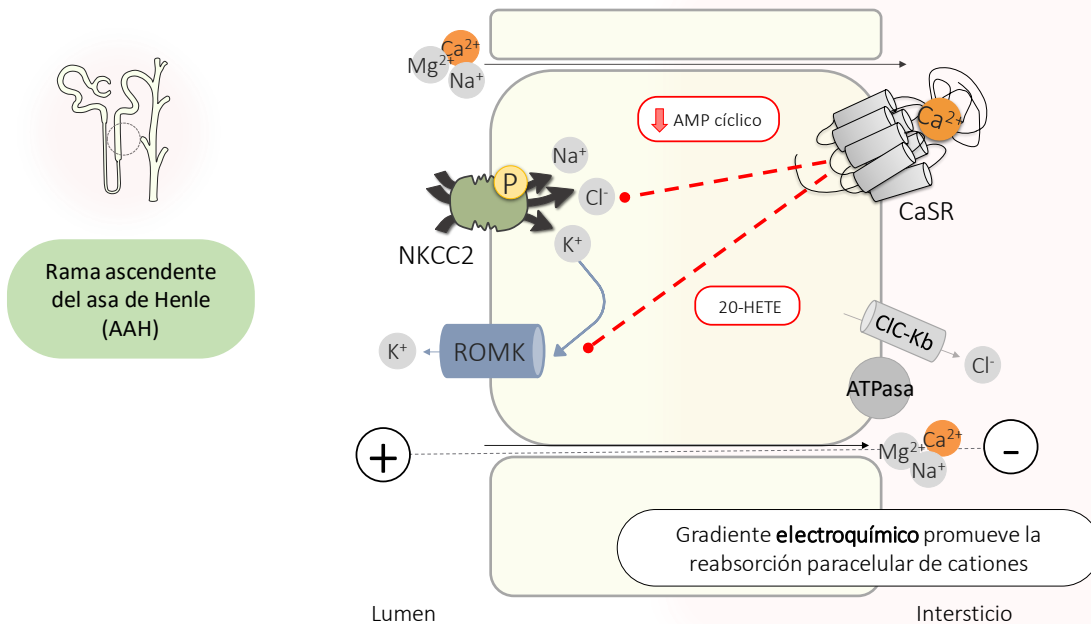


Figura 15. Reabsorción de sodio y calcio en el asa de Henle. En este segmento la reabsorción de calcio está acoplada a la de sodio, por lo tanto, a mayor reabsorción de sodio, mayor será la de calcio. El CaSR en la membrana basolateral de estas células detiene la reabsorción de calcio al inhibir a NKCC2, bajando la concentración intracelular de AMP cíclico, y a ROMK mediante la producción de eicosanoides como el 20-hidroxicosatotetraenoico (20-HETE).

El CaSR se expresa en la membrana basolateral de las células del AAH^{171,173}. En esta posición estratégica, el receptor puede detectar una mayor concentración de calcio y promover su excreción urinaria, deteniendo la actividad de NKCC2 y ROMK¹⁷⁷ (figura15). La inhibición de ROMK por el CaSR se estudió en tejido de AAH de rata con la técnica de *patch-clamp*¹⁷⁸. El

estudio demostró que, la activación del CaSR inhibe la apertura de ROMK mediante la producción de 20-HETE. *In vivo*, el resultado de inhibir a ROMK tendría que detener el reciclaje de potasio hacia el lumen y esto a su vez tendría que detener a NKCC2. Sin embargo, también se ha demostrado que la activación del CaSR en las células de la AAH baja significativamente la concentración de cAMP¹⁷⁹ y, este mecanismo *per se*, podría inhibir a NKCC2¹⁸⁰.

De esta manera, el aumento en la excreción de calcio se debe a una disminución de la reabsorción de NaCl en el AAH. Esto nos lleva a plantear una paradoja fisiológica de tener que perder NaCl siempre que el CaSR promueve la excreción de calcio. Si esto ocurriera, el organismo tendría que excretar calcio a expensas de perder NaCl y por lo tanto perder la homeostasis del medio extracelular. La manera de prevenir esta paradoja fisiológica sería recuperando NaCl en algún segmento más allá de la mácula densa, es decir en la nefrona distal.

El túbulo contorneado distal (TCD) es el siguiente segmento en donde existe una relación entre la reabsorción de calcio y sodio. El TCD reabsorbe aproximadamente 5 a 10% del sodio y del calcio filtrado, y es donde se realiza el ajuste fino de su concentración final en la orina^{10,141}. La reabsorción en el TCD tiene un impacto importante en la regulación de la concentración de NaCl del líquido extracelular ya que no se regula por el sistema de retroalimentación tubuloglomerular. En el TCD, el sodio se reabsorbe junto con cloruro de manera electroneutra a través del cotransportador apical de Na⁺-Cl⁻ sensible a tiazidas (NCC). En este segmento, el calcio se reabsorbe por una vía transcelular a través del canal de calcio TRPV5 (*“Transient Receptor Potential channel subfamily V member 5”*)³⁶. En contraste con lo que ocurre en el AAH, en el TCD la relación entre reabsorción de NaCl y calcio es inversa¹⁸¹. El aumento en la reabsorción de sodio se asocia a una menor reabsorción de calcio y viceversa. En la clínica, esta relación inversa entre la reabsorción de NaCl y calcio se ha aprovechado mediante el uso de diuréticos de tipo tiazida para promover un aumento en la reabsorción de calcio en pacientes con litiasis renal, o para tratar la hipertensión en mujeres posmenopáusicas donde los diuréticos de asa no están indicados por el peligro de perder calcio⁵³.

En el TCD, el CaSR se expresa tanto en la membrana apical como en la membrana basolateral de estas células^{171,173}. El papel del CaSR en este segmento se ha estudiado poco. Hace unos años se reportó que en un modelo *in vitro* en células HEK-293, el CaSR aumentó la actividad del canal TRPV5 a través de una vía de señalización que involucra la activación de la PKC¹⁸². Sin embargo, el papel que el receptor podría desempeñar en la regulación de la reabsorción de NaCl en el TCD no se conoce aún.

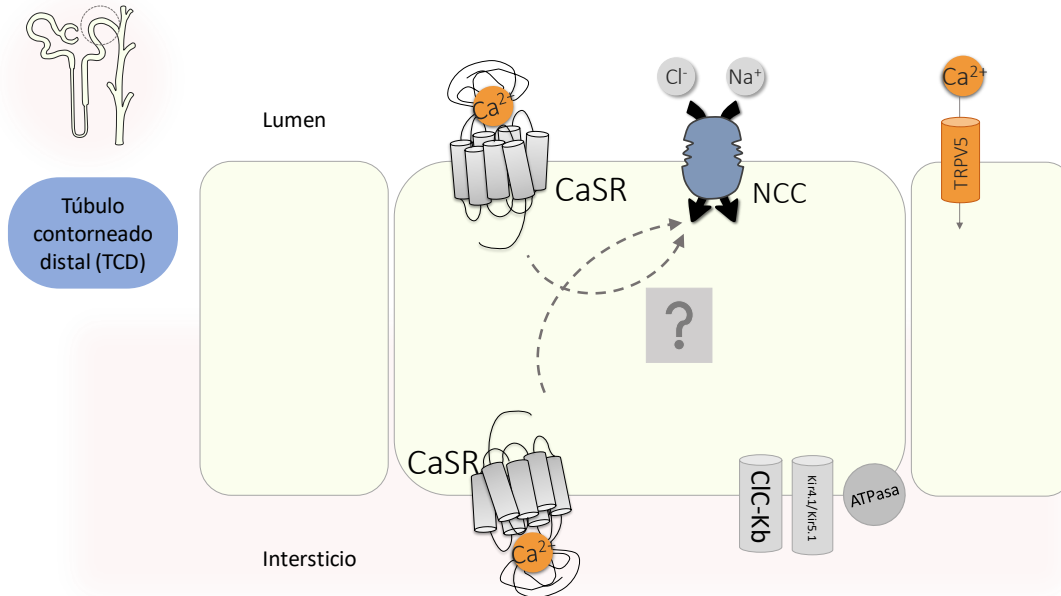


Figura 16. Reabsorción de sodio y calcio en túbulo contorneado distal. En este segmento la reabsorción de sodio es inversa a la de calcio, por lo tanto, a mayor reabsorción de sodio, menor será la de calcio. El calcio entra por una vía transeleular a través del canal transient receptor potential channel subfamily V member 5 (TRPV5). El CaSR se expresa en la membrana basolateral y apical de estas células, sin embargo, el papel que juega en la regulación de la reabsorción de sodio no se conoce aún. ¿Podrá el CaSR activar a NCC?

Regulación de NCC por otros GPCRs

Las hormonas que regulan la reabsorción de NaCl en el TCD lo hacen afectando la vía KLHL3/CUL3-WNK-SPAK-NCC. Por ejemplo, la angiotensina II regula la actividad de NCC de una manera dependiente de WNK4^{114,115}. Se ha demostrado recientemente que esta regulación se produce a través de la PKC, que fosforila directamente a WNK4 en dos sitios principales, los residuos de serina Ser64 y Ser1196, llevando a su activación¹⁴⁰. Además, se demostró que la PKC promueve la fosforilación de KLHL3 en un residuo de serina (Ser433) que se encuentra en el dominio de unión a WNK4¹⁸³. Cuando este sitio se fosforila, KLHL3 no puede unirse a WNK4 y esto evita su degradación. Los efectos de la angiotensina II en el TCD están mediados por el receptor de angiotensina tipo 1 (AT1), un GPCR pleiotrópico cuyos mecanismos de señalización intracelular son similares a los del CaSR, es decir, ambos receptores se acoplan preferentemente a las proteínas Gαq y Gαi¹⁸⁴ (Figura 17). Resulta interesante plantear que, dado que se sabe que la angiotensina II utiliza esta cascada de señalización para activar a NCC, quizá el CaSR también puede hacerlo.

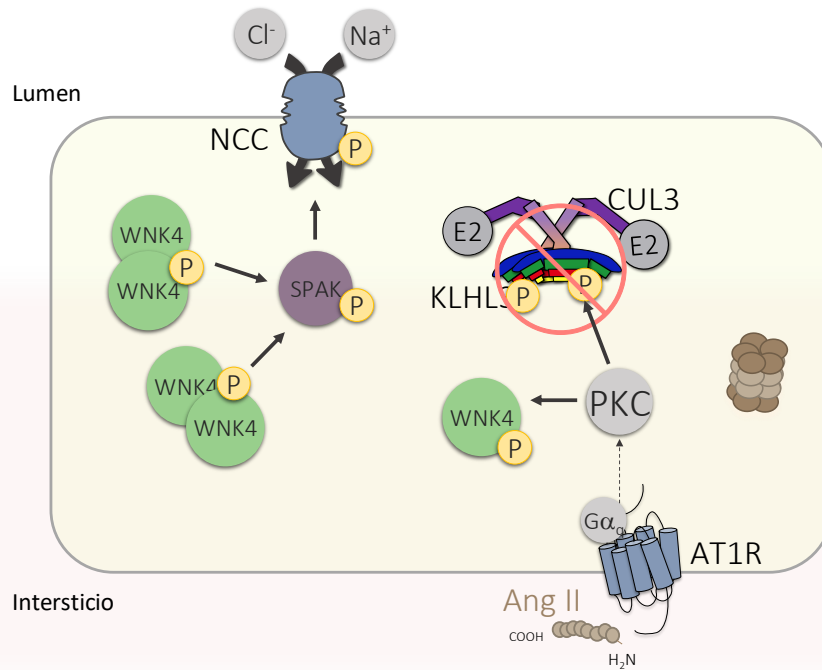


Figura 17. Regulación de NCC por el AT1R. El AT1R es el receptor gemelo del CaSR, a través de la activación de la proteína $G\alpha_q$, el receptor activa a la proteína cinasa C (PKC). La PKC fosforila a KLHL3 en el sitio de unión a WNK4, impidiendo la unión y, por lo tanto, deteniendo la degradación. Adicionalmente, fosforila directamente a WNK4 activándola.

Planteamiento del problema

En un escenario fisiológico en el que existe un aumento en la concentración de calcio en el líquido extracelular, el CaSR activa mecanismos en el riñón que promueven la excreción urinaria de calcio para normalizar los niveles de este catión. Uno de estos mecanismos es inhibir a NKCC2 y a ROMK en el AAH para disminuir la reabsorción de NaCl y, por ende, la de calcio. En este escenario el CaSR promueve la excreción de calcio a expensas de la de NaCl. La pregunta que motivó este proyecto es ¿cómo se recupera el NaCl que no se reabsorbe al inhibir a NKCC2?

Parte de esta hipótesis fue plantear que el NaCl que no se reabsorbe en el AAH se recupera en el TCD por el NCC. Activar a NCC permitiría recuperar el NaCl, al mismo tiempo que continúa, o incluso aumenta, la excreción de calcio. Si este es el caso, entonces, la siguiente pregunta sería ¿cómo se activa NCC?

Nuestra propuesta es que el calcio luminal que llega al TCD estimula al CaSR en la membrana apical que, por un efecto similar al de la angiotensina II, es decir, promueve la activación de la vía PKC-WNK4-SPAK estimulando la reabsorción de NaCl por vía de NCC.

Hipótesis

El CaSR activa a NCC por una vía dependiente de la activación de PKC y WNK4.

Objetivo principal

Determinar la vía mediante la que el CaSR activa a NCC en modelos *in vitro* e *in vivo* para proponer un mecanismo fisiológico que explique cómo la activación del CaSR promueve la excreción de calcio sin perder NaCl.

Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de la activación del CaSR sobre la actividad del NCC en un sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* para demostrar que existe una relación entre el receptor y el cotransportador.
2. Analizar el efecto en un modelo celular de riñón con el fin de acercarnos a un escenario más cercano a lo fisiológico.
3. Estudiar mutaciones activantes (CaSR-E228K) e inactivantes (CaSR-R185Q) del CaSR para estudiar detalladamente el efecto del CaSR sobre la vía de regulación del NCC.

4. Evaluar si la activación del CaSR tiene un efecto sobre NCC en un modelo *in vivo*.
5. Caracterizar la vía de señalización que utiliza el CaSR para afectar la actividad de NCC y así poder proponer un mecanismo fisiológico.

Resultados

Los resultados de este trabajo fueron publicados recientemente, el artículo se encuentra al final de este capítulo y la referencia es la siguiente:

The Calcium-Sensing Receptor Increases Activity of the Renal NCC through the WNK4-SPAK Pathway. Silvana Bazúa-Valenti, Lorena Rojas-Vega, María Castañeda-Bueno, Jonatan Barrera-Chimal, Rocío Bautista, Luz G. Cervantes-Pérez, Norma Vázquez, Consuelo Plata, Adrián R. Murillo-de-Ozores, Lorenza González-Mariscal, David H. Ellison, Daniela Riccardi, Norma A. Bobadilla and Gerardo Gamba. *J Am Soc Nephrol*, 2018; 29(7):1838-48.

Resumen de resultados

El estudio se inició examinando *in vitro* el efecto del CaSR sobre el NCC. La exposición del CaSR a su agonista, el gadolinio, en ovocitos de *Xenopus laevis* aumentó la actividad de NCC medida por la captación de $^{22}\text{Na}^+$ (sodio radiactivo) sensible a tiazidas³⁴ hasta dos veces sobre la actividad basal, pero únicamente en ovocitos que también expresaban WNK4 (Figura 1 B). En un modelo en células HEK-293, analizamos por *western blot* la fosforilación de SPAK utilizando un fosfoanticuerpo contra la Ser373, así como la expresión y fosforilación de otras proteínas de la vía. Encontramos que la activación del CaSR en las células con el calcimimético R-568 promueve la fosforilación de SPAK también de una manera dependiente de WNK4, ya que el efecto no se observó en la ausencia de la cotransfección con WNK4 (Figura 2 A y B). Además, observamos que una variante del CaSR que contiene una mutación activante del receptor, CaSR-E228K, aumenta la abundancia de WNK4 (Figura 3) en las células a través de un mecanismo que implica la fosforilación e inhibición de KLHL3 por PKC (Figura 4 A y B). La mutante inactivante R185Q no tiene ningún efecto sobre KLHL3 y WNK4.

In vivo, la administración del calcimimético R-568 (3 $\mu\text{g/g}$ de ratón por 3 horas) en ratones silvestres promueve la fosforilación de NCC y aumenta la abundancia de WNK4 (Figura 5 C y D). Tanto *in vitro* como *in vivo*, el CaSR promueve la fosforilación por PKC de WNK4 en los sitios previamente descritos en el contexto de la activación por angiotensina II¹⁴⁰ (Figura 4 D y 5 C, respectivamente).

Es interesante señalar que el efecto del calcimimético no fue significativo en ratones SPAK^{T243A/T243A}, en donde la cinasa SPAK no es funcional, argumentando a favor de que el efecto del CaSR sobre NCC depende de la vía WNK4-SPAK (Figura 5 F y G).

Finalmente, para asegurarnos de que el efecto *in vivo* no fue secundario a algún efecto extrarrenal del calcimimético, estudiamos el efecto del R-568 utilizando una estrategia de perfusión renal *ex vivo* y encontramos que la perfusión del riñón con el calcimimético promueve la fosforilación de SPAK y NCC (Figura 7). En conjunto, nuestros datos apoyan sólidamente la hipótesis de que el CaSR modula la actividad NCC.

Resultados no publicados

Para detallar el papel de NCC en la recuperación del sodio que no se reabsorbe en la rama ascendente del asa de Henle por efecto de la inhibición de NKCC2 por el CaSR, estudiamos el efecto natriurético (excreción de sodio) del calcimimético en ratones silvestres. Para estos experimentos recolectamos orina basal, 6 horas y 24 horas después del tratamiento con el R-568 (3 µg/g de ratón), con hidroclorotiazida (50 µg/g de ratón), o bien con los dos fármacos juntos. Encontramos que, a las 6 horas de la administración, el R-568, a diferencia de la hidroclorotiazida, no causa natriuresis significativa. Sin embargo, cuando los fármacos se administran juntos, el efecto natriurético se potencia. Estos resultados sugieren que el calcimimético por sí solo no excreta cantidades de sodio significativas porque se está recuperando, pero cuando al mismo tiempo se inhibe NCC con hidroclorotiazida, el sodio se deja de recuperar y se pierde en la orina.

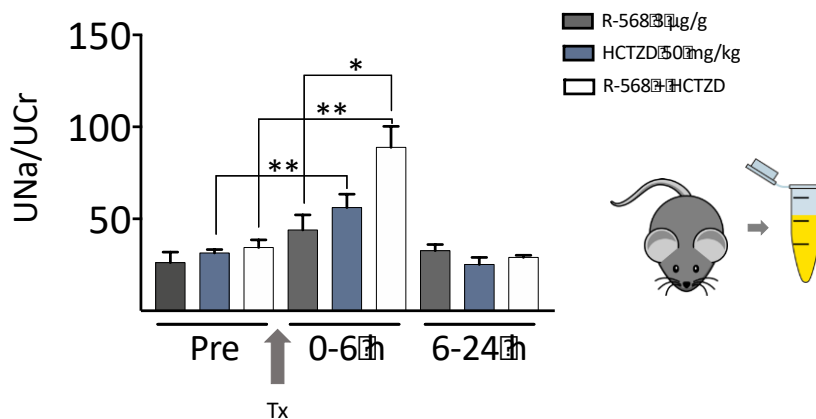


Figura 18. Excreción de sodio urinario después del tratamiento con calcimimético R-568 (barras grises), hidroclorotiazida (HCTZD) (barras azules) y los dos fármacos juntos (barras blancas). La excreción basal se tomó en el mismo tiempo que las orinas 0-6 pero un día antes del experimento. La flecha marca el momento en el que se administró el tratamiento (Tx). n = 5 ratones por grupo, *p<0.05 vs. R-568 vs. R-568 + HCTZD **p<0.05 vs. la orina basal (Pre).

Conclusiones

- i) El CaSR puede activar a NCC.
- ii) Esta activación de NCC es dependiente de la vía WNK4-SPAK.
- iii) El CaSR enciende una cascada de señalización que involucra la fosforilación por PKC de KLHL3 y WNK4, lo que se traduce en un aumento de WNK4 que además se fosforila y activa, también por PKC.
- iv) La mutación activante del CaSR, E228K aumenta la fosforilación de KLHL3 en los sitios consenso de PKC y en consecuencia aumenta la abundancia de WNK4 en células HEK-293.
- v) La activación del CaSR y la consecuente fosforilación de NCC puede ocurrir por un aumento de calcio únicamente luminal, ya que la administración de furosemida en ratones silvestres también aumenta la fosforilación de WNK4 por PKC y de NCC.

Discusión y perspectivas

En este trabajo, demostramos que la activación del CaSR se asocia con una mayor actividad de NCC *in vivo* e *in vitro*. El efecto del CaSR sobre NCC implica la activación de la vía WNK4-SPAK-NCC por la PKC. Estos efectos del CaSR en la vía KLHL3-WNK4-SPAK-NCC son similares a los descritos anteriormente para la angiotensina II^{140,183}, que se sabe señala a través de una vía AT1R-Gαq-PKC, como lo hace CaSR.

La respuesta fisiológica a un aumento de calcio en el líquido extracelular requiere que el riñón promueva la excreción de calcio, a expensas de la excreción de otros minerales en la rama ascendente del asa de Henle (AAH), por ejemplo, de la excreción de NaCl. El CaSR en la membrana basolateral del AAH inhibe a NKCC2 y ROMK para detener la reabsorción paracelular de calcio¹³. Lo anterior plantea una paradoja fisiológica consistente en la pérdida de sodio cada que vez que el organismo necesite perder calcio. Los resultados de este trabajo plantean un nuevo mecanismo para responder la pregunta de qué le pasa al sodio cuando el CaSR inhibe a NKCC2, que permite integrar la homeostasis del sodio y calcio en este contexto. En el túbulo contorneado distal (TCD), el CaSR en la membrana apical responde al aumento de calcio luminal encendiendo una respuesta CaSR-Gαq-PKC-WNK4 que promueve la activación de SPAK y NCC para recuperar el sodio que no se reabsorbió en el AAH (Figura. 19). Además, dado que se sabe que el aumento de la reabsorción de sal en el TCD se asocia a la disminución de la reabsorción de calcio, este mecanismo no solo recupera el sodio, sino que también puede promover la hipercalcemia.

Anteriormente se describió un mecanismo similar en la nefrona que involucra al CaSR. En la clínica se sabe que la hipercalcemia induce poliuria¹⁸⁵. Se trata de un mecanismo compensatorio en el que el aumento de calcio luminal en el conducto colector detiene la reabsorción de agua para diluir el calcio y prevenir la precipitación de sales de calcio y fosfato en forma de litiasis renal. Sands *et al.* demostraron que el CaSR apical en el conducto colector responde al aumento de calcio luminal y bloquea la inserción de acuaporina 2 en la membrana apical de las células del colector¹⁸⁶. La acuaporina 2 es un canal de agua regulado por vasopresina específico del conducto colector¹⁸⁷. Los autores también demostraron que la vía de señalización y los mecanismos moleculares iniciados por el CaSR dependen de las proteínas Gαq y PKC. Esto último apoya nuestras observaciones, ya que la vía de señalización del CaSR y su funcionalidad en la nefrona ya está establecida.

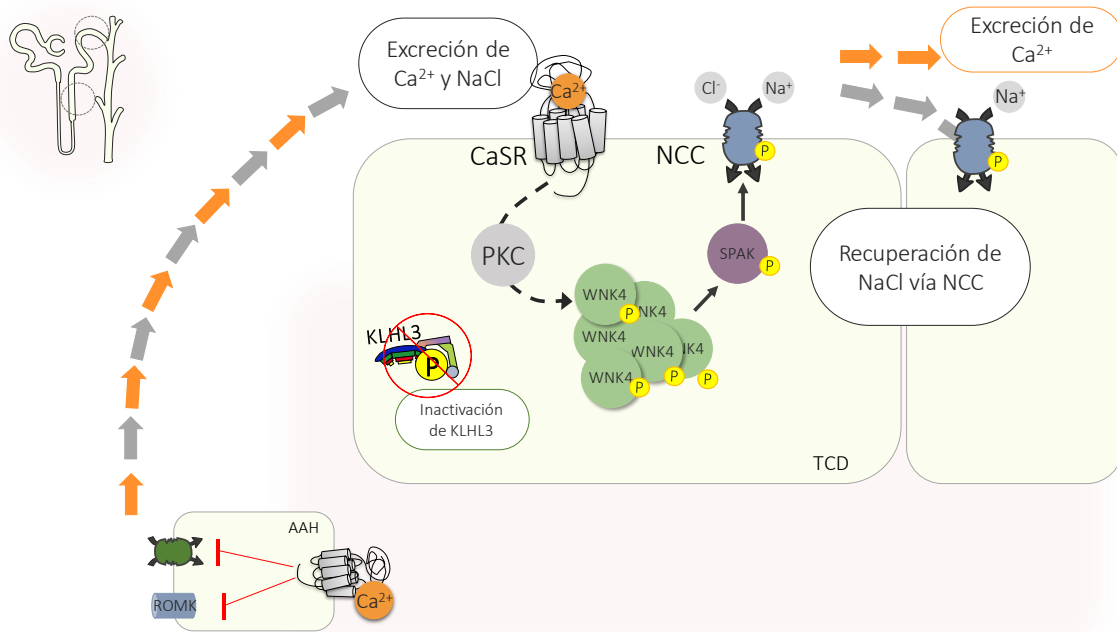







Figura 19. Modelo propuesto para la activación de NCC por el CaSR a través de una vía PKC-WNK4-SPAK. El aumento de calcio extracelular lleva a la inhibición de NKCC2 y ROMK mediada por CaSR en la rama ascendente del asa de heble (AAH). Esto detiene la diferencia de voltaje transepitelial que promueve la reabsorción paracelular del calcio. La reducción de la reabsorción de calcio en el AAH sucede a expensas de la reabsorción de NaCl por NKCC2. En el túbulo contorneado distal (TCD), el CaSR responde al aumento de calcio luminal para integrar la homeostasis de calcio y NaCl y evitar la pérdida de NaCl. Proponemos la existencia de un mecanismo en el TCD en el que el CaSR apical enciende una vía de señalización Gq-PKC-WNK4 que promueve la activación de NCC.

Nuestros resultados arrojan luz sobre las diferentes funciones que el CaSR tiene en la nefrona, específicamente el efecto sobre la reabsorción de sodio en el TCD, lo que constituye un fenómeno fisiológico fundamental que no se conocía hasta ahora. Estas observaciones pueden tener implicaciones hacia el entendimiento de algunas patologías. Por ejemplo, existe una alta prevalencia de hipertensión en pacientes con hiperparatiroidismo primario; sin embargo, los mecanismos moleculares que causan la hipertensión en estos pacientes son controversiales y aunque se han propuesto algunos que involucran los dos rasgos característicos o *hallmarks*, PTH y calcio elevados, la cuestión todavía no se entiende por completo^{188,189}. Uno de los mecanismos propuestos que podría explicar la relación causa-efecto entre hiperparatiroidismo e hipertensión, es el efecto que tiene el exceso de PTH sobre el aumento de actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAS)¹⁹⁰. Sin embargo, hay estudios que sugieren que bloquear la angiotensina, o el nivel de activación del sistema RAAS, no tiene ningún efecto sobre la reducción de la presión arterial. Aunque estos estudios tienen limitaciones como el tamaño de la muestra y sin duda ameritan una investigación más extensa, los resultados argumentan a favor de la presencia de mecanismos

adicionales al sistema RAAS, entre otros, un efecto directo del calcio sobre la vasoconstricción o sobre la contracción cardíaca¹⁹¹. Resulta interesante pensar en el efecto que podría tener el CaSR tanto a nivel vascular como a nivel renal, ahora que sabemos que el CaSR pueda aumentar la reabsorción distal de sodio. En el caso hipotético de que la activación de NCC sea uno de los mecanismos que contribuyen a la hipertensión en esta patología, se esperaría que la presencia de angiotensina II también active a NCC y, entonces, que estos efectos sean aditivos.

En un estudio reciente se demostró que la glucosa y otros azúcares actúan como moduladores alostéricos positivos del CaSR, es decir, la presencia de glucosa hace al CaSR más sensible a la concentración de calcio¹⁹². Este hallazgo puede ser irrelevante con respecto a la mayoría de las células del organismo, ya que continuamente están en contacto con una concentración constante de glucosa. Sin embargo, las células del TCD son una excepción, ya que en individuos sanos toda la glucosa filtrada se reabsorbe en el túbulo proximal por el cotransportador SGLT2 y, por lo tanto, la membrana apical del TCD no se expone a glucosa. Esto cambia, sin embargo, en pacientes con diabetes mellitus, pues la cantidad de glucosa filtrada en el glomérulo rebasa la capacidad de reabsorción del túbulo proximal, por lo que escapa a la reabsorción y llega al lumen del TCD. Una hipótesis que ahora planteamos es si la llegada de glucosa al TCD puede tener un efecto alostérico positivo sobre el CaSR. En consecuencia, esto activaría al receptor a concentraciones de calcio que normalmente no lo harían y también promovería la activación de NCC. Este aumento de la actividad de NCC y la reabsorción de sodio distal podría contribuir a la fisiopatología de la hipertensión arterial en esta patología, que también tiene una prevalencia común¹⁹³.

The Calcium-Sensing Receptor Increases Activity of the Renal NCC through the WNK4-SPAK Pathway

Silvana Bazúa-Valenti ^{1,2}, Lorena Rojas-Vega,² María Castañeda-Bueno,² Jonatan Barrera-Chimal,¹ Rocío Bautista,³ Luz G. Cervantes-Pérez,⁴ Norma Vázquez,¹ Consuelo Plata,² Adrián R. Murillo-de-Ozores,^{1,2} Lorenza González-Mariscal,⁵ David H. Ellison ^{6,7}, Daniela Riccardi ⁸, Norma A. Bobadilla ^{1,2} and Gerardo Gamba ^{1,2,9}

¹Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ²Department of Nephrology and Mineral Metabolism, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; ³Departments of Molecular Biology and ⁴Pharmacology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico; ⁵Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), Mexico City, Mexico; ⁶Department of Medicine, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon; ⁷Renal Section, Veterans Administration Portland Health Care System, Portland, Oregon; ⁸School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom; and ⁹Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, Nuevo León, Mexico

ABSTRACT

Background Hypercalciuria can result from activation of the basolateral calcium-sensing receptor (CaSR), which in the thick ascending limb of Henle's loop controls Ca^{2+} excretion and NaCl reabsorption in response to extracellular Ca^{2+} . However, the function of CaSR in the regulation of NaCl reabsorption in the distal convoluted tubule (DCT) is unknown. We hypothesized that CaSR in this location is involved in activating the thiazide-sensitive NaCl cotransporter (NCC) to prevent NaCl loss.

Methods We used a combination of *in vitro* and *in vivo* models to examine the effects of CaSR on NCC activity. Because the KLHL3-WNK4-SPAK pathway is involved in regulating NaCl reabsorption in the DCT, we assessed the involvement of this pathway as well.

Results Thiazide-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake assays in *Xenopus laevis* oocytes revealed that NCC activity increased in a WNK4-dependent manner upon activation of CaSR with Gd^{3+} . In HEK293 cells, treatment with the calcimimetic R-568 stimulated SPAK phosphorylation only in the presence of WNK4. The WNK4 inhibitor WNK463 also prevented this effect. Furthermore, CaSR activation in HEK293 cells led to phosphorylation of KLHL3 and WNK4 and increased WNK4 abundance and activity. Finally, acute oral administration of R-568 in mice led to the phosphorylation of NCC.

Conclusions Activation of CaSR can increase NCC activity via the WNK4-SPAK pathway. It is possible that activation of CaSR by Ca^{2+} in the apical membrane of the DCT increases NaCl reabsorption by NCC, with the consequent, well known decrease of Ca^{2+} reabsorption, further promoting hypercalciuria.

J Am Soc Nephrol 29: ●●-●●, 2018. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2017111155>

The calcium-sensing receptor (CaSR) is a member of class C of the G protein-coupled receptors (GPCR) and its role is to constantly monitor Ca^{2+} in the extracellular environment.¹ In the kidney, CaSR is essential for sensing Ca^{2+} in both the urinary filtrate and interstitial fluid to adequately modulate calcium excretion. To achieve this, CaSR is expressed all along the nephron.²⁻⁵

Received November 3, 2017. Accepted April 10, 2018.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Gerardo Gamba, Molecular Physiology Unit, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico. Email: gamba@biomedicas.unam.mx

Copyright © 2018 by the American Society of Nephrology

Ca²⁺ and salt (NaCl) handling in the kidney are particularly integrated in two segments of the nephron: the thick ascending limb of Henle's loop (TALH) and the distal convoluted tubule (DCT). In the TALH Ca²⁺ is reabsorbed by a paracellular route, a process which is largely dependent on NaCl reabsorption.^{6,7} Apical NaCl influx *via* the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is accompanied by potassium recycling to the lumen, through the apical renal outer medullary K⁺ channel (ROMK, KCNJ1), and by the basolateral extrusion of NaCl by the Na⁺/K⁺-ATPase and the chloride channel Kb (CLCNKB).⁸ The apical recycling of K⁺ generates a transepithelial voltage difference providing a driving force that drags paracellular reabsorption of cations, among them, Ca²⁺.⁹ Consequently, a positive correlation exists between NaCl and Ca²⁺ reabsorption in this nephron segment. For instance, patients with Bartter syndrome exhibit a salt-losing nephropathy and hypercalciuria.¹⁰ Likewise, clinicians have taken advantage of this positive correlation phenomenon by using loop diuretics to treat hypercalcemia.¹¹

In the TALH, CaSR is expressed in the basolateral membrane^{2,5} where it senses increased interstitial Ca²⁺ and promotes its urinary excretion by halting NKCC2 and ROMK activity.^{4,12–15} In this manner, the increase in Ca²⁺ excretion is due to decreased NaCl reabsorption in the TALH that must be reabsorbed beyond the macula densa. Indeed, gain-of-function mutations of CaSR have been reported to produce a Bartter-like syndrome.^{16,17}

The DCT reabsorbs approximately 5%–10% of the filtered NaCl and Ca²⁺.^{6,7,18} Its effect on BP and Ca²⁺ excretion is prominent because NaCl reabsorption beyond the macula densa is not regulated by tubuloglomerular feedback and no specific Ca²⁺ reabsorption pathways are present beyond this point.⁷ In the DCT, reabsorption of NaCl occurs through the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC), whereas that of Ca²⁺ occurs through the apical transient receptor potential cation channel subfamily V (TRPV5).¹⁸ In this part of the nephron, NaCl and Ca²⁺ transport occurs in opposite directions; increased NaCl reabsorption is associated with decreased Ca²⁺ reabsorption.¹⁹ For instance, patients with Gitelman syndrome present a salt-losing nephropathy accompanied by hypocalciuria.²⁰ Clinicians have taken advantage of this inverse reabsorption by using thiazide diuretics to promote Ca²⁺ reabsorption in patients with urolithiasis.²¹ The exact mechanism for this inverse relationship is still unclear. CaSR is expressed both in the basolateral and apical membranes of DCT cells.^{4,5,22} However, the role CaSR might play in regulating NaCl reabsorption in this nephron segment is not known.

The activity of NCC is modulated by a kinase pathway consisting of the with-no-lysine-kinases (WNKs) acting upon the Ste20-related proline alanine-rich kinase (SPAK).²³ Active WNK kinases phosphorylate SPAK,²⁴ which subsequently phosphorylates and activates NCC.²⁵ Two proteins, Cullin 3 (CUL3) and Kelch-like 3 (KLHL3), are part of an E3-RING ubiquitin ligase complex that in turn regulates WNK kinases. KLHL3 specifically binds to WNKs marking them for

Significance Statement

Extracellular calcium modulates calciuria by acting on the basolateral membrane calcium-sensing receptor (CaSR) of the thick ascending limb of Henle's loop (TALH), reducing calcium reabsorption at the expense of apical NaCl absorption. CaSR is also expressed in the apical membrane of the distal convoluted tubule. Here, we show using *in vitro* and *in vivo* models that stimulation of the CaSR induces activation of the NaCl cotransporter (NCC), by a pathway that involves a PKC-induced activation of the KLHL3-WNK4-SPAK pathway that ultimately phosphorylates NCC, increasing its activity. This study proposes a mechanism through which NaCl reabsorption is upregulated beyond the TALH to recover NaCl, while calcium is excreted.

degradation.^{26,27} Disease-causing mutations in WNK4, KLHL3, or CUL3 result in impaired degradation of WNK kinases leading to increased NCC activity that results in a syndrome called pseudohypoaldosteronism type II.^{28,29}

Hormones that regulate NaCl reabsorption in the DCT do so by affecting the KLHL3-WNK-SPAK-NCC pathway. Angiotensin II (AngII) regulates NCC activity in a WNK4-dependent manner.^{30,31} This regulation occurs *via* protein kinase C (PKC), which directly phosphorylates WNK4 in two main sites, S64 and S1196, increasing WNK4 activity.³² PKC also promotes phosphorylation of KLHL3 in a serine residue (S433) that lays in the WNK4-binding domain preventing degradation of WNK4.³³ The effects of AngII in the DCT are mediated by the AT1 receptor, a pleiotropic GPCR whose intracellular signaling mechanisms are similar to that of CaSR.³⁴ Both receptors are preferentially coupled to Gαq and thus activate PLC transduction pathway, increasing intracellular Ca²⁺ and activating PKC.^{14,35} In this work, using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, we sought to test the hypothesis that activation of CaSR modulates NCC activity through the KLHL3-WNK4-SPAK pathway.

METHODS

In Vitro Experiments

To test the effects of CaSR on NCC activity *in vitro* we assessed NCC activity in *Xenopus laevis* oocytes by measuring tracer ²²Na⁺ uptake when CaSR was stimulated with gadolinium chloride (GdCl₃), as described in the complete methods (Supplemental Material). In mammalian cells, the effect of CaSR activation was assessed in HEK-293 cells transiently transfected with CaSR wild type (WT), CaSR mutants, mWNK4-HA, and hSPAK-GFP-HA, with/without KLHL3 and mWNK4-5A-HA mutant. Cells were stimulated with the calcimimetic NPS R-568 (R-568) (Tocris Biosciences) and SPAK phosphorylation, and WNK4 abundance and phosphorylation were assessed by western blot analysis (complete methods, Supplemental Material).

In Vivo Experiments

To test the effect of activating CaSR on the WNK4-SPAK-NCC pathway *in vivo* we used C57BL/6 male mice, 12–16 weeks old,

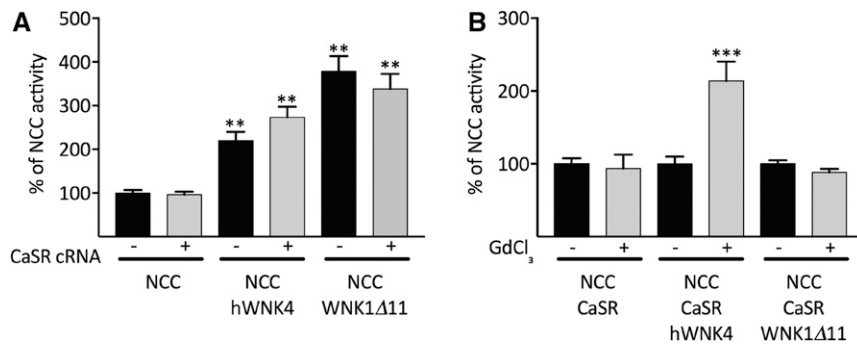


Figure 1. CaSR activates NCC in a WNK4-dependent manner in *X. laevis* oocytes. (A) The presence of non-activated CaSR has no effect on WNK4- or WNK1-induced activation of NCC. Functional expression assay shows the thiazide-sensitive Na⁺ uptake in groups of oocytes injected with NCC, NCC+hWNK4, and NCC+WNK1Δ11 cRNA (black bars), or together with CaSR cRNA (gray bars), as stated. Uptake in oocytes injected with NCC cRNA alone was arbitrarily set to 100% and the corresponding groups were normalized accordingly. ***P*<0.01 versus NCC. (B) Activation of CaSR with GdCl₃ increased the activity of NCC only in the presence of WNK4. Uptake was performed in control conditions (black bars) or after stimulation with GdCl₃ 80 μM for 15 minutes. Each group in control conditions (black bars) was arbitrarily set to 100% and the corresponding group with GdCl₃ was normalized accordingly (gray bars). ****P*<0.001 versus its own control. Supplemental Figure 1 shows the same experiments but with data expressed as picomoles per oocyte per hour. cRNA, complementary RNA.

exposed to vehicle or R-568 (3.0 μg/g of weight) by oral gavage,^{36,37} or a single furosemide (Sigma) ip dose of 15 mg/kg⁵⁸. Three hours later, kidneys were extracted and proteins were prepared for western blot (complete methods, Supplemental Information). We also used *ex vivo* kidney preparations such as the Langendorff system, as previously described.^{38,39} Kidneys were perfused with vehicle or the calcimimetic, R-568, at a rate of 0.60 μg/ml per minute for 30 minutes.

Statistical Analyses

Unpaired *t* test (two tailed) was used for comparison between two groups. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed for comparison between multiple groups. *P*<0.05 was considered significant. Values are reported as mean ± SEM.

RESULTS

CaSR Activates NCC in a WNK4-Dependent Manner in *X. laevis* Oocytes

Xenopus oocytes were coinjected with WT CaSR and NCC cRNA, with or without WNK4 or WNK1 cRNA, and subjected to thiazide-sensitive tracer ²²Na⁺ transport assays as previously reported.⁴⁰ Coexpressing NCC with WNK4 or WNK1 promoted marked increases in basal NCC activity of two- and four-fold (*P*<0.01), respectively (Figure 1A), as previously described.^{41,42} However, this increase was not affected by the presence of CaSR (Figure 1A). Thus, unstimulated CaSR by

itself had no effect on NCC activity. We then tested the effect of CaSR stimulation in the absence or presence of WNK1 or WNK4 kinases. As Figure 1B shows, after exposing oocytes to the type 1 CaSR agonist, Gd³⁺, NCC uptake increased two-fold (*P*<0.001) only in oocytes coexpressing both CaSR and WNK4 (Figure 1B). We observed no effect of Gd³⁺ in oocytes injected with NCC+CaSR or NCC+WNK1Δ11+CaSR. These results suggest that, similar to the effects of AngII,^{30,31} WNK4 is required for the activation of CaSR to have an effect on NCC.

CaSR Phosphorylates SPAK in a WNK4-Dependent Manner in HEK-293 Cells

To test whether the CaSR-NCC effect could also be observed in a human cell model, we analyzed the effects of activating CaSR on SPAK phosphorylation (pSPAK), as a surrogate of SPAK-NCC activation by WNKs in HEK-293 cells.²⁴ Cells were transiently transfected with SPAK-GFP-HA, WNK4-HA, and CaSR and then treated with the calcimimetic

R-568.^{43–45} Results show that R-568 induced a time- and dose-dependent pSPAK increase in cells fasted in a serum-free medium (Supplemental Figure 2, A and B). We next evaluated the role of WNK4 on SPAK phosphorylation by CaSR. HEK-293 cells were transfected with SPAK-GFP-HA, CaSR, and/or WNK4-HA. In cells transfected with CaSR alone, pSPAK did not increase after treatment with the calcimimetic. Only in the presence of CaSR and WNK4 together did the calcimimetic promote a significant increase in pSPAK (*P*<0.05) (Figure 2, A and B). To further test that WNK4 is required for translating CaSR activation to SPAK phosphorylation, we assessed the effect of the highly specific WNK inhibitor, WNK463,⁴⁶ on CaSR-induced SPAK phosphorylation. As shown in Figure 2, C and D, the positive effect of R-568 on pSPAK was completely prevented by the presence of WNK463 inhibitor, confirming that in mammalian cells the effect of CaSR is WNK4-dependent. It is known that CaSR activation leads to activation by phosphorylation of the mitogen-activated protein kinase ERK1,2.⁴⁷ Therefore, we analyzed ERK1,2 phosphorylation to verify CaSR activation in these experiments. As shown in Figure 2A, a clear functional activation of CaSR was achieved with R-568 in CaSR-transfected cells, as demonstrated by increased ERK1,2 phosphorylation, but SPAK phosphorylation by CaSR only increases in the presence of WNK4.

An Activating Mutation of CaSR Increases WNK4 Abundance

Mutations in the *CASR* gene result in Mendelian disorders characterized by altered Ca²⁺ homeostasis.⁴⁸ Activating mutations of the receptor cause autosomal dominant

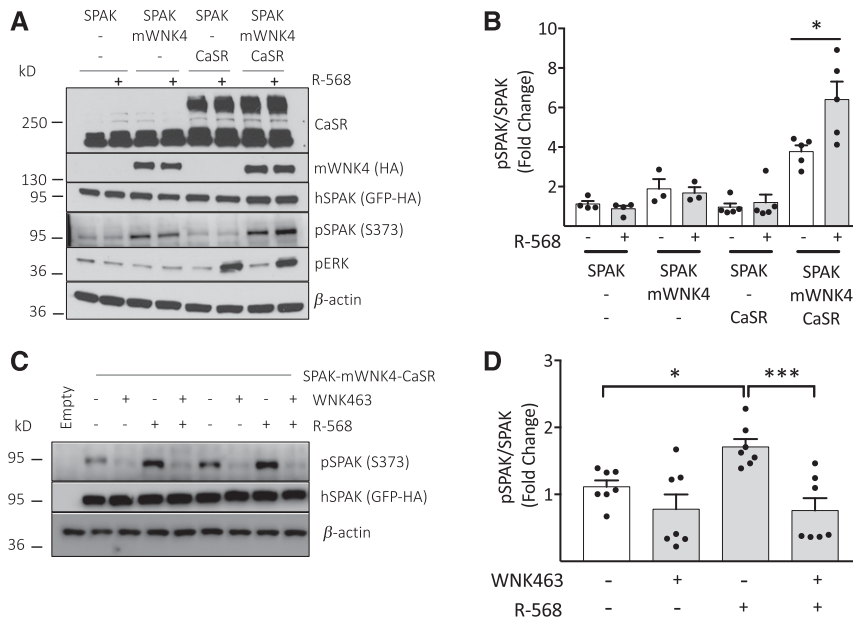


Figure 2. CaSR phosphorylates SPAK in a WNK4-dependent manner in HEK-293 cells. (A) Representative immunoblot of cells transfected with hSPAK-GFP-HA, mWnk4-HA, and hCaSR in different combinations, as stated. The day before the experiment, cells were serum-starved in the normal growth medium and left overnight. The next day, cells were stimulated with R-568 (200 nM) for 30 minutes. (B) Densitometric analysis of (A). SPAK transfection alone in control conditions was arbitrarily set to 1 and the corresponding groups were normalized accordingly. Bars represent mean \pm SEM of at least three independent experiments. * P <0.05 versus control. (C) Representative immunoblot showing two experiments of cells transfected with empty vector (Empty), hSPAK-GFP-HA, mWnk4-HA, and hCaSR and treated as in (A). The WNK inhibitor Wnk463 was added to the medium for 2 hours on the day of the experiment to a final concentration of 4 μ M. (D) Densitometric analysis of (C). SPAK in control conditions was arbitrarily set to 1 and the corresponding groups were normalized accordingly. Bars represent mean \pm SEM of at least three independent experiments. * P <0.05 versus control (no stimulation with R-568 and no Wnk463). *** P <0.01 versus R-568.

hypocalcemia, whereas inactivating mutations cause dominant familial hypocalciuric hypercalcemia or recessive neonatal severe hyperparathyroidism.^{15,49,50} We used two reported mutations, one activating, CaSR-E228K, and one inactivating, CaSR-R185Q, to assess their effects on the WNK4-SPAK-NCC pathway.^{51–53} We transfected HEK-293 cells with the WT CaSR or the mutants with WNK4 and observed that CaSR-E228K increased WNK4 abundance (Figure 3, A and C). We reasoned that if CaSR was acting by the same signal transduction pathway as the AT1 receptor, the presence of KLHL3 would enhance this effect on WNK4. As expected, cotransfection of KLHL3 induced a significant decrease of WNK4 abundance (Figure 3, A and B) that was prevented by CaSR-E228K, but not by CaSR-R185Q, establishing a significant KLHL3-dependent increase in WNK4 total protein levels only in the presence of the active mutant CaSR-E228K (Figure 3D). These results are consistent with the proposal that active CaSR may elicit the same signal transduction pathway as that of AT1

receptor, resulting in decreased degradation of WNK4, likely due to inhibition of KLHL3.³³

CaSR Promotes KLHL3 and WNK4 Phosphorylation by PKC

Two previous studies have demonstrated that AngII effects on WNK4 are due to a G α q-PKC signaling transduction pathway.^{32,33} To further determine whether CaSR activation elicited similar effects, we assessed if PKC-mediated phosphorylation of KLHL3 and WNK4 occurred after CaSR activation. KLHL3-Flag was immunoprecipitated from lysates of HEK-293 cells cotransfected with CaSR WT or CaSR mutants and subjected to immunoblotting with an mAb that recognizes PKC phosphorylation site, pRRXS.^{32,33,54} In the presence of the active mutant CaSR-E228K, KLHL3 pRRXS phosphorylation remarkably increased (P <0.01), whereas this was not observed with the inactive mutant CaSR-R185Q (Figure 4A). If PKC was responsible for these effects, we would expect that inhibition of PKC would prevent CaSR-induced pRRXS increase in KLHL3. As shown in Figure 4B, bisindolylmaleimide I, used at a concentration considered to be an inhibitor of PKC,⁵⁵ significantly reduced KLHL3 pRRXS phosphorylation.

We next evaluated if CaSR-induced activation of PKC also promoted WNK4 phosphorylation. To this end we analyzed whether activating CaSR in HEK-293 cells with R-568 promoted phosphorylation of a key WNK4 PKC phosphorylation site, serine residue S1196.³² After transfection of WNK4-HA, SPAK-GFP-HA, and CaSR, incubation with the calcimimetic resulted in a clear increase in S1196 phosphorylation P <0.05 (Figure 4C). Because the experiment was done with an acute CaSR activation of 30 minutes, no changes were seen in total WNK4 abundance; however, activation by phosphorylation of this site has been previously established³², partially explaining why we can see an effect before WNK4 abundance increases. Furthermore, we used a WNK4 mutant that has all five serines of the PKC consensus sites (RRXS sites) mutated to alanines (WNK4-5A), which prevents PKC-induced phosphorylation.³² The 5A mutation did not alter WNK4 abundance but remarkably reduced the CaSR effect on SPAK phosphorylation (Figure 4D), suggesting that phosphorylation of these sites, and the consequent activation of WNK4 by PKC, is necessary for the complete effect of CaSR on the WNK4-SPAK pathway.

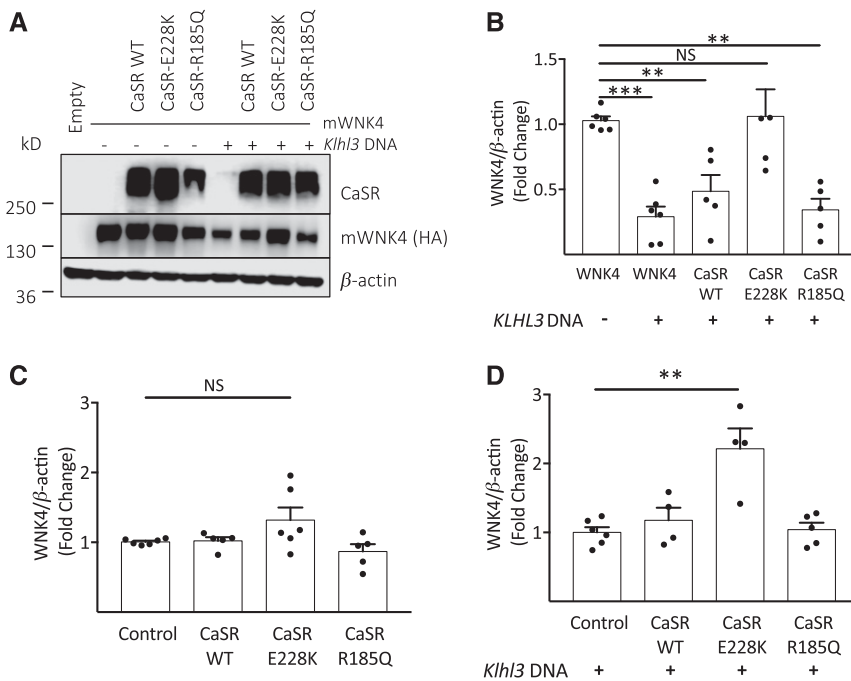


Figure 3. An activating mutation of CaSR increases WNK4 abundance. (A) Representative immunoblot of HEK-293 cells transfected with mWNK4-HA, hCaSR WT, and CaSR mutants with or without *KLHL3* DNA (40 ng). For this set of experiments, cells were maintained in normal growth medium after transfection. (B) Densitometric analysis of (A), where the expression of WNK4 alone (WNK4) was set to 1 and the rest of the groups were normalized accordingly. Bars represent mean \pm SEM of at least three independent experiments. *** $P < 0.001$ and ** $P < 0.05$ versus WNK4. (C and D) Densitometric analysis where WNK4 (Control) (C) without *KLHL3* cotransfection or (D) with *KLHL3* were set to 1 and the rest of the groups were normalized accordingly. Bars depict mean \pm SEM of at least three independent experiments. ** $P < 0.001$ versus WNK4+*KLHL3* (Control of [D]).

CaSR Promotes NCC Phosphorylation *In Vivo*

To define whether the CaSR effect on NCC occurred *in vivo*, we administered C57BL/6 male WT mice with an acute oral treatment of R-568 (3 μ g/g body wt)^{36,37} and, 3 hours later, mice were euthanized to investigate the effects on NCC phosphorylation by immunoblotting. Calcimimetics directly target the TALH CaSR function,¹² thereby decreasing NKCC2 activity (hence, phosphorylation) and promoting increased luminal Ca^{2+} and NaCl delivery to the distal nephron.¹² To test if this effect occurred in our *in vivo* model we assessed NKCC2 phosphorylation after the administration of the calcimimetic. Figure 5, A and B, shows that mice treated with the calcimimetic exhibited a significant decrease of NKCC2 phosphorylation $P < 0.05$.

Activation of NCC is associated with increased phosphorylation of three residues, T55, T60, and S73, in human NCC^{25,56}; therefore, phosphorylation of any of these residues has been extensively used as surrogate of NCC activation.⁵⁶ As expected, treatment with the calcimimetic induced a 1.5-fold increase in NCC phosphorylation ($P < 0.05$) (Figure 5, C and D), without promoting changes in total NCC (NCC/ β -actin 1.00 versus 0.96531, $P = NS$). Moreover, in concordance with

our *in vitro* data, activation of CaSR resulted in a significant increase in total WNK4 protein (1.7-fold increase, $P < 0.05$) (Figure 5, C and D). To evaluate if the increased WNK4 protein was activated by PKC, we analyzed the phosphorylation of residue S64, as previously reported.³² We found that most of the WNK4 protein in the calcimimetic-administered group was phosphorylated in S64 (Figure 5C). However, the pS64/WNK4 ratio between vehicle and R-568 groups remained similar (pS64/WNK4 1.00 versus 1.3050, $P = NS$). The absence of significance between the vehicle- and R-568-administered groups could be due to the concurrent increase in WNK4 protein. Additionally, immunofluorescence microscopy of kidneys extracted from WT mice showed increased membrane abundance after an acute dose of the calcimimetic (Figure 5E). Interestingly, the increase in NCC phosphorylation was not present in knock-in mice in which SPAK cannot be activated by WNKs (mutation T243A)⁵⁷ (pNCC/NCC 1.00 versus 0.99, $P = NS$) (Figure 5, F and G).

CaSR is expressed at both the apical and basolateral membranes of DCT cells. To investigate if increasing Ca^{2+} delivery to the DCT, and therefore, only activation of the apical CaSR is sufficient to elicit NCC phosphorylation, we administered C57BL/6 male WT mice with an acute treatment of furosemide (15 mg/kg over 3 hours), as previously described.⁵⁸ This specific dosage and

short time of treatment has been described to increase Ca^{2+} and NaCl delivery to the DCT, without promoting dehydration.⁵⁸ No changes in plasma potassium after 3 hours were observed (vehicle 4.3 ± 0.73 versus furosemide 4.3 ± 0.25 , $P = NS$). As expected, furosemide administration increased NCC phosphorylation four-fold ($P < 0.05$) while not increasing total NCC (NCC/ β -actin 1.00 versus 0.9456, $P = NS$) (Figure 6, A and B). In addition, furosemide administration was associated with increased WNK4 total protein and increased phosphorylation of WNK4 at S64 (Figure 6, C and D). Taken together, these results suggest that the acute inhibition of NKCC2 is associated with increased WNK4-NCC phosphorylation that was probably triggered by increased luminal Ca^{2+} .

CaSR Promotes NCC Phosphorylation *Ex Vivo*

The administration of the calcimimetic in the previous experiments could have promoted NCC activation either by a direct effect on the kidney, through the mechanism proposed in our hypothesis, or by a secondary effect due to activation/modification of any of the multiple hormonal systems that can activate NCC.⁵⁹ Acute calcimimetic administration is

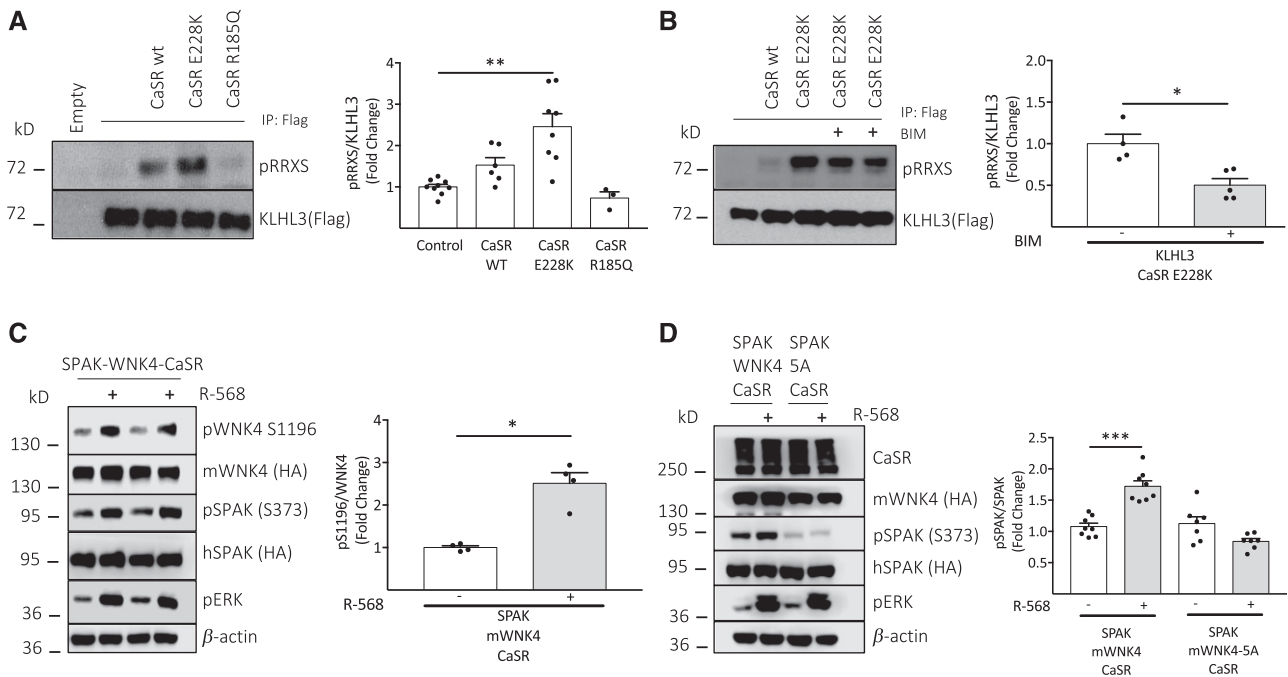


Figure 4. CaSR promotes KLHL3 and WNK4 phosphorylation by PKC. (A) Representative immunoblot of immunopurified KLHL3-Flag from HEK-293 cells transfected with KLHL3, WT hCaSR, and CaSR mutants. Cells were maintained in normal growth medium after transfection. Graph depicts densitometric analysis of at least three independent experiments. KLHL3 immunopurified from transfection alone (Control) was set as 1 and the rest of the groups were normalized accordingly. Bars represent mean ± SEM. ***P* < 0.01 versus Control. (B) Representative image of immunopurified KLHL3-Flag from HEK-293 cells transfected with KLHL3, CaSR-E228K, and treated with a PKC inhibitor (bisindolylmaleimide I [BIM]). BIM (4 μM) was added to the normal growth medium and left overnight. The next day, cells were lysed and immunoblotted. Graph shows densitometric analysis of at least three independent experiments. Bars represent mean ± SEM. **P* < 0.05 versus KLHL3 CaSR-E228K without BIM. (C) Representative immunoblot of cells transfected with SPAK-GFP-HA, mWNK4-HA, and WT hCaSR, serum-starved and stimulated with R-568 (200 nM) for 30 minutes. Lysates were blotted with the indicated antibodies. The graph depicts densitometric analysis. **P* < 0.05 versus Control (no stimulation with R-568). (D) Cells were transfected with SPAK-GFP-HA, mWNK4-HA, and WT hCaSR or the mutant mWNK4-5A, which has all PKC-phosphorylation sites mutated to alanines, and then stimulated as in (C). The graph represents densitometric analysis of at least three independent experiments for the mWNK45A mutant. Bars are mean ± SEM. ****P* < 0.001 versus its own control (data for SPAK-mWNK4-CaSR are shared with Figure 2D). IP, immunoprecipitation.

associated with decreased activity of the renin-AngII system,^{60,61} making this possibility unlikely. Nevertheless, we studied NCC phosphorylation using an *ex vivo* system where intervention of the central nervous system and other extra renal hormonal systems are not expected to be present. Kidneys of WT male Wistar rats were perfused with physiologic saline with vehicle or with R-568 (0.60 μg/ml per minute). The concentration of R-568 used in these experiments did not change the perfusion pressure, arguing against the presence of an intrarenal AngII effect. As shown in Figure 7, A and B, NCC and SPAK phosphorylation levels were significantly higher in kidneys perfused with the calcimimetic.

DISCUSSION

In this study, we show that CaSR activation is associated with increased NCC activity *in vitro* and *in vivo*. This increase

involves PKC activation of the WNK4-SPAK pathway, supporting the hypothesis that CaSR modulates NCC activity. As previously shown for AngII, modulation of NCC *via* WNK4-SPAK occurs by two different pathways—phosphorylation and concurrent activation of WNK4, and prevention of WNK4 degradation by KLHL3 phosphorylation. CaSR-induced activation of NCC has an implication in the physiologic response to increased extracellular Ca²⁺, which requires the kidney to promote its excretion at the apparent expense of reducing NaCl reabsorption in the TALH, thus increasing the delivery of NaCl and Ca²⁺ to the distal nephron.¹⁴ Integration of NaCl and Ca²⁺ homeostasis by CaSR in the DCT could prevent unwanted NaCl loss, while further permitting Ca²⁺ excretion. In this regard, CaSR expression in the apical membrane of the DCT has been clearly established by many groups and recent studies colocalize CaSR with NCC in human and mouse kidneys.^{5,22} Taking together the observations in this study, we propose the existence of a mechanism in the DCT, where apical CaSR responds to increased intratubular Ca²⁺ concentration evoking a

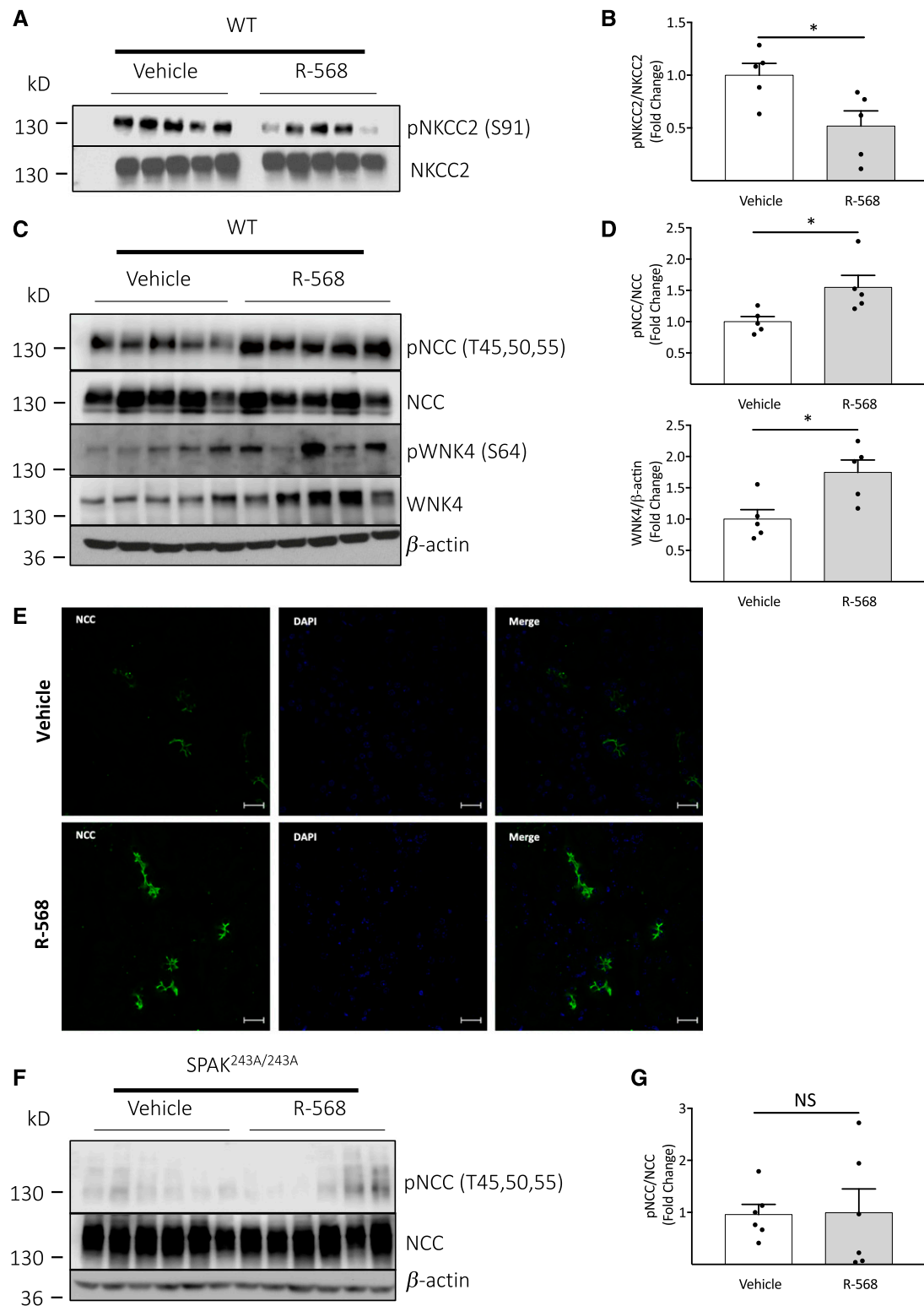


Figure 5. CaSR promotes NCC phosphorylation *in vivo*. Animals were administered with vehicle or with R-568, 3 μ g/g body wt through oral gavage. Three hours later, kidneys were harvested and processed for immunoblot. Each column of the representative immunoblot represents the kidneys from one animal. (A and C) Representative immunoblot of the effect of oral R-568 administration on NCC and NKCC2 phosphorylation, WNK4 abundance, and phosphorylation in S64 in WT mice (upper image). pS64/WNK4 1.00 versus 1.3050, P =NS. (E) Immunofluorescent staining of kidney sections from WT mice treated with Vehicle or R-568. Scale bars, 20 μ m. (F) Representative immunoblot of the effect of R-568 on NCC phosphorylation in SPAK knock-in mice (SPAK^{243A/243A}). (B, D, and G) Densitometric analysis of representative immunoblots. Bars represent mean \pm SEM. * P <0.05 versus Vehicle.

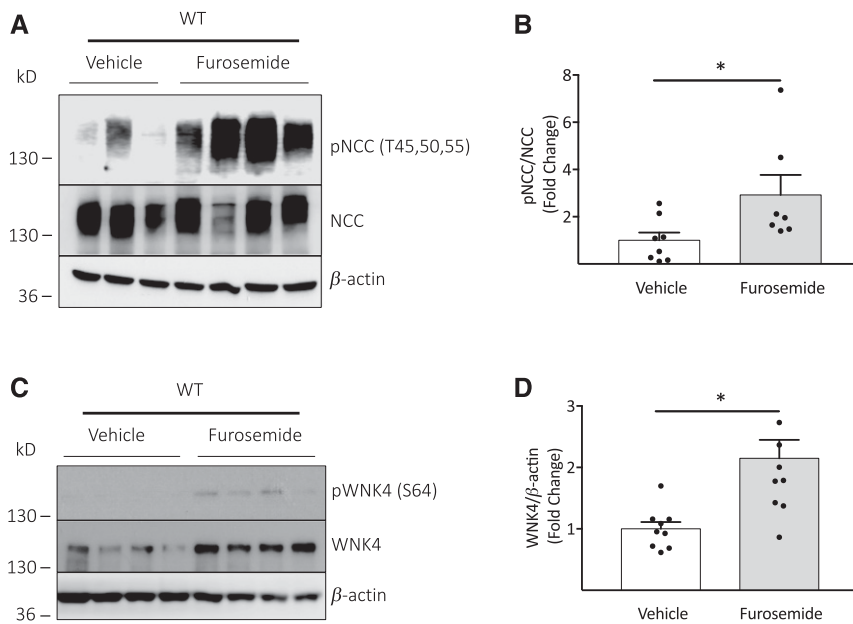


Figure 6. An acute furosemide treatment promotes NCC phosphorylation *in vivo*. Animals were administered with vehicle or with furosemide, 15 mg/kg body wt through ip injection. Three hours later, kidneys were harvested and processed for immunoblot. Each column of the representative immunoblot represents the kidney from one animal. (A and C) Representative immunoblots of the effect of the acute administration of furosemide on NCC phosphorylation, WNK4 abundance, and phosphorylation in S64 in WT mice. pS64/WNK4 1.00 versus 1.53, $P=NS$. (B and D) Densitometric analysis of $n=8$ controls and $n=7$ furosemide-administered mice. Bars represent mean \pm SEM. * $P<0.05$ versus Vehicle (B was analyzed with Mann-Whitney U test).

CaSR- $G\alpha_q$ -PKC-WNK4-SPAK signaling transduction pathway that promotes NCC activation to recover the NaCl that was not reabsorbed in the TALH, due to NKCC2 and ROMK inhibition (Figure 8). Because it is known that increased NaCl reabsorption in the DCT is associated with decreased Ca^{2+} absorption,¹⁴ this mechanism not only claims the NaCl, but also further promotes

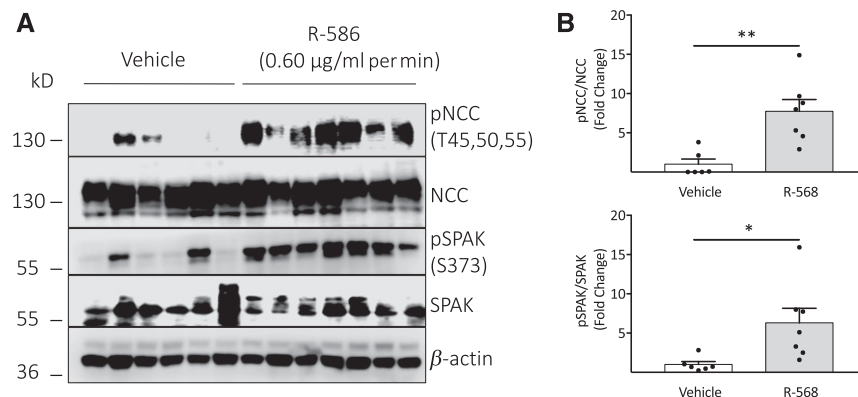


Figure 7. CaSR promotes NCC phosphorylation *ex vivo*. (A) Representative immunoblot of protein extracts from *ex vivo* perfused rat kidneys. The kidneys were perfused with physiologic saline with vehicle or with R-568 at a rate of 0.60 $\mu\text{g/ml}$ per minute. Each column of the immunoblot represents one kidney. (B) Bars represent mean \pm SEM of the densitometric analysis of (A). $n=6$ vehicles and $n=7$ R-568. ** $P<0.01$ versus vehicle. * $P<0.05$ versus vehicle.

hypercalciuria. The controversy of whether the thiazide effect on Ca^{2+} excretion occurs directly in the DCT or elsewhere^{62,63} does not contradict our findings.

We are aware of the possibility that the basolateral CaSR in DCT may also elicit a response to activate NCC, and our results do not rule out this possibility. In this scenario, increased extracellular Ca^{2+} could simultaneously reduce NKCC2 activity in the TALH but increase NCC activity in the DCT, by activating the basolateral receptor in both segments. However, because of the presence of CaSR and NCC in the apical membrane, is it likely that luminal Ca^{2+} is also involved in this response. NCC activation elicited by a single acute dose of furosemide, known to promote increased Ca^{2+} delivery to DCT, supports the fact that activation of apical CaSR is enough to provoke the proposed response. It is also worth mentioning that patients with autosomal dominant hypocalcemia (due to CaSR activating mutations) may exhibit a Bartter-like syndrome (also known as Bartter syndrome type V) that has been described as mild in most patients.^{16,17} Perhaps CaSR activation in the DCT helps to reduce natriuresis, as compared with other types of Bartter syndrome.

A similar mechanism prompted by CaSR in the nephron has been described before. It has been clinically recognized for many years that hypercalcemia induces polyuria.^{64,65} Increasing urinary Ca^{2+} to the distal nephron could also promote precipitation of Ca^{2+} and phosphate salts. Sands *et al.*⁶⁶ elegantly demonstrated that apical CaSR in the collecting duct responds to increased luminal Ca^{2+} to blunt vasopressin-induced insertion of AQP-2 water channels into the apical membrane. The latter would prevent water reabsorption in the collecting duct, allowing the urine to be diluted and thus preventing Ca^{2+} precipitation and formation of renal stones. The authors also demonstrated that the signaling pathway and molecular mechanisms initiated by CaSR was by $G\alpha_q$ and PKC proteins.⁶⁶ More recently, other groups have further established the association of active apical CaSR with decreased AQP2 abundance.^{67–69}

The observation that CaSR activation modulates NCC activity *via* WNK4-SPAK pathway may have further implications beyond the physiologic mechanism of how NaCl is recovered in DCT when TALH NaCl reabsorption is decreased by Ca^{2+} .

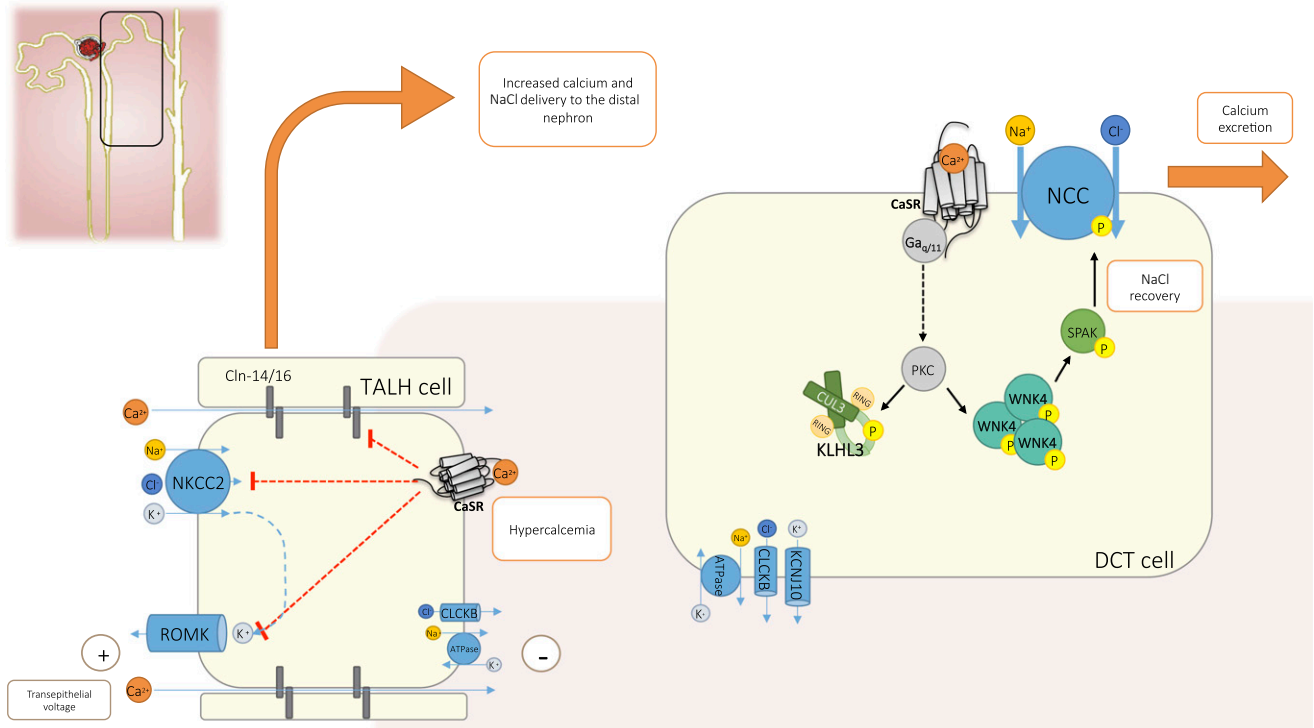


Figure 8. Proposed model for CaSR activation of NCC through a PKC-WNK4-SPAK pathway. Increased extracellular Ca^{2+} leads to CaSR-mediated inhibition of NKCC2 and ROMK, halting the transepithelial voltage difference that drags paracellular reabsorption of Ca^{2+} ions. Reduction in Ca^{2+} reabsorption in the TALH causes increased NaCl and Ca^{2+} delivery to the distal nephron. In the DCT, integration of calcium and NaCl homeostasis by the CaSR must respond to prevent unwanted NaCl loss. We propose the existence of a mechanism in the DCT where apically expressed CaSR responds to increased intratubular Ca^{2+} concentration, evoking a CaSR-G α _q-PKC-WNK4 signaling transduction pathway that promotes NCC activation. Cln-14/16, Claudin 14 and 16 heterodimers.

First, it is known that arterial hypertension is highly prevalent in primary hyperparathyroidism, ranging from 40% to 65%, which is much higher than the expected 25%–30% of hypertension in the general adult population.⁷⁰ Given our observations, a possible mechanism could be that increased Ca^{2+} in the tubular fluid, as occurs in hypercalcemia, stimulates the activity of NCC promoting NaCl reabsorption and, hence, the development of hypertension. Second, it has been recently demonstrated that glucose and other sugars act as type II calcimimetics, enhancing CaSR affinity for Ca^{2+} .⁷¹ This could be relevant in the apical membrane of the DCT because all of the filtered glucose is reabsorbed in the proximal tubule and therefore these cells are not continuously exposed to glucose. In patients with diabetes, the excess filtered glucose often escapes reabsorption in the proximal tubule, allowing a significant amount of glucose in the tubular fluid that reaches the DCT. It is possible that the presence of glucose acting as a calcimimetic increases apical CaSR sensibility, enhancing NCC activity of thus NaCl reabsorption, which could help to explain the higher prevalence of hypertension in patients with diabetes.⁷² These possibilities are speculative but can certainly be explored in future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dario Alessi for the kind gift of WNK463 inhibitor. We thank Dr. Norma O. Uribe-Uribe and Dr. Jazmín de Anda-González for the help with the kidney slicing for immunofluorescence analysis.

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Grant No. 23 from the “Fronteras de la ciencia” program and 188712 to G.G., No. 257726 to M.C.-B. and No. 290056 to L.R.-V., and the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases RO1 grant No. DK051496-15 to D.H.E. and G.G. S.B.-V. was supported by a scholarship from CONACyT-Mexico and is a graduate student in the Doctorado en Ciencias Bioquímicas program of the Universidad Nacional Autónoma de México.

S.B.-V., L.R.-V., M.C.-B., D.H.E., D.R., N.A.B., and G.G. designed the study, planned experiments, interpreted data, and edited the manuscript. S.B.-V., L.R.-V., J.B.-C., R.B., L.G.C.-P., N.V., A.R.M.-d.-O., C.P., and L.G.-M. performed experiments and reviewed the manuscript. S.B.-V. and G.G. wrote the paper.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al: Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575–580, 1993
- Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Brown EM, Hebert SC: Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am J Physiol* 274: F611–F622, 1998
- Riccardi D, Lee WS, Lee K, Segre GV, Brown EM, Hebert SC: Localization of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am J Physiol* 271: F951–F956, 1996
- Riccardi D, Valenti G: Localization and function of the renal calcium-sensing receptor. *Nat Rev Nephrol* 12: 414–425, 2016
- Graca JAZ, Schepelmann M, Brennan SC, Reens J, Chang W, Yan P, et al: Comparative expression of the extracellular calcium-sensing receptor in the mouse, rat, and human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F518–F533, 2016
- Palmer LG, Schnermann J: Integrated control of Na transport along the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 676–687, 2015
- Blaine J, Chonchol M, Levi M: Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 1257–1272, 2015
- Gamba G, Wang W, Schild L: Sodium chloride transport in the loop of Henle, distal convoluted tubule and collecting duct. In: *Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Alpern RJ, Caplan MJ, Moe OW, 5th Ed., London, Elsevier, 2013, pp 1143–1180
- Mandon B, Siga E, Roinel N, de Rouffignac C: Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ transport in the cortical and medullary thick ascending limb of the rat nephron: influence of transepithelial voltage. *Pflugers Arch* 424: 558–560, 1993
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP: Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 13: 183–188, 1996
- Suki WN, Yium JJ, Von Minden M, Saller-Hebert C, Eknayan G, Martinez-Maldonado M: Acute treatment of hypercalcemia with furosemide. *N Engl J Med* 283: 836–840, 1970
- Loupy A, Ramakrishnan SK, Wootla B, Chambrey R, de la Faille R, Bourgeois S, et al: PTH-independent regulation of blood calcium concentration by the calcium-sensing receptor. *J Clin Invest* 122: 3355–3367, 2012
- Toka HR, Al-Romaih K, Koshy JM, DiBartolo S 3rd, Kos CH, Quinn SJ, et al: Deficiency of the calcium-sensing receptor in the kidney causes parathyroid hormone-independent hypocalciuria. *J Am Soc Nephrol* 23: 1879–1890, 2012
- Gamba G, Friedman PA: Thick ascending limb: the Na(+):K(+):2Cl(-) co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflugers Arch* 458: 61–76, 2009
- Toka HR, Pollak MR, Houillier P: Calcium sensing in the renal tubule. *Physiology (Bethesda)* 30: 317–326, 2015
- Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaître X, Paillard M, et al: Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13: 2259–2266, 2002
- Watanabe S, Fukumoto S, Chang H, Takeuchi Y, Hasegawa Y, Okazaki R, et al: Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet* 360: 692–694, 2002
- Subramanya AR, Ellison DH: Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 2147–2163, 2014
- Friedman PA: Codependence of renal calcium and sodium transport. *Annu Rev Physiol* 60: 179–197, 1998
- Sabath E, Meade P, Berkman J, de los Heros P, Moreno E, Bobadilla NA, et al: Pathophysiology of functional mutations of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in Gitelman disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F195–F203, 2004
- Reilly RF, Peixoto AJ, Desir GV: The evidence-based use of thiazide diuretics in hypertension and nephrolithiasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 1893–1903, 2010
- Topala CN, Schoeber JPH, Searchfield LE, Riccardi D, Hoenderop JGJ, Bindels RJM: Activation of the Ca²⁺-sensing receptor stimulates the activity of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. *Cell Calcium* 45: 331–339, 2009
- Hadchouel J, Ellison DH, Gamba G: Regulation of renal electrolyte transport by WNK and SPAK-OSR1 kinases. *Annu Rev Physiol* 78: 367–389, 2016
- Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HKR, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, et al: Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* 121: 675–684, 2008
- Pacheco-Alvarez D, Cristóbal PS, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Muñoz E, et al: The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 281: 28755–28763, 2006
- Shibata S, Zhang J, Puthumana J, Stone KL, Lifton RP: Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7838–7843, 2013
- Ohta A, Rai T, Yui N, Chiga M, Yang S-S, Lin S-H, et al: Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure. *Hum Mol Genet* 18: 3978–3986, 2009
- 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* 293: 1107–1112, 2001
- Boyden LM, Choi M, Choate KA, Nelson-Williams CJ, Farhi A, Toka HR, et al: Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* 482: 98–102, 2012
- 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 U S A* 106: 4384–4389, 2009
- Castañeda-Bueno M, Cervantes-Pérez LG, Vázquez N, Uribe N, Kantesaria S, Morla L, et al: Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7929–7934, 2012
- Castañeda-Bueno M, Arroyo JP, Zhang J, Puthumana J, Yarborough O 3rd, Shibata S, et al: Phosphorylation by PKC and PKA regulate the kinase activity and downstream signaling of WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E879–E886, 2017
- Shibata S, Arroyo JP, Castañeda-Bueno M, Puthumana J, Zhang J, Uchida S, et al: Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch-like 3, preventing WNK4 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 15556–15561, 2014
- AbdAlla S, Lother H, Quittner U: AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407: 94–98, 2000
- Ward DT: Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium* 35: 217–228, 2004
- Fox J, Lowe SH, Petty BA, Nemeth EF: NPS R-568: a type II calcimimetic compound that acts on parathyroid cell calcium receptor of rats to reduce plasma levels of parathyroid hormone and calcium. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 473–479, 1999
- Fenton RA, Murray F, Dominguez Rieg JA, Tang T, Levi M, Rieg T: Renal phosphate wasting in the absence of adenylyl cyclase 6. *J Am Soc Nephrol* 25: 2822–2834, 2014
- 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* 31: 303–311, 2013
- Rojas-Vega L, Reyes-Castro LA, Ramírez V, Bautista-Pérez R, Rafael C, Castañeda-Bueno M, et al: Ovarian hormones and prolactin increase renal NaCl cotransporter phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F799–F808, 2015

40. Monroy A, Plata C, Hebert SC, Gamba G: Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F161–F169, 2000
41. Bazúa-Valenti S, Chávez-Canales M, Rojas-Vega L, González-Rodríguez X, Vázquez N, Rodríguez-Gama A, et al: The effect of WNK4 on the Na+-Cl- cotransporter is modulated by intracellular chloride. *J Am Soc Nephrol* 26: 1781–1786, 2015
42. 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* 64: 1047–1053, 2014
43. Ward DT, Riccardi D: New concepts in calcium-sensing receptor pharmacology and signalling. *Br J Pharmacol* 165: 35–48, 2012
44. Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BC, Van Wagenen BC, DelMar EG, et al: Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4040–4045, 1998
45. Nemeth EF, Heaton WH, Miller M, Fox J, Balandrin MF, Van Wagenen BC, et al: Pharmacodynamics of the type II calcimimetic compound cinacalcet HCl. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 627–635, 2004
46. Yamada K, Park H-M, Rigel DF, DiPetrillo K, Whalen EJ, Anisowicz A, et al: Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function. *Nat Chem Biol* 12: 896–898, 2016
47. Holstein DM, Berg KA, Leeb-Lundberg LMF, Olson MS, Saunders C: Calcium-sensing receptor-mediated ERK1/2 activation requires Galphai2 coupling and dynamin-independent receptor internalization. *J Biol Chem* 279: 10060–10069, 2004
48. Toka HR, Pollak MR: The role of the calcium-sensing receptor in disorders of abnormal calcium handling and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 23: 494–501, 2014
49. Brown EM, Pollak M, Hebert SC: The extracellular calcium-sensing receptor: its role in health and disease. *Annu Rev Med* 49: 15–29, 1998
50. Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SH, Pollak MR, et al: Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor. *J Biol Chem* 271: 19537–19545, 1996
51. Zhang C, Miller CL, Gorkhali R, Zou J, Huang K, Brown EM, et al: Molecular basis of the extracellular ligands mediated signaling by the calcium sensing receptor. *Front Physiol* 7: 441, 2016
52. Mayr B, Glaudo M, Schöfl C: Activating calcium-sensing receptor mutations: Prospects for future treatment with calcilytics. *Trends Endocrinol Metab* 27: 643–652, 2016
53. Mayr B, Schnabel D, Dörr H-G, Schöfl C: GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Gain and loss of function mutations of the calcium-sensing receptor and associated proteins: current treatment concepts. *Eur J Endocrinol* 174: R189–R208, 2016
54. Pearson RB, Kemp BE: Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 200: 62–81, 1991
55. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P: Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95–105, 2000
56. Gamba G: Regulation of the renal Na+-Cl- cotransporter by phosphorylation and ubiquitylation. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F1573–F1583, 2012
57. Rafiqi FH, Zuber AM, Glover M, Richardson C, Fleming S, Jovanović S, et al: Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol Med* 2: 63–75, 2010
58. Lee C-T, Chen H-C, Lai L-W, Yong K-C, Lien Y-HH: Effects of furosemide on renal calcium handling. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1231–F1237, 2007
59. Rojas-Vega L, Gamba G: Mini-review: regulation of the renal NaCl cotransporter by hormones. *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F10–F14, 2016
60. Atchison DK, Ortiz-Capisano MC, Beierwaltes WH: Acute activation of the calcium-sensing receptor inhibits plasma renin activity in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1020–R1026, 2010
61. Atchison DK, Beierwaltes WH: The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin. *Pflugers Arch* 465: 59–69, 2013
62. Gesek FA, Friedman PA, van der Kemp AWCM, Loffing J, Hoenderop JGJ, Bindels RJM: Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 90: 429–438, 1992
63. Choi KH, Shin CH, Yang SW, Cheong HI: Autosomal dominant hypocalcemia with Bartter syndrome due to a novel activating mutation of calcium sensing receptor, Y829C. *Korean J Pediatr* 58: 148–153, 2015
64. Levi M, Peterson L, Berl T: Mechanism of concentrating defect in hypercalcemia. Role of polydipsia and prostaglandins. *Kidney Int* 23: 489–497, 1983
65. Gill JR Jr, Bartter FC: On the impairment of renal concentrating ability in prolonged hypercalcemia and hypercalciuria in man. *J Clin Invest* 40: 716–722, 1961
66. Sands JM, Naruse M, Baum M, Jo I, Hebert SC, Brown EM, et al: Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 99: 1399–1405, 1997
67. Bustamante M, Hasler U, Leroy V, de Seigneux S, Dimitrov M, Mordasini D, et al: Calcium-sensing receptor attenuates AVP-induced aquaporin-2 expression via a calmodulin-dependent mechanism. *J Am Soc Nephrol* 19: 109–116, 2008
68. Renkema KY, Velic A, Dijkman HB, Verkaar S, van der Kemp AW, Nowik M, et al: The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 20: 1705–1713, 2009
69. Earm JH, Christensen BM, Frøkiaer J, Marples D, Han JS, Knepper MA, et al: Decreased aquaporin-2 expression and apical plasma membrane delivery in kidney collecting ducts of polyuric hypercalcemic rats. *J Am Soc Nephrol* 9: 2181–2193, 1998
70. Pepe J, Cipriani C, Sonato C, Raimo O, Biamonte F, Minisola S: Cardiovascular manifestations of primary hyperparathyroidism: a narrative review. *Eur J Endocrinol* 177: R297–R308, 2017
71. Medina J, Nakagawa Y, Nagasawa M, Fernandez A, Sakaguchi K, Kitaguchi T, et al: Positive allosteric modulation of the calcium-sensing receptor by physiological concentrations of glucose. *J Biol Chem* 291: 23126–23135, 2016
72. Colosia AD, Palencia R, Khan S: Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes Metab Syndr Obes* 6: 327–338, 2013

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2017111155/-/DCSupplemental>.

Capítulo IV. Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó con la combinación de técnicas y metodologías de biología molecular, bioquímicas, y con la expresión funcional de proteínas de membrana como el NCC, el CaSR y las cinasas L-WNK y WNK4 en ovocitos de *Xenopus laevis* y en un cultivo celular de HEK-293. Los experimentos en animales se hicieron en ratones de la cepa C57BL/6 y en ratas Wistar silvestres.

Animales

El manejo de animales fue autorizado por el Comité de Investigación en Animales (CINVA) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Los ratones se mantuvieron en todo momento en el bioterio del INCMNSZ (con excepción de los experimentos de perfusión en riñones de rata que se hicieron en colaboración con la doctora Rocío Bautista del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh). Los animales se expusieron a periodos de luz y oscuridad de 12 h, y se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (18-19 °C) y humedad (alrededor de 65%). Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida (dieta estándar).

Para los experimentos solo se utilizaron machos adultos (12-16 semanas) ya que se sabe que NCC es regulado por hormonas como el estrógeno y la prolactina¹⁹⁴.

Experimentos *in vivo*

El día del experimento los animales (ratones silvestres o ratones transgénicos *knock-in* de SPAK-T243A⁹¹, SPAK^{T243A/T43A}) se aleatorizaron en un grupo control al que se le administró el vehículo y otro administrado con el calcimiméticos NPS R-568 (Tocris Biosciences). El día del experimento el fármaco se disolvió en ciclodextrina 10% (peso/volumen) (Sigma-Aldrich). Los ratones se pesaron y se les administró el calcimimético mediante sonda oral 3 µg/g de ratón. Tres horas después los ratones se anestesiaron con pentobarbital (60 mg/kg) y se realizó una punción del ventrículo derecho con el fin de extraer sangre. La sangre se recolectó en tubos eppendorf con heparina (PISA) y posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min a 4°C. Se recolectó el plasma y se almacenó a -80°C. Inmediatamente después de la punción cardíaca se extrajeron los riñones, se decapsularon y se congelaron en nitrógeno líquido para después almacenarlos a -80°C.

Para los experimentos con furosemida, el protocolo fue el mismo de arriba, se utilizó una dosis de furosemida (Sigma-Aldrich) de 15 mg/mg administrada por vía intraperitoneal.

Las concentraciones de electrolitos plasmáticos y urinarios se determinaron por el método de ion selectivo indirecto, mientras que la creatinina se determinó con el método de Jaffé. Todos estos análisis se hicieron en el laboratorio del Departamento de Nefrología y metabolismo mineral del INCMNSZ con el equipo Synchron CX5, Beckman Coulter.

Una mitad de riñón (corte transversal) se homogenizó en 500 μ l de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas ([Sucrosa 250 mM, trietanolamina 10 mM, NaF 50 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 5 mM, Na_3VO_4 1 mM, pH 7.5]; en el momento de uso se agregaron inhibidores de proteasas (tabletas de Complete (Roche)). Después, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó mediante el método de BCA^{††}. Las muestras se prepararon con amortiguador de Laemmli con 2-mercaptoetanol 5% para cargar de 40 a 60 μ g de proteína por pozo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%. Los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF para después hacer *western blot* como se explica más adelante en el apartado “*Western blot*”.

Perfusión *ex vivo*

Se montó el riñón derecho de ratas silvestres Wistar machos en un sistema de perfusión de Langendorff como se describió previamente^{194,195} y se perfundió con vehículo (solución salina fisiológica con 10% de ciclodextrina) o con el calcimimético NPS R-568 a una concentración de 0, 0.60 y 1.8 μ g/ml/min¹⁹⁶, que no tuvo efecto sobre la presión de perfusión. Después de 30 minutos de perfusión, el riñón se separó manualmente en corteza y médula, y la primera se congeló en nitrógeno líquido. Después, los tejidos se homogeneizaron usando el buffer de lisis descrito en la sección “Experimentos *in vivo*” y se prepararon para *western blot* igual que arriba.

Inmunofluorescencia

Los ratones se anestesiaron con pentobarbital (60 mg / kg). Se extrajo un riñón para el análisis por western blot, y el otro riñón se perfundió con aproximadamente 5 ml de paraformaldehído al 4% (peso/volumen) en una solución salina isotónica amortiguada con fosfoatos (PBS por sus siglas en inglés). Luego se extrajo el riñón, se incubó en

^{††} El método de BCA (ácido bicinínico) consiste en la cuantificación de proteínas totales por colorimetría. El principio de este método es que las proteínas reducen el Cu^{+2} a Cu^{+1} en una solución alcalina volviéndola color púrpura por el ácido bicinínico. La reducción del cobre se da por tres principales aminoácidos: cisteína, tirosina y triptófano.

paraformaldehído al 4% (peso/volumen) en PBS durante al menos 3 horas, y luego se incubó en sacarosa al 30% (peso/volumen) en PBS durante la noche a temperatura ambiente. Después, los riñones se montaron en OCT (Tissue-Tek) y se cortaron secciones de 5 µm. Las laminillas se mantuvieron a -80 °C hasta la inmunotinción. Para la inmunotinción, los tejidos se hidrataron en una solución salina amortiguada con Tris (TBS por sus siglas en inglés) y con tween 0.1% (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, Tween 0.1% (volumen/volumen), pH 7.5) y luego se incubaron en una solución de bloqueo durante 1 h (3% (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (ASB) en TBS-tween 1%). Luego, las laminillas se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios disueltos en ASB al 1% en TBS-tween 0.1%. Se usaron los siguientes anticuerpos: anti-NCC⁸⁴ (1: 100) y Alexa Fluor 488 (1: 400) de Life Technologies.

Mutagénesis sitio dirigida de WNK4

Se utilizó el sistema de mutagénesis Quick-Change (Stratagene) con primers diseñados en el laboratorio (Sigma) para realizar las siguientes mutantes de WNK4 humana primero en el vector para expresión en ovocitos pGH19 y después en el vector para células de mamíferos pCDNA3.1:

WNK4-L322F
WNK4-L324F
WNK4-L322F-L324F(WNK4-LL-FF)
WNK4-L322F-L324F-D321A (WNK4-LL-FF-DA)
WNK4-L322F-L324F-S335A (WNK4-LL-FF-SA)
WNK4-D561A
WNK4-KD-LL-FF

Las mutaciones se confirmaron por secuenciación (Unidad de Secuenciación, Instituto de Biotecnología, UNAM) y posteriormente se subclonó el fragmento mutado en el vector original para quitar mutaciones no deseadas.

Expresión heteróloga y ensayos de función en *Xenopus laevis*

Expresión y ensayo funcional

El sistema de expresión de *Xenopus laevis* consiste en la inyección de uno o más RNA complementarios (RNAc) sintetizados *in vitro* para expresar y estudiar las proteínas deseadas. Este sistema nos permite medir la actividad del cotransportador mediante un ensayo de captación de sodio radiactivo ²²Na⁺ y estudiar el estado de fosforilación del NCC

por western blot utilizando fosfoanticuerpos dirigidos a los principales sitios de fosforilación^{34,197}.

La síntesis de RNAc se realizó a partir de un molde de DNAc de las proteínas que se sobre expresaron. Primero, los plásmidos se linearizaron (utilizando enzimas de restricción que cortan en el extremo 3' del gen) para después sintetizar el RNAc con el sistema transcripción mMMESSAGE mMACHINE (Ambion) que funciona con una polimerasa de RNA T7. Tanto el DNA (después de la digestión), como el RNA producido, fueron purificados con la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (45:45:1). La integridad y la cuantificación de cada uno de los RNAc se corroboró en geles desnaturizantes de agarosa al 1% en MOPS-Formaldehído y por la lectura en un espectrofotómetro en la absorbancia de 260 nm.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* se extrajeron de ranas hembras adultas anestesiadas con triclaína al 0.17%. Para quitar la membrana folicular de los ovocitos se realizaron dos lavados de 1.5 h cada uno, en una solución de colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich) a 3 mg/ml disuelta en una solución fisiológica ND96 sin calcio (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM, pH 7.4). Al cabo de las tres horas de lavados, los ovocitos se incubaron toda la noche a 16°C con medio ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM, pH 7.4) adicionado con gentamicina 5 mg/ml. Al día siguiente, los ovocitos se inyectaron con 50 nl de RNAc con un micro manipulador y un micro inyector. La concentración de RNAc que se inyectó a cada ovocito dependió de cada una de las clonas:

- RNAc de NCC se inyectó a una concentración de 0.2 µg/µl.
- RNAc de L-WNK1, WNK4 y mutantes de WNK4 a 0.4 µg/µl.
- RNAc de CaSR a 0.25 µg/µl.
- RNAc de SLC26A9 a 0.2 µg/µl.

48 h posterior a la inyección, (los ovocitos después de la inyección se mantienen en incubación a 16 °C y con cambios diarios de medio ND96), se evaluó la actividad del NCC midiendo la captación del isótopo radiactivo ²²Na⁺ (Perkin Elmer Life Sciences) en diversas condiciones. Este ensayo de captación consistió en dos fases. La primera fue un periodo de precaptación que consistió en una incubación de 25 min en ND96, más una incubación de 5 min en ND96 sin cloro (isetionato de sodio 96 mM, gluconato de potasio 2 mM, gluconato de calcio 1.8 mM, gluconato de magnesio 1 mM y HEPES 5 mM, pH 7.4). La segunda fue un periodo de captación de 60 minutos a 32 °C en una solución isotónica sin potasio (NaCl 40 mM, gluconato de sodio 56 mM, CaCl₂ 4 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM, pH 7.4) con 1 µCi/ml de ²²Na⁺. En ambos periodos los ovocitos estuvieron expuestos a un inhibidor de la ATPasa de Na⁺/K⁺ (ouabaina 1 mM), un inhibidor de ENaC (amilorida a 0.1 mM) y a un inhibidor de NKCC1 (bumetanida 0.1 mM); esto se realizó con el objetivo de minimizar la

captación de sodio radioactivo por otras proteínas que no fueran NCC. Como grupos control se expusieron ovocitos a una tiazida (hidroclorotiazida 0.1 mM) durante los periodos de precaptación y captación. Al terminar la captación, los ovocitos se lavaron cinco veces en solución de captación fría. Después, los ovocitos fueron lisados con SDS 1%, y la actividad del marcador fue medida para cada ovocito por β -centelleo.

Para los grupos que se estimularon con gadolinio, los ovocitos se preincubaron durante 15 minutos en el medio ND96 sin cloro, luego se transfirieron a pozos con o sin 80 μ M de $GdCl_3$ en el medio ND96 sin cloro durante 15 minutos, luego se lavaron una vez en la solución de captación y se transfirieron al periodo de captación.

Para el análisis de los datos se tomaron de cada experimento 10 ovocitos y el valor de la captación de $^{22}Na^+$ se representa como la actividad neta producto de restar el valor de la tiazida de cada grupo. En las gráficas de grupos, la actividad del NCC se expresa como el porcentaje que aumentó respecto al basal de NCC en esa condición (100%) y los otros valores fueron expresados como el porcentaje respecto a la actividad basal. El efecto de cada una de las condiciones experimentales se corroboró al menos en tres ensayos diferentes (n=3).

Medición de cloruro intracelular

Se midió la concentración intracelular de cloruro ($[Cl^-]_i$) de los ovocitos de *Xenopus laevis* en colaboración con el doctor José de Jesús García Valdés en la Facultad de Química-UNAM. La medición de $[Cl^-]_i$ se realizó por potenciometría utilizando un sistema de microelectrodos selectivos para Cl^- construidos y caracterizados en el laboratorio del doctor García Valdés. Todas las mediciones se realizaron en una jaula de Faraday para evitar interferencia electromagnética. Cada microelectrodo selectivo se calibró con una solución estándar de KCl 10^{-5} a 10^{-1} M. Para la descripción de la caracterización del electrodo revisar la tesis "Estudio del cambio en la concentración intracelular de cloruro de ovocitos de *Xenopus laevis* que sobreexpresan NKCC, en condiciones de depleción de este ion" de la Mtra. Xochiquétzal González Rodríguez.

Cultivo celular y transfección transitoria en células HEK-293

Se utilizó la línea celular HEK293, derivada de riñón de humano obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio DMEM 11965-092 (Life Technologies) que tiene 1.8 mM de calcio y suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (Incitrogen) y 100 U/ml de estreptomomicina y penicilina (Invitrogen). El cultivo se mantuvo en incubación a 37 °C en 95% de aire y 5% CO_2 .

Para la transfección, las células se sembraron un día antes en placas de 6 pozos (3.5 cm de diámetro cada pozo) con medio DMEM suplementado y se dejaron toda la noche. Posteriormente, la transfección fue realizada con lipofectamina 2000 (Life technologies) (como se indica en el manual del fabricante) y 3 µg máximo de DNA por pozo.

El DNA se obtuvo de una purificación midiprep (Qiagen) y se cuantificó con un nanodrop para calcular la cantidad necesaria para agregar 1 µg de cada DNA. Los DNAs que se utilizaron fueron los siguientes:

- DNA NCC en pCMV5 (FLAG)
- DNA hSPAK en pCMV5 (HA)
- DNA hSPAK en peGFP (GFP)
- DNA mWNK4 en pCDNA3.1 (Flag-HA)
- DNA mutantes PHAII (mWNK4-D561A, E559K y EDQ se hicieron sobre el plásmido de la mWNK4 wt en pCDNA3.1)
- DNA hKLHL3 en pCDNA3.1 (Flag)
- DNA vector pCDNA3.1
- DNA hCaSR (y mutante activante CaSR E228K e inactivante R185Q) en pCDNA 3.1

48 horas después de la transfección se realizó el experimento. 16 horas antes del experimento las células se ayunaron en DMEM sin suero y sin antibióticos. En el experimento las células se estimularon con NPS R-568 en los tiempos y las concentraciones indicadas. El tiempo y la concentración que se fijaron fueron 30 min y 200 nM. El estímulo se detuvo colocando la placa en hielo y se quitó el medio para agregar 100 µl de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa ([Tris-Cl 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, Na₄P₂O₇ 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Nonidet P-40 al 1% (peso/volumen), sacarosa 0.27 mM, pH 7.5]; en el momento de uso se agregaron inhibidores de proteasas (Complete; Roche). Después, las células se rasparon para recolectar los lisados y se centrifugaron a 14,000 rpm por 12 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas con el método de BCA. Se prepararon mezclas 1:1 con buffer Laemmli con 2-mercaptoetanol 5% para cargar 20 µg de proteína por pozo en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%. Los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF para después hacer *western blot* como se explica más adelante en el apartado “Western blot”.

Inmunoprecipitación

Se utilizaron 0.3-0.5 mg de proteína de los lisados celulares para inmunoprecipitación (IP) de KLHL3. Los lisados se incubaron con 10 µl de perlas de agarosa acopladas a un anticuerpo anti-FLAG (Sigma-Aldrich) a 4 ° C durante 2 horas. Las perlas se centrifugaron y se lavaron

dos veces con 500 µl de una solución de lavado del kit y una vez con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) enfriado en hielo. Las proteínas de la IP se eluyeron con 20 µl buffer Laemmli 2.5X con 2-mercaptoetanol para después cargar toda la IP en dos pozos de geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%. Los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF para después hacer *western blot* como se explica más adelante en el apartado “*Western blot*”.

Western blot

Los geles se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con una cámara semihúmeda (BioRad) a 10 V durante 1.45 h. Posteriormente se bloquearon durante 1.5 h a temperatura ambiente en una solución de leche al 10% (peso/volumen) en TBS-T (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, Tween 0.2% (volumen/volumen), pH 7.5). Después del bloqueo las membranas se incubaron con anticuerpos primarios toda la noche a 4°C disueltos en la leche 5% en TBS-T y con anticuerpos secundarios acoplados a HRP durante 1.5 h a temperatura ambiente también disueltos en leche 5%. La señal fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el sustrato de la HRP Luminata Forte Western (Merck Millipore). Los western blots de las proteínas totales fueron expuestos en placas de rayos X y las densitometrías se hicieron de una sola exposición. Algunos resultados mostrados fueron detectados con un escáner de quimioluminiscencia (C- DiGit Blot Scanner; Li-COR).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales: los conjugados a HRP fueron anti-Flag 1:5000 (Sigma-Aldrich), anti-HA 1:2500 (Sigma-Aldrich) y anti-beta-actin 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology); los no conjugados fueron el monoclonal anti-CaSR 0.8 µl/ml (Sigma), pERK 1:4000 (Cell Signaling Technology) y pRRXS 1:2000 (Cell Signaling Technology). Para WNK4 se utilizó un anticuerpo donado por el Dr. David Ellison y para las fosfoserinas de WNK4 S64 y S1196 se utilizaron anticuerpos donados por la Dra. María Castañeda y el Dr. Richard Lifton. Se utilizaron los siguientes anticuerpos no comerciales policlonales generados en oveja (producidos por el Medical Research Council (MRC) de la Universidad de Dundee): anti-NCC (que reconoce los residuos 906-925 del NCC humano, [CHTKRFEDMIAPFRLNDGFKD], con el número de serie S965B), anti-NCC fosforilado en T46, T48 y T55 (S995B), anti-SPAK (S150C), anti-SPAK fosforilado en S373 (que reconoce los residuos [RRVPGS(P)SGRLHKT], con el número de serie S670B). Estos anticuerpos policlonales del MRC se utilizaron a una concentración de 1-3 µg/ml. Los anticuerpos secundarios conjugados con la HRP que se utilizaron fueron: anti-mouse 1:2000 (GE), anti-Rabbit 1:10000 (Sigma) y anti-Sheep 1:10000 (Jackson). Los datos fueron cuantificados por densitometría (se cuantificó la densidad óptica y el área de las bandas) con el software ImageJ.

Análisis estadístico

La prueba de t-student no pareada (dos colas) se utilizó para la comparación entre dos grupos. Para la comparación entre múltiples grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). Para todas las estadísticas un p valor < 0.05 se consideró significativo. Todos los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar para un mínimo de 3 experimentos independientes. Todas las pruebas fueron calculadas con el software GraphPad Prism versión 6.0 para Mac OS X.

Referencias

1. Halperin, M. L., Kamel, K. S. & Goldstein, M. B. *Fluid, Electrolyte and Acid-Base Physiology*. 1–615 (Elsevier, 2010).
2. Hall, J. E. & Guyton, A. C. *Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology*. 1–1112 (Elsevier, 2011).
3. Rose, B. *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*. (McGraw-Hill Education / Medical, 2017).
4. Boron, W. F. & Boulpaep, E. L. *Medical Physiology*. 1–1352 (Elsevier, 2012).
5. Floege, J., Johnson, R. J. & Feehally, J. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 1–1307 (Elsevier Saunders, 2011).
6. *Brenner & Rector's: The Kidney*. **1**, 1–2938 (Elsevier, 2012).
7. Antunes-Rodrigues, J., de Castro, M., Elias, L. L. K., Valença, M. M. & McCann, S. M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol. Rev.* **84**, 169–208 (2004).
8. Wilson, J. L. L., Miranda, C. A. & Knepper, M. A. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clin. Exp. Nephrol.* **17**, 751–764 (2013).
9. Guyton, A. C. The surprising kidney-fluid mechanism for pressure control--its infinite gain! *Hypertension* **16**, 725–730 (1990).
10. Palmer, L. G. & Schnermann, J. Integrated control of Na transport along the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 676–687 (2015).
11. Curthoys, N. P. & Moe, O. W. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 1627–1638 (2014).
12. Mount, D. B. Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 1974–1986 (2014).
13. Gamba, G. & Friedman, P. A. Thick ascending limb: the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflugers Arch.* **458**, 61–76 (2009).
14. Hebert, S. C. & Andreoli, T. E. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol.* **246**, F745–56 (1984).
15. Hebert, S. C. Bartter syndrome. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **12**, 527–532 (2003).
16. Oppermann, M. *et al.* Renal function in mice with targeted disruption of the A isoform of the Na-K-2Cl co-transporter. *J. Am.Soc.Nephrol.* **18**, 440–448 (2007).
17. Obermüller, N., Kunchaparty, S., Ellison, D. H. & Bachmann, S. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J. Clin. Invest.* **98**, 635–640 (1996).
18. Oppermann, M. *et al.* Tubuloglomerular feedback and renin secretion in NTPDase1/CD39-deficient mice. *AJP: Renal Physiology* **294**, F965–70 (2008).

19. Oppermann, M. *et al.* Macula densa control of renin secretion and preglomerular resistance in mice with selective deletion of the B isoform of the Na,K,2Cl co-transporter. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 2143–2152 (2006).
20. Pollak, M. R., Quaggin, S. E., Hoenig, M. P. & Dworkin, L. D. The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 1461–1469 (2014).
21. Danziger, J. & Zeidel, M. L. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 852–862 (2015).
22. Reilly, R. F. & Ellison, D. H. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol. Rev.* **80**, 277–313 (2000).
23. Subramanya, A. R. & Ellison, D. H. Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 2147–2163 (2014).
24. Loffing, J. *et al.* Localization of epithelial sodium channel and aquaporin-2 in rabbit kidney cortex. *AJP: Renal Physiology* **278**, F530–9 (2000).
25. Leviel, F. *et al.* The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 1627–1635 (2010).
26. Gamba, G. *et al.* Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2749–2753 (1993).
27. Gamba, G. *et al.* Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* **269**, 17713–17722 (1994).
28. Moreno, E. *et al.* Affinity-defining domains in the Na-Cl cotransporter: a different location for Cl⁻ and thiazide binding. *J. Biol. Chem.* **281**, 17266–17275 (2006).
29. Gamba, G. The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F838–48 (2009).
30. Hoover, R. S. *et al.* N-Glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 271–282 (2003).
31. Pedersen, N. B., Carlsson, M. C. & Pedersen, S. F. Glycosylation of solute carriers: mechanisms and functional consequences. *Pflugers Arch.* **468**, 159–176 (2016).
32. De Jong, J. C. *et al.* Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter: evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's syndrome. **13**, 1442–1448 (2002).
33. *Seldin and Giebisch's: The Kidney*. **1**, 1–3299 (Elsevier Inc., 2013).
34. Pacheco-Alvarez, D. *et al.* The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J. Biol. Chem.* **281**, 28755–28763 (2006).

35. Hamilton, K. L. & Devor, D. C. Basolateral membrane K⁺ channels in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**, F1069–81 (2012).
36. Subramanya, A. R. & Ellison, D. H. Distal convoluted tubule. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 2147–2163 (2014).
37. Bockenhauer, D. *et al.* Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1960–1970 (2009).
38. Bandulik, S. *et al.* The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K⁺ channel. *Pflugers Arch.* **461**, 423–435 (2011).
39. Mann, J. F. Choice of drug therapy in primary (essential) hypertension. 1–35 (2018).
40. Vargas-Poussou, R. *et al.* Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 693–703 (2011).
41. Kunchaparty, S. *et al.* Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am. J. Physiol.* **277**, F643–9 (1999).
42. Donnelly, B. F. *et al.* Hsp70 and Hsp90 multichaperone complexes sequentially regulate thiazide-sensitive cotransporter endoplasmic reticulum-associated degradation and biogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 13124–13135 (2013).
43. Simon, D. B. *et al.* Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat. Genet.* **12**, 24–30 (1996).
44. Hoorn, E. J., Loffing, J. & Ellison, D. H. An Integrated View of Potassium Homeostasis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1786 (2015).
45. Abu Hossain, S., Chaudhry, F. A., Zahedi, K., Siddiqui, F. & Amlal, H. Cellular and molecular basis of increased ammoniogenesis in potassium deprivation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**, F969–78 (2011).
46. Roy, A., Al-bataineh, M. M. & Pastor-Soler, N. M. Collecting duct intercalated cell function and regulation. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 305–324 (2015).
47. Ellison, D. H., Terker, A. S. & Gamba, G. Potassium and Its Discontents: New Insight, New Treatments. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 981-9 (2016).
48. Stanton, B. A. & Kaissling, B. Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased Na delivery. II. Na⁺ and K⁺ transport. *Am. J. Physiol.* **255**, F1269–75 (1988).
49. Hunter, R. W., Craigie, E., Homer, N. Z. M., Mullins, J. J. & Bailey, M. A. Acute inhibition of NCC does not activate distal electrogenic Na⁺ reabsorption or kaliuresis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **306**, F457–67 (2014).
50. Grimm, P. R., Coleman, R., Delpire, E. & Welling, P. A. Constitutively Active SPAK Causes Hyperkalemia by Activating NCC and Remodeling Distal Tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 2597–2606 (2017).

51. Nijenhuis, T. *et al.* Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J. Clin. Invest.* **115**, 1651–1658 (2005).
52. Meij, I. C. *et al.* Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na⁺:K⁺-ATPase gamma-subunit. *Nat. Genet.* **26**, 265–266 (2000).
53. Reilly, R. F., Peixoto, A. J. & Desir, G. V. The evidence-based use of thiazide diuretics in hypertension and nephrolithiasis. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 1893–1903 (2010).
54. Loffing, J. *et al.* Altered renal distal tubule structure and renal Na⁺ and Ca²⁺ handling in a mouse model for Gitelman's syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**, 2276–2288 (2004).
55. Lee, C.-T., Shang, S., Lai, L.-W., Yong, K.-C. & Lien, Y.-H. H. Effect of thiazide on renal gene expression of apical calcium channels and calbindins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F1164–70 (2004).
56. Yang, S.-S. *et al.* Generation and analysis of the thiazide-sensitive Na⁺ -Cl⁻ cotransporter (Ncc/Slc12a3) Ser707X knockin mouse as a model of Gitelman syndrome. *Hum. Mutat.* **31**, 1304–1315 (2010).
57. Gesek, F. A. & Friedman, P. A. Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J. Clin. Invest.* **90**, 429–438 (1992).
58. Hadchouel, J., Delaloy, C., Faure, S., Achard, J.-M. & Jeunemaître, X. Familial hyperkalemic hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 208–217 (2006).
59. Mayan, H. *et al.* Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3248–3254 (2002).
60. Lalioti, M. D. *et al.* Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat. Genet.* **38**, 1124–1132 (2006).
61. Wilson, F. H. *et al.* Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* **293**, 1107–1112 (2001).
62. Boyden, L. M. *et al.* Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* **482**, 98–102 (2012).
63. McCormick, J. A. & Ellison, D. H. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol. Rev.* **91**, 177–219 (2011).
64. Xu, B. *et al.* WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J. Biol. Chem.* **275**, 16795–16801 (2000).
65. Min, X., Lee, B.-H., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. *Structure* **12**, 1303–1311 (2004).
66. Veríssimo, F. & Jordan, P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* **20**, 5562–5569 (2001).
67. Zagórska, A. *et al.* Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. *J. Cell Biol.* **176**, 89–100 (2007).

68. Yamada, K. *et al.* Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function. *Nat. Chem. Biol.* (2016). doi:10.1038/nchembio.2168
69. Vitari, A. C., Deak, M., Morrice, N. A. & Alessi, D. R. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochemical Journal* **391**, 17–24 (2005).
70. Xu, B.-E. *et al.* Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 48456–48462 (2002).
71. Moon, T. M. *et al.* Solution structure of the WNK1 autoinhibitory domain, a WNK-specific PF2 domain. *J. Mol. Biol.* **425**, 1245–1252 (2013).
72. J, T. *et al.* SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochemical Journal* **441**, 325–337 (2012).
73. Chávez-Canales, M. *et al.* WNK-SPAK-NCC cascade revisited: WNK1 stimulates the activity of the Na-Cl cotransporter via SPAK, an effect antagonized by WNK4. *Hypertension* **64**, 1047–1053 (2014).
74. Golbang, A. P. *et al.* A new kindred with pseudohypoaldosteronism type II and a novel mutation (564D>H) in the acidic motif of the WNK4 gene. *Hypertension* **46**, 295–300 (2005).
75. Gong, H. *et al.* A patient with pseudohypoaldosteronism type II caused by a novel mutation in WNK4 gene. *Endocrine* **33**, 230–234 (2008).
76. Cai, H. *et al.* WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. *Kidney Int.* **69**, 2162–2170 (2006).
77. Hadchouel, J., Ellison, D. H. & Gamba, G. Regulation of Renal Electrolyte Transport by WNK and SPAK-OSR1 Kinases. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 367–389 (2016).
78. 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.* **277**, 50812–50819 (2002).
79. Delpire, E. & Gagnon, K. B. E. SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. *Biochem. J.* **409**, 321–331 (2008).
80. Lin, S.-H. *et al.* Impaired phosphorylation of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter by oxidative stress-responsive kinase-1 deficiency manifests hypotension and Bartter-like syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 17538–17543 (2011).
81. Saritas, T. *et al.* SPAK differentially mediates vasopressin effects on sodium cotransporters. **24**, 407–418 (2013).
82. McCormick, J. A. *et al.* A SPAK isoform switch modulates renal salt transport and blood pressure. *Cell Metabolism* **14**, 352–364 (2011).

83. Piechotta, K., Garbarini, N., England, R. & Delpire, E. Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 52848–52856 (2003).
84. Richardson, C. *et al.* Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J. Cell. Sci.* **121**, 675–684 (2008).
85. Gagnon, K. B. E., England, R. & Delpire, E. Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl cotransporter. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 689–698 (2006).
86. Moriguchi, T. *et al.* WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J. Biol. Chem.* **280**, 42685–42693 (2005).
87. Vitari, A. C. *et al.* Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem. J.* **397**, 223–231 (2006).
88. Zhang, J., Siew, K., Macartney, T., O'Shaughnessy, K. M. & Alessi, D. R. Critical role of the SPAK protein kinase CCT domain in controlling blood pressure. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 4545–4558 (2015).
89. Grimm, P. R. *et al.* SPAK isoforms and OSR1 regulate sodium-chloride co-transporters in a nephron-specific manner. *J. Biol. Chem.* **287**, 37673–37690 (2012).
90. Yang, S.-S. *et al.* SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. **21**, 1868–1877 (2010).
91. Rafiqi, F. H. *et al.* Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol Med* **2**, 63–75 (2010).
92. Berndsen, C. E. & Wolberger, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 301–307 (2014).
93. Canning, P. *et al.* Structural basis for Cul3 protein assembly with the BTB-Kelch family of E3 ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* **288**, 7803–7814 (2013).
94. Genschik, P., Sumara, I. & Lechner, E. The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications. *EMBO J.* **32**, 2307–2320 (2013).
95. Ji, A. X. & Privé, G. G. Crystal structure of KLHL3 in complex with Cullin3. *PLoS ONE* **8**, e60445 (2013).
96. Louis-Dit-Picard, H. *et al.* KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nat. Genet.* **44**, 456–60– S1–3 (2012).
97. McCormick, J. A. *et al.* Hyperkalemic hypertension-associated cullin 3 promotes WNK signaling by degrading KLHL3. *J. Clin. Invest.* **124**, 4723–4736 (2014).
98. Shibata, S., Zhang, J., Puthumana, J., Stone, K. L. & Lifton, R. P. Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 7838–7843 (2013).

99. Ohta, A. *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. *Biochemical Journal* **451**, 111–122 (2013).
100. Wakabayashi, M. *et al.* Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep* **3**, 858–868 (2013).
101. Wu, G. & Peng, J.-B. Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation. *FEBS Lett.* **587**, 1717–1722 (2013).
102. Cornelius, R. J. *et al.* Dual gain and loss of cullin 3 function mediates familial hyperkalemic hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, 2 (2018).
103. Arroyo, J. P. *et al.* Nedd4-2 modulates renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter via the aldosterone-SGK1-Nedd4-2 pathway. **22**, 1707–1719 (2011).
104. Ko, B. *et al.* RasGRP1 stimulation enhances ubiquitination and endocytosis of the sodium-chloride cotransporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F300–9 (2010).
105. Kahle, K. T. *et al.* WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 2064–2069 (2004).
106. Ohno, M. *et al.* Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* **136**, 25–35 (2011).
107. Wilson, F. H. *et al.* Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 680–684 (2003).
108. Yang, C.-L., Angell, J., Mitchell, R. & Ellison, D. H. WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J. Clin. Invest.* **111**, 1039–1045 (2003).
109. Yang, C.-L., Zhu, X., Wang, Z., Subramanya, A. R. & Ellison, D. H. Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J. Clin. Invest.* **115**, 1379–1387 (2005).
110. Golbang, A. P. *et al.* Regulation of the expression of the Na/Cl cotransporter by WNK4 and WNK1: evidence that accelerated dynamin-dependent endocytosis is not involved. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**, F1369–76 (2006).
111. Mu, S. *et al.* Epigenetic modulation of the renal β -adrenergic–WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. *Nature Medicine* **17**, 573–580 (2011).
112. Melnikov, S., Mayan, H., Uchida, S., Holtzman, E. J. & Farfel, Z. Cyclosporine metabolic side effects: association with the WNK4 system. *Eur. J. Clin. Invest.* **41**, 1113–1120 (2011).
113. Hoorn, E. J. *et al.* The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nature Medicine* **17**, 1304–1309 (2011).

114. Castañeda-Bueno, M. *et al.* Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 7929–7934 (2012).
115. San-Cristobal, P. *et al.* Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 4384–4389 (2009).
116. Pasantes-Morales, H. Channels and Volume Changes in the Life and Death of the Cell. *Mol. Pharmacol.* **90**, 358–370 (2016).
117. Piali, A. T. *et al.* Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal* **7**, ra41–ra41 (2014).
118. Gamba, G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol. Rev.* **85**, 423–493 (2005).
119. Castañeda-Bueno, M. & Gamba, G. Physiological Role of SLC12 Family Members in the Kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* ajprenal.00071.2016 (2016).
120. Dowd, B. F. X. & Forbush, B. PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J. Biol. Chem.* **278**, 27347–27353 (2003).
121. Richardson, C. *et al.* Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J. Cell. Sci.* **121**, 675–684 (2008).
122. Rinehart, J. *et al.* WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 16777–16782 (2005).
123. Arroyo, J. P., Kahle, K. T. & Gamba, G. The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 288–298 (2013).
124. Pacheco-Alvarez, D. & Gamba, G. WNK3 is a putative chloride-sensing kinase. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 1123–1134 (2011).
125. Cruz-Rangel, S., Gamba, G., Ramos-Mandujano, G. & Pasantes-Morales, H. Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells. *Pflugers Arch.* **464**, 317–330 (2012).
126. Cruz-Rangel, S. *et al.* Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **301**, C601–8 (2011).
127. Chang, M.-H. *et al.* Slc26a9--anion exchanger, channel and Na⁺ transporter. *J. Membr. Biol.* **228**, 125–140 (2009).
128. Gamba, G. Revisiting the NaCl cotransporter regulation by with-no-lysine kinases. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **308**, C779–C791 (2015).
129. Terker, A. S. *et al.* Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis. *Kidney Int.* **89**, 127–134 (2015).

130. Yang, C.-L., Zhu, X. & Ellison, D. H. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J. Clin. Invest.* **117**, 3403–3411 (2007).
131. Weinstein, A. M. A mathematical model of rat distal convoluted tubule. I. Cotransporter function in early DCT | Renal Physiology. *American Journal of Physiology-Renal ...* (2005).
132. Boettger, T. *et al.* Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter *Kcc4*. *Nature* **416**, 874–878 (2002).
133. Terker, A. S. *et al.* Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride. *Cell Metabolism* **21**, 39–50 (2015).
134. Castañeda-Bueno, M. *et al.* Modulation of NCC activity by low and high K(+) intake: insights into the signaling pathways involved. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **306**, F1507–19 (2014).
135. Wade, J. B. *et al.* SPAK-mediated NCC regulation in response to low-K+ diet. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **308**, F923–31 (2015).
136. Moes, A. D., van der Lubbe, N., Zietse, R., Loffing, J. & Hoorn, E. J. The sodium chloride cotransporter SLC12A3: new roles in sodium, potassium, and blood pressure regulation. *Pflugers Arch.* **466**, 107–118 (2014).
137. Zhang, C. *et al.* KCNJ10 determines the expression of the apical Na-Cl cotransporter (NCC) in the early distal convoluted tubule (DCT1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 201411705–11869 (2014).
138. Wu, P. *et al.* Angiotensin II stimulates basolateral 10-pS Cl channels in the thick ascending limb. *Hypertension* **61**, 1211–1217 (2013).
139. Crowley, S. D. *et al.* Role of AT1 receptor-mediated salt retention in angiotensin II-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**, F1124–F1130 (2011).
140. Castañeda-Bueno, M. *et al.* Phosphorylation by PKC and PKA regulate the kinase activity and downstream signaling of WNK4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E879–E886 (2017).
141. Blaine, J., Chonchol, M. & Levi, M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 1257–1272 (2015).
142. Houillier, P., Nicolet-Barousse, L., Maruani, G. & Paillard, M. What keeps serum calcium levels stable? *Joint Bone Spine* **70**, 407–413 (2003).
143. Hoenderop, J. G. J., Nilius, B. & Bindels, R. J. M. Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* **85**, 373–422 (2005).
144. Riccardi, D. & Gamba, G. The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease. **30**, 436–448 (1999).
145. Riccardi, D. & Brown, E. M. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**, F485–99 (2010).
146. Ward, D. T. & Riccardi, D. Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **445**, 169–176 (2002).

147. Massy, Z. A., Hénaut, L., Larsson, T. E. & Vervloet, M. G. Calcium-sensing receptor activation in chronic kidney disease: effects beyond parathyroid hormone control. *Semin. Nephrol.* **34**, 648–659 (2014).
148. Akizawa, T. *et al.* PTH-dependence of the effectiveness of cinacalcet in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Sci Rep* **6**, 19612 (2016).
149. Riccardi, D. & Kemp, P. J. The calcium-sensing receptor beyond extracellular calcium homeostasis: conception, development, adult physiology, and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 271–297 (2012).
150. Toka, H. R. & Pollak, M. R. The role of the calcium-sensing receptor in disorders of abnormal calcium handling and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **23**, 494–501 (2014).
151. Mayr, B., Schnabel, D., Dörr, H.-G. & Schöfl, C. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Gain and loss of function mutations of the calcium-sensing receptor and associated proteins: current treatment concepts. *Eur. J. Endocrinol.* **174**, R189–208 (2016).
152. Brown, E. M. *et al.* Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575–580 (1993).
153. Ward, D. T. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium* **35**, 217–228 (2004).
154. Garrett, J. E. *et al.* Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J. Biol. Chem.* **270**, 12919–12925 (1995).
155. Chun, L., Zhang, W.-H. & Liu, J.-F. Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 312–323 (2012).
156. Hu, J., Reyes-Cruz, G., Chen, W., Jacobson, K. A. & Spiegel, A. M. Identification of acidic residues in the extracellular loops of the seven-transmembrane domain of the human Ca^{2+} receptor critical for response to Ca^{2+} and a positive allosteric modulator. *J. Biol. Chem.* **277**, 46622–46631 (2002).
157. Nemeth, E. F., Van Wagenen, B. C. & Balandrin, M. F. Discovery and Development of Calcimimetic and Calcilytic Compounds. *Prog Med Chem* **57**, 1–86 (2018).
158. Breitwieser, G. E., Miedlich, S. U. & Zhang, M. Calcium sensing receptors as integrators of multiple metabolic signals. *Cell Calcium* **35**, 209–216 (2004).
159. Hu, J., Hauache, O. & Spiegel, A. M. Human Ca^{2+} receptor cysteine-rich domain. Analysis of function of mutant and chimeric receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 16382–16389 (2000).
160. Islam, M. S. *Calcium Signaling*. **740**, (Springer Science & Business Media, 2012).
161. Ward, D. T. & Riccardi, D. New concepts in calcium-sensing receptor pharmacology and signalling. *British Journal of Pharmacology* **165**, 35–48 (2012).
162. Widler, L. Calcilytics: antagonists of the calcium-sensing receptor for the treatment of osteoporosis. *Future Med Chem* **3**, 535–547 (2011).
163. Gorvin, C. M. *et al.* $\text{G}\alpha_{11}$ mutation in mice causes hypocalcemia rectifiable by calcilytic therapy. *JCI Insight* **2**, e91103 (2017).

164. Petrel, C. *et al.* Positive and negative allosteric modulators of the Ca²⁺-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 18990–18997 (2004).
165. Wu-Zhang, A. X. & Newton, A. C. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. *Biochem. J.* **452**, 195–209 (2013).
166. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, F291–302 (2001).
167. Handlogten, M. E., Huang, C., Shiraiishi, N., Awata, H. & Miller, R. T. The Ca²⁺-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a Gqalpha -dependent ERK-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 13941–13948 (2001).
168. Wettschureck, N. & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* **85**, 1159–1204 (2005).
169. Toka, H. R. *et al.* Deficiency of the calcium-sensing receptor in the kidney causes parathyroid hormone-independent hypocalciuria. **23**, 1879–1890 (2012).
170. Kos, C. H. *et al.* The calcium-sensing receptor is required for normal calcium homeostasis independent of parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* **111**, 1021–1028 (2003).
171. Graca, J. A. Z. *et al.* Comparative expression of the extracellular calcium-sensing receptor in the mouse, rat, and human kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **310**, F518–33 (2016).
172. Riccardi, D. & Valenti, G. Localization and function of the renal calcium-sensing receptor. *Nat Rev Nephrol* **12**, 414–425 (2016).
173. Riccardi, D. *et al.* Localization of the extracellular Ca²⁺-polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **274**, F611–F622 (1998).
174. Mandon, B., Siga, E., Roinel, N. & De Rouffignac, C. Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ transport in the cortical and medullary thick ascending limb of the rat nephron: influence of transepithelial voltage. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **424**, 558–560 (1993).
175. Simon, D. B. *et al.* Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat. Genet.* **13**, 183–188 (1996).
176. Suki, W. N. *et al.* Acute treatment of hypercalcemia with furosemide. *New England Journal of Medicine* **283**, 836–840 (1970).
177. Hebert, S. C., Brown, E. M. & Harris, H. W. Role of the Ca(2+)-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J. Exp. Biol.* **200**, 295–302 (1997).
178. Wang, W., Lu, M., Balazy, M. & Hebert, S. C. Phospholipase A2 is involved in mediating the effect of extracellular Ca²⁺ on apical K⁺ channels in rat TAL. *Am. J. Physiol.* **273**, F421–9 (1997).

179. de Jesus Ferreira, M. C. *et al.* Co-expression of a Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca²⁺-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of hormone-dependent cAMP accumulation by extracellular Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* **273**, 15192–15202 (1998).
180. Ortiz, P. A. cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. *AJP: Renal Physiology* **290**, F608–16 (2006).
181. Friedman, P. A. Codependence of renal calcium and sodium transport. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 179–197 (1998).
182. Topala, C. N. *et al.* Activation of the Ca²⁺-sensing receptor stimulates the activity of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. *Cell Calcium* **45**, 331–339 (2009).
183. Shibata, S. *et al.* Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch-like 3, preventing WNK4 degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 15556–15561 (2014).
184. AbdAlla, S., Lothar, H. & Qwitterer, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**, 94–98 (2000).
185. Gill, J. R. & Bartter, F. C. On the impairment of renal concentrating ability in prolonged hypercalcemia and hypercalciuria in man. *J. Clin. Invest.* **40**, 716–722 (1961).
186. Sands, J. M. *et al.* Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* **99**, 1399–1405 (1997).
187. Kwon, T.-H., Frøkiaer, J. & Nielsen, S. Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis. *Kidney Res Clin Pract* **32**, 96–102 (2013).
188. Pepe, J. *et al.* MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Cardiovascular manifestations of primary hyperparathyroidism: a narrative review. *Eur. J. Endocrinol.* **177**, EJE–17–0485–R308 (2017).
189. Fuleihan, G. E.-H. & Silverberg, S. J. Primary hyperparathyroidism: Clinical manifestations - UpToDate. 1–28 (2018). Available at: (Accessed: 1st September 2018)
190. Rossi, G. P. Hyperparathyroidism, arterial hypertension and aortic stiffness: a possible bidirectional link between the adrenal cortex and the parathyroid glands that causes vascular damage? *Hypertens. Res.* **34**, 286–288 (2011).
191. Koch, C. A. & Chrousos, G. P. *Endocrine Hypertension*. (Springer Science & Business Media, 2012).
192. Medina, J. *et al.* Positive Allosteric Modulation of the Calcium-sensing Receptor by Physiological Concentrations of Glucose. *J. Biol. Chem.* jbc.M116.729863 (2016).
193. Colosia, A. D., Palencia, R. & Khan, S. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes Metab Syndr Obes* **6**, 327–338 (2013).
194. Rojas-Vega, L. *et al.* Ovarian Hormones and Prolactin Increase the Renal NaCl Cotransporter Phosphorylation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **308**, ajprenal.00447.2014–F808 (2015).

195. Chávez-Canales, M. *et al.* Insulin increases the functional activity of the renal NaCl cotransporter. *J. Hypertens.* **31**, 303–311 (2013).
196. Maillard, M. P., Tedjani, A., Perregaux, C. & Burnier, M. Calcium-sensing receptors modulate renin release in vivo and in vitro in the rat. *J. Hypertens.* **27**, 1980–1987 (2009).
197. Monroy, A., Plata, C., Hebert, S. C. & Gamba, G. Characterization of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F161–9 (2000).
198. Zhang, C., Zhang, T., Zou J., Miller, C., Gorkhali, R., Yang, J., Schillmiller, A., Wang, S., Huang, K., Brown, E.M., Moremen, K.W. Structural basis for regulation of human calcium-sensing receptor by magnesium ions and an unexpected tryptophan derivative co-agonist. *Si. Adv.* **2**, e1600241 (2016).

Anexo 1. Otras publicaciones

El trabajo realizado durante mi doctorado dió origen a las dos publicaciones principales mostradas arriba, sin embargo, también tuve la oportunidad de participar en los siguientes trabajos:

- Murillo-de-Ozores AR, et al., (2018). C-terminally truncated, kidney-specific variants of the WNK4 kinase lack several sites that regulate its activity. *J Biol Chem.* 293(31): 12209-12221.
- Barba-Navarro R, et al.,(2017). Spironolactone and Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery: A Randomized Placebo Controlled Trial. *Am J of Kidney Dis.* 69(2): 192-199.
- Mercado A, et al., (2016). With no lysine L-WNK1 isoforms are negative regulators of the K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 311(1): C54–66.
- Rojas-Vega L, et al., (2015). Increased phosphorylation of the renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter in male kidney transplant recipient patients with hypertension: a prospective cohort. *Am J Physiol. Renal Physiol.* 309(10): F836-42.

Artículos de revisión

- Bazúa-Valenti S, et al., (2016). Physiological Role of SLC12 Family Members in the Kidney. *Am J Physiol. Renal Physiol.* 311 (1): F131-44.
- Bazúa-Valenti S & Gamba G. (2015). Revisiting the NaCl cotransporter regulation by with-no-lysine kinases. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 308(10): C779–C791.