MICHELLE SOUSA AGOSTINHO

EFEITO DO NFAT (FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS) SOBRE O CONTROLE DA EXPRESSÃO DE WNK4 (WITH NO LYSINE KINASE 4) EM CÉLULAS DE NÉFRON DISTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

MICHELLE SOUSA AGOSTINHO

EFEITO DO NFAT (FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS) SOBRE O CONTROLE DA EXPRESSÃO DE WNK4 (WITH NO LYSINE KINASE 4) EM CÉLULAS DE NÉFRON DISTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

Michelle Sousa Agostinho

Efeito do NFAT (Fator nuclear de células T ativadas) sobre o controle da expressão de WNK4 (With no Lysine Kinase 4) em células de néfron distal.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia humana

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças

Versão original.

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Agostinho, Michelle Sousa
Efeito do NFAT (Fator nuclear de células T ativadas) sobre o controle da expressão de WNK4 (With no Lysine Kinase 4) em células de néfron distal. / Michelle Sousa Agostinho; orientador Nancy Amaral Rebouças. -- São Paulo, 2018.
76 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Fisiologia humana. 2. Fisiologia renal. 3. Regulação gênica. 4. WNK4. 5. NFAT. I. Rebouças, Nancy Amaral, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Michelle Sousa Agostinho

Titulo da Tese: Efeito do NFAT (Fator nuclear de células T ativadas) sobre o controle da expressão de WNK4 (With no Lysine Kinase 4) em células de néfron distal.

Orientador(a): Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a _____/_____/_____, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **737/15** referente ao projeto intitulado: "*Mecanismos moleculares envolvidos na modulação da função de AT1R por ATRAP e suas proteínas associadas e a repercussão sobre o transporte de íons em túbulos renais*" sob a responsabilidade de **Michelle Sousa Agostinho,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 15 de abril de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha mãe, luz da minha vida, pelo seu apoio fundamental para que eu sempre buscasse os meus sonhos e que sempre esteve ao meu lado, mesmo que a distância e também dedico esta conquista ao meu pai, que já não habita este plano, mas que sempre esteve comigo onde quer que eu fosse (e sempre estará).

AGRADECIMENTOS

Nesse momento passa um filme na minha cabeça, desde o dia que desembarquei em São Paulo sozinha, com uma mala maior que eu, em busca de um sonho que parecia tão impossível.

O meu primeiro agradecimento é para minha orientadora Profa. Nancy, a qual me recebeu de braços abertos em seu laboratório e me proporcionou a experiência incrível de me aventurar na biologia molecular. Todos os seus ensinamentos foram muito valiosos e os levarei para sempre comigo.

O meu segundo agradecimento vai para o meu companheiro Marcelo Travaglia, que me acompanhou nos momentos mais difíceis dessa jornada, que não hesitou em vir comigo ao laboratório aos domingos, feriados. Que sempre me faz rir, mesmo enxugando minhas lágrimas, dizendo: “vai dar tudo certo”. Você tornou tudo isso mais fácil.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Juliano Polidoro, Camila Nogueira e Mariana Bozoklian, por todas as ajudas, sugestões, ensinamentos e risadas. Incluo nessa lista Priscila Marys, que me ajudou muito em momentos importantes ao longo dessa jornada. Renato Crajoinas, meu amigo, agradeço muito todas as ajudas com sugestões, com os experimentos de calcineurina e com as inúmeras risadas que você me arranca. Muito obrigada!

Agradeço também ao Prof. Gehrard Malnic, Profa Raif Muza, Prof. Cassola e Prof. Procópio pelos ensinamentos e discussões valiosas durante as disciplinas e além delas. À Profa Adriana Girardi, Prof Onuchic e Profa Lisete pelas contribuições na banca de qualificação.

A todos os funcionários do ICB, em especial ao José Maria, o qual sempre buscou facilitar a nossa vida da maneira mais criteriosa possível.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que ficaram em Fortaleza e mesmo em meio a toda saudade, continuaram na torcida pela minha felicidade.

Agradeço ao amor incondicional da minha cadelinha, minha yorkshire Athena, que sem dúvidas foi minha maior companhia em todos os momentos.

Também devo agradecimento às entidades de fomento CNPq e FAPESP por tornarem o trabalho financeiramente executável.

Agradeço à força maior da natureza que chamamos de Deus e aos meus guias, que nunca me deixaram sozinha, mesmo quando eu achei que estivesse. Obrigada por ter a capacidade de raciocinar; pela coragem de lutar e pela força de não desistir.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram, meu sincero muito obrigada.

“Todo o nosso conhecimento se inicia com sentimentos.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar como a expressão de WNK4 (*With No Lysine Kinase 4*) é modulada por NFAT através da modulação por AngII (Angiotensina II) e Ciclosporina A (CsA). WNK4 é uma cinase que tem papel fundamental na regulação do transporte iônico ao longo do néfron distal, pois fosforila outras cinases (SPAK – *Proline Alanine-Rich Kinase* e OSR1 – *Oxidative Stress Responsive 1*) que fosforilam, e assim ativam, o co-transportador sódio-cloreto sensível aos tiazídicos (NCC), o que acarreta no aumento da reabsorção de sódio, cloreto e água, transporte esse sabidamente regulado pelo hormônio Angiotensina II. O estudo genético que revelou que mutações no gene de WNK geravam um quadro de hipertensão, hipercalemia e hipercalcemia, denominado de "pseudohipoaldosteronismo tipo II" (PHAII) ou Sídrome de Gordon, foi crucial para a descoberta da importância das WNKs. Este quadro é revertido quando se utiliza diuréticos tiazídicos, mostrando a relação com o NCC. Interessantemente, um quadro similar ocorre quando pacientes transplantados recebem tratamento com CsA. Estudos comprovam que AngII interfere agudamente no conteúdo da proteína de WNK4, por ativação da PKC e fosforilação da Kelchl3 (*Kelh-like 3*), culminando com inibição do complexo Ubiquitina-Ligase-E3, importante no processo de degradação da WNK4. Ainda não se sabe qual o papel do NFAT sobre a regulação de WNK4 e como AngII e CsA modulação a transcrição gênica de WNK4. Através dos métodos de westernblotting verificamos que CsA aumenta o conteúdo de WNK4. Por RT-PCR observamos também que AngII e CsA são capazes de aumentar significativamente o mRNA-WNK4 após 24h de incubação. Por ensaio da atividade da luciferase utilizando um vetor que apresenta o gene da luciferase sob o controle de promotor contendo elementos para ligação com NFAT, observamos que AngII parece aumentar atividade de NFAT. Observamos que CsA inibe significativamente a atividade da calcineurina através de ensaio enzimático e AngII não teve efeito significativo. Além disso, amplificamos o promotor do gene de WNK4 por PCR do DNA genômico e seguimos com a clonagem deste fragmento no vetor pGL4.10 (que apresenta o gene de luciferase como gene repórter). Neste constructo, vimos que tanto AngII como CsA são capazes de estimular o promotor do gene de WNK4. Após mutações pontuais para elementos NFAT no promotor de WNK4, observamos que o NFAT pode se ligar em diferentes elementos e essa diversidade gera efeitos estimulatórios e inibitórios na síntese proteica de WNK4, pois os elementos apresentam comportamentos diferentes na regulação da transcrição do gene repórter regulado pelo promotor do gene de WNK4. Assim, concluímos que AngII é capaz de estimular a síntese proteica de WNK4 por via dependente de NFAT.

ABSTRACT

This work aimed to understand how WNK4 expression is modulated by NFAT through AngII and CsA. Wnk4 is a kinase which plays a significant role in ionic transport regulation in distal nephron by inducing phosphorylation of other kinases such SPAK and OSR1, which ultimately lead to NCC phosphorylation. WNK4 activation increases sodium, water and chloride reabsorption in this segment and it´s already know that AngII can modulate this pathway. Genetic mapping studies showed that mutations in WNK gene lead to a hypertension, hyperkalemia and hypercalcemia condition, called Pseudohypoaldosteronism type II (PAH II) or Gordon's Syndrome. This finding was crucial for WNK's discovery. Interestingly, this disease is controlled with thiazide diuretics treatment, showing that NCC participates in its pathogenesis. Curiously, a similar condition occurs when transplant recipient are treated with cyclosporine A. AngII changes the WNK4 protein content, thought PKC activation and KLHL3 phosphorylation, leading to an inhibition of ubiquitin-ligase E3 complex, which is important to WNK4 degradation. It is still unclear how NFAT may modulate WNK4 gene expression. We show, by western blotting technique, that CsA increased WNK4 expression, but AngII had not significant effect. After 24h, AngII and CsA increased mRNA-WNK4 by RT-PCR. Using luciferase assay, we observed that AngII increases NFAT activity and CsA decreases NFAT activity, both significantly. AngII did not show effect on calcineurin activity but CsA was able to decrease it, after incubation during 4h. WNK4 gene promoter was amplified by PCR using genomic DNA as a template, and the sequence obtained was cloned in a recombinant vector which has a luciferase gene reporter. Using this recombinant vector cloned with WNK4 gene promoter, we observed that both AngII and CsA increase WNK4 expression. We made a mapping of genome sites for NFAT binding at WNK4 promoter and we identified four elements for NFAT binding. Point mutations in these sites were engineered in order to evaluate the NFAT action in WNK4 promoter activity. We could see that NFAT had an ambiguous behavior and this effect is dependent on which element NFAT is bounded. In summary, we conclude that AngII may increase WNK4 expression through activation of NFAT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Sequência parcial de aminoácidos da PKA e da WNK1..... 02
Figura 02 – Estrutura geral dos domínios das WNKs..... 03
Figura 03 – Estrutura cristalina do domínio catalítico de WNK1..... 03
Figura 04 – Sequência de nucleotídeos da região flanqueadora 5' e do promotor do gene hWNK4..... 05
Figura 05 – Esquema da cadeia de SPAK e OSR1 demonstrando os principais sítios de fosforilação por WNK1/WNK4..... 06
Figura 06 – Modulação da fosforilação de WNK4 por PP1 e SGK1..... 09
Figura 07 – Esquema explicando os mecanismos envolvidos com a hipertensão por sal e o sistema β2 adrenérgico no rim..... 10
Figura 08 – Esquema do modelo de interação entre o complexo ubiquitina ligase-KLHL3/CUL3 E3 e o substrato a ser ubiquitinado (A). Estrutura tridimensional do domínio β-propeler do domínio KLHL3, local de interação com o substrato (B)..... 11
Figura 09 – Esquema das alterações no PAHII..... 11
Figura 10 – Mapa de sítios de fosforilação da KLHL3..... 12
Figura 11 – Esquema proposto por Shibata et al. (2014) exemplificando a atuação do complexo ubiquitina-liga E3 sobre a WNK4..... 13
Figura 12 – Modelo esquemático da cascata de sinalização de fosforilação de WNK4 na S575..... 14
Figura 13 – Esquema resumindo as vias de sinalização envolvidas com as WNKs..... 16
Figura 14 – Sequência parcial do mRNA de WNK4 disponível nos bancos de dados (NCBI)..... 26
Figura 15 – Reações de bioluminescência catalisadas pela Firefly e Renilla luciferases..... 26
Figura 16 – Westernblotting para as principais proteínas envolvidas no estudo e para caracterização das células MDCK..... 27
Figura 17 – CsA 1µM aumenta significativamente o conteúdo de WNK4 após 6h de incubação..... 27
Figura 18 – Após 10h de incubação, AngII parece diminuir o conteúdo de WNK4, enquanto CsA 1µM parece aumentar..... 28

Figura 19 – PCR com para WNK4 em células MDCK com duas combinações de primers..... 28
Figura 20 – PCR para GAPDH em células MDCK..... 28
Figura 21 – Curvas de dissociação realizadas ao final das reações de RT-PCR de WNK4 e GAPDH 29
Figura 22 – Efeito da AngII e CsA sobre a quantidade de mRNA de WNK4 após 24h de incubação..... 29
Figura 23 – Reação de PCR do promotor do gene de WNK..... 23
Figura 24 – Mapa de restrição da sequência amplificada por PCR..... 30
Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose da reação de digestão com enzima NcoI do fragmento amplificado por PCR..... 31
Figura 26 – PCR de triagem de cinco colônias brancas selecionadas após a transformação usando vetor pJET1.2/blunt..... 31
Figura 27 – Backbone dos vetores pGL4.10 e pJET1.2/blunt..... 32
Figura 28 – PCR de triagem dos vetores pJET1.2 clonados com o promotor do gene de WNK, para confirmação da especificidade da sequência..... 33
Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose 0,5% da reação de digestão com enzima XhoI dos Clones III e IV, bem como do vetor pGL4.10..... 33
Figura 30 – Eletroforese em gel de agarose 0,5% da reação de digestão com enzima BglII do vetor pGL4.10 (A) e dos Clones III e I (B)..... 34
Figura 31 – Cálculo das quantidades dos fragmentos em ng de DNA a serem utilizados na reação de ligação..... 34
Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR para triagem das colônias..... 35
Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de digestão utilizando as enzimas KpnI e HindIII..... 35
Figura 34 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR do vetor REC B utilizando primers internos da sequencia do promotor..... 36
Figura 35 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR do promotor de WNK4 utilizando o DNA genômico como template..... 37
Figura 36 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de digestão com as enzimas KpnI e HindIII do vetor pGL4.10 e do fragmento de PCR obtido com os primers com adaptadores 37

Figura 37 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR para triagem das colônias recombinantes..... 38
Figura 38 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de digestão com as enzimas KpnI e HindIII dos clones J e K..... 38
Figura 39 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR do vetor CLONE J utilizando primers internos da sequencia do promotor..... 39
Figura 40 – Análise subjetiva da eficiência de transfecção de células MDCK em diferentes condições experimentais..... 39
Figura 41 – Efeito da AngII sobre a atividade de NFAT em células MDCK co-transfectadas com pGL4.30 e pRL-CMV..... 40
Figura 42 – Efeito da AngII e CsA sobre a atividade da calcineurina intracelular em células MDCK tratadas por 4h..... 40
Figura 43 – O vetor recombinante “Clone J” apresenta o promotor de WNK4 ativo em situações basais, demonstrando a eficiência de recombinação..... 42
Figura 44 – Efeito da AngII e CsA sobre o promotor de WNK4..... 43
Figura 45 – Efeito da mutação de elementos para NFAT no promotor de WNK4 em condições basais da célula..... 47
Figura 46 – Efeito da mutação de elementos para NFAT no promotor de WNK4 em condições basais da célula..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Descrição dos anticorpos utilizados no westernblotting..... 18

Tabela 02 – Lista dos primers utilizados para a padronização do PCR..... 20

Tabela 03 – Primers específicos utilizados no RT-PCR..... 21

Tabela 04 – Primers utilizados no PCR do promotor de WNK4..... 23

Tabela 05 – Sequencia de nucleotídeos dos primers com e sem adaptadores..... 37

Tabela 06 – Dados extraídos da plataforma *MatInspector* demonstrando a localização e a sequencia de quatro elementos para NFAT no promotor de WNK4..... 44

Tabela 07 – Sequências consensuais para ligação dos fatores de transcrição NFAT no promotor do gene de WNK4 e primers utilizados nas reações de mutação 45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH – Hormônio antidiurético
AngII – Angiotensina II
ANOVA – Análise de variância
AQP2 – Aquaporina 2
ASK – *Apoptosis signal-regulating kinase*
AT1R – Receptor de Angiotensina
ATP – Adenosina trifosfato
bp – Pares de bases
Ca-CMK – *Ca^{2+}-calmodulina cinase*
cAMP – Adenosina monofostato cíclico
CaSR – receptor sensível a cálcio
CFTR – *Cistic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*
Cl^- – Cloreto
CMV – Cytomegalovirus
CsA – ciclosporina-A
c-Src – Tirosinaa cinase Src
CUL3 – *Cullin 3*
DD – *Double-Digest*
DEPC – Diethylpyrocarbonate
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs – Desoxirribonucleosídeos trifosfatos
ECL – Enhanced Chemiluminescence reagents
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENaC – *Epithelial Sodium Channel*
ERK – *Extracelular Signal-Regulated Protein Kinase*
FHHt – Hipertensão famíliar hipercalêmica
GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP – Green fluorescent protein
GR – Receptor para glicocorticóide
HDAC8 – *Histone Deacetylase-8*
ICN – Inibidores da Calcineurina
IQ – Instituto de Químico
JNK – *c-Jun N-terminal kinases*
K^+ – Potássio
KLHL3 – *Kelch-like 3*
KS-WNK – Kidney specific-WNK
LB – *Luria Bertani*
LIPO – Lipofectamina
MAP – *Mitogen-Activated Protein*
MDCK – *Madin Darby Canine Kidney*
Na^+ – Sódio
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NCC – Cotransportador de sódio e cloreto
NFAT - *Nuclear fator of ativated T cells*
nGRE - n*egative glucocorticoid-responsive elements*
OSR1 – *Oxidative Stress-Responsive Kinase 1*
p38MAPK - *p38- Mitogen Activated Protein Kinases*

PAHII – Pseudohipoaldosteronismo Tipo II
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PI3K – *Phosphatidylinosiltol 3-kinase*
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína cinase C
PP1 – *Protein phosphatase 1*
PP2A – *Protein phosphatase 2A*
PP2B – *Protein phosphatase 2B*
PP4 – *Protein phosphatase 4*
PVDF – Fluoreto de polivinilideno
RLU – *Relative Luciferase Units*
RNA – Ácido Ribonucleico
ROMK – *Renal Outer Medullary* K^+ *Channel*
Rpm – Rotações por minuto
RV3 – *Reporter vector primer 3*
SDS – Sodium dodecyl sulfate
SGK1 – S*erum- and glucocorticoid-induced kinase*
SPAK – *STE20/SPS1-related Proline/Alanine Rich Kinase*
TCD – Túbulo convoluto distal
Tm – Melting temperature
TRPV4/5 – *Transient Receptor Potential Vanilloid-4/5* Ca^{2+}*-Channel*
UTR – Untranslated region
WNK – *With no lysine kinase*
β2-AR – Receptores β2 adrenérgicos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Estrutura geral das WNKs 2
1.2 Estrutura do gene e regulação da expressão das WNKs 4
1.2.1 WNK1 4
1.2.2 WNK4 4
1.3 Papel das WNKs no organismo 5
1.4 Regulação das WNKs 8
2 OBJETIVOS 17
2.1 Objetivos específicos 17
4 MATERIAL E MÉTODOS 18
4.1 Análise da modulação do conteúdo da proteína WNK4 através da técnica de *Western-immunoblotting* 18
4.3 Extração de RNA 19
4.4 Síntese de cDNA 19
4.5 Amplificação dos fragmentos 19
4.6 PCR em tempo Real (RT-PCR) 20
4.7 Análise da atividade da calcineurina intracelular (PP2B) 21
4.8 Caracterização do promotor do gene de WNK4 de cães por PCR convencional 22
4.9 Extração do DNA Genômico 23
4.10 PCR do DNA Genômico 23
4.11 Transformação de bactérias competentes 23
4.12 Digestão de DNA com enzimas de restrição 24
4.13 Transfecção em células MDCK 24
4.14 Avaliação do efeito de Angiotensina e Ciclosporina sob a atividade NFAT 24
4.15 Obtenção dos constructos mutados 25
4.16 Sequenciamento do DNA 25
4.17 Ensaio da atividade da luciferase 25
4.18 Análise estatística 26
5 RESULTADOS 27
5.1 Análise da expressão de proteínas de interesse nas células MDCK 27
5.2 Análise do conteúdo da proteína WNK4 por westernblotting 27

5.3 Padronização das reações de PCR convencional 28
5.4 Efeito da AngII e CsA sobre a quantidade de mRNA de WNK4 29
5.5 Obtenção do constructo contendo a sequência do promotor do gene de WNK4 30
5.6 Eficiência de transfecção de células MCDK 39
5.7 Avaliação dos efeitos de AngII sobre a modulação da via calcineurina/NFAT 40
5.8 Avaliação da atividade da PP2B intracelular 40
5.9 Avaliação da especificidade do constructo CLONE J através do sequenciamento gênico 41
5.10 Avaliação da atividade do promotor de WNK4 clonado no vetor pGL4.10 42
5.11 Avaliação dos efeitos de AngII e CsA sobre a atividade do promotor de WNK4 43
5.12 Mapeamento dos elementos de regulação gênica do promotor de WNK4 e mutação dos elementos regulados por NFAT 43
5.13 Mutação dos elementos NFAT 45
5.14 Efeito da mutação dos elementos para ligação de NFAT na transcrição gênica 47
6 Discussão 49
7 Conclusão 54
8 Referências Bibliográficas 55

1 INTRODUÇÃO

No ano 2000, Melanie Cobb e seus colaboradores[1], buscando novas proteínas da família MEK (MAP/ERK) cinases no sistema nervoso central, descobriram uma nova família de cinases que não apresentam o aminoácido lisina invariante no subdomínio II, mas sim no subdomínio I. Essa característica é bastante peculiar, tendo em vista que a lisina no subdomínio catalítico aparece em todas as proteínas cinases serina/treonina já descritas e é crucial para a ligação com o ATP e consequente atividade da enzima. Dessa forma, a equipe nomeou essa nova família de quinases de WNKs – *With no lysine(K) kinases* – em tradução livre "cinases sem lisina" (Xu et al., 2000).

Em mamíferos, são descritas 5 isoformas de WNKs (WNK1, WNK2, WNK3, WNK 4 e KS-WNK1). Em humanos, os 4 genes que codificam as WNKs (1 – 4) foram localizados nos cromossomos 12p13.33 (WNK1), 9q22.31 (WNK2), Xp11.22 (WNK3) e 17q21.31 (WNK4) (NCBI database). Vale ressaltar que a KS-WNK1 é uma isoforma truncada da WNK1, que parece ser expressa especificamente do túbulo convoluto distal do rim, dai o nome "KS" de "*kidney specific*" (Delaloy et al., 2003).

Devido ao fato das WNKs serem expressas em diversos tecidos, elas estão ligadas à regulação de várias funções fisiológicas, muitas delas ainda desconhecidas. WNK1 é amplamente expressa, sendo descrita nos testículos, coração, rim, musculatura esquelética, vasos sanguíneos, cólon, fígado, pâncreas e cérebro (O'Reilly et al., 2003); WNK2 é expressa principalmente no coração, cérebro e cólon (Verissimo & Jordan, 2001); WNK3 é expressa em baixos níveis no cérebro, pulmão, rim, fígado, pâncreas e em tecidos fetais incluindo placenta, cérebro, pulmão, rim, coração, timo e baço fetais (Holden; Cox; Raymond, 2004); WNK4 é expressa em tecidos que contém epitélios secretores como rim, pâncreas, ductos biliares, cólon, barreira hematoencefálica, epidídimo e pele (Kahle et al., 2004).

WNK1 e WNK4 vêm apresentando maior destaque por estarem relacionadas com doenças genéticas. Após 1 ano da descobertas das WNKs, Richard P. Lifton e seus colaboradores[2] demonstraram que mutações nos genes que codificam WNK1 e WNK4 estão associadas ao desenvolvimento de um tipo de hipertensão sensível a sal associada à hipercalemia, condição denominada de "Pseudohipoaldosteronismo Tipo II" (PAHII), "Hipertensão Hipercalemica Familiar" (FHHt) ou ainda "Síndrome de Gordon" (Wilson et al., 2001). A partir daí, inúmeros grupos de pesquisa vêm se dedicando ao estudo da regulação, função e demais mecanismos envolvidos com estas proteínas. A fim de otimizar a compreensão deste trabalho, focaremos na WNK1 e na WNK4.

---

[1] *The University of Texas Southwesten Medical Center, Dallas, Texas*

[2] *Howard Hughes Medical Institute, Yale University, New Haven, Connecticut*

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Estrutura geral das WNKs

Do ponto de vista estrutural, as proteínas cinases fazem parte de uma família de proteínas extremamente heterogêneas, mas que apresentam grande similaridade no domínio catalítico. Este domínio é divido em 12 subdomínios que compreendem cerca de 250-300 aminoácidos, dentre eles está o subdomínio I, que consiste em duas cadeias β que são separadas por uma alça contendo resíduos conservados de glicina. Essa alça rica em glicina age como uma alça flexível cobrindo e ancorando os grupos fosfatos não transferíveis do ATP. Já o subdomínio II apresenta um resíduo de lisina conservado no sítio catalítico, o qual ancora e orienta os fosfatos α e β do ATP (Bossemeyer, 1994).

As WNKs, como já citado, apresentam um domínio catalítico peculiar no qual não há uma lisina no domínio II e sim no domínio I. É fácil observar essa permutação ao comparar o domínio cinase da WNK1 com o da PKA. (Figura 01)

Figura 01 – Sequência parcial de aminoácidos da PKA e da WNK1. Em WNK1, o aminoácido correspondente à lisina da PKA é uma cisteína (C250) no domínio II. Em contrapartida, a lisina catalítica de WNK1 (K233) está presente no subdomínio I, ambos estão indicados na figura (Huang et al., 2007).

A cadeia de aminoácidos das quatro WNKs (1 – 4) é bastante divergente, por exemplo, WNK4 apresenta 1243 aminoácidos, enquanto WNK1 aparece com mais de 2382. Mesmo assim, elas apresentam diversas regiões similares (Figura 02), dentre elas está o domínio catalítico, no qual as WNKs compartilham cerca 85-90% de similaridade (Xu et al., 2005).

As proteínas cinases podem ser reguladas pela presença de um domínio autoinibitório. Este domínio age mantendo a atividade cinase inibida até que algum estímulo “libere” a enzima deste estado de inibição e possibilite a ativação dela. Esse domínio está localizado imediatamente adjacente ao domínio cinase e apresenta uma sequência de aproximadamente 70 aminoácidos com similaridade de 46% entre as WNKs (Xu et al., 2002).

Outro mecanismo de controle da atividade das WNKs é através da autofosforilação de resíduos na alça de ativação. Esses parecem ser os dois principais mecanismos de controle da atividade destas cinases; muito embora elas apresentem diversos sítios de interação com outras proteínas, como por exemplo, domínios "*coiled-coil*" e vários resíduos ricos em prolina (Huang et al., 2007).

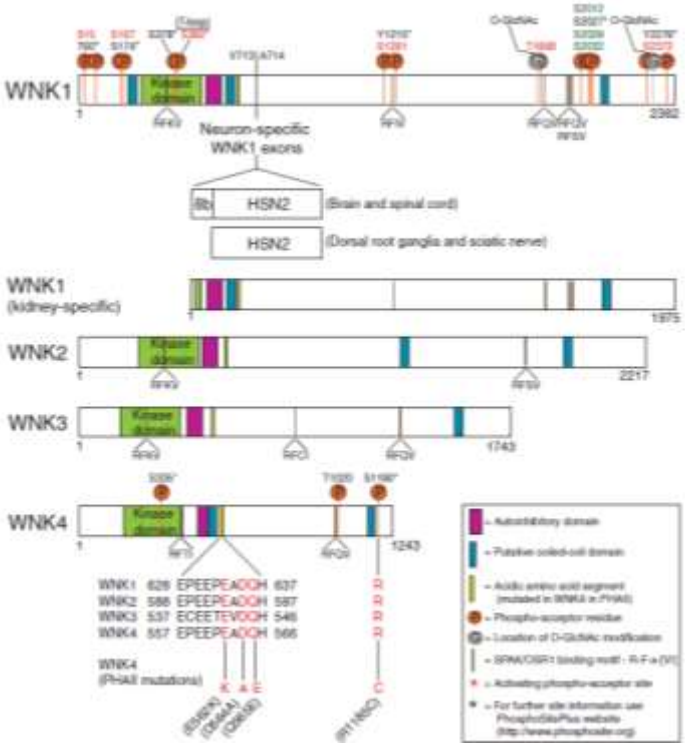

Figura 02 – Estrutura geral dos domínios das WNKs (Richardson & Alessi, 2008).

Domínios "*coiled-coil*" são caracterizados por um padrão de repetição do tipo "hepta", no qual os resíduos da primeira e da quarta posição são hidrofóbicos, enquanto que os da quinta e sétima posição são carregados com cargas positivas. Devido ao padrão de interação entre eles, esses domínios têm um papel importante na dinâmica de interação proteína-proteína (Mason et al., 2004).

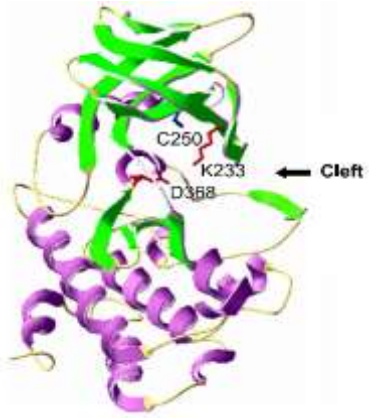

Figura 03 – Estrutura cristalina do domínio catalítico de WNK1. Os aminoácidos cisteína-250 estão representados em azul, bem como lisina-233 e aspartato-368 em vermelho. A fenda catalítica está representada como o "cleft" entre a cauda N-terminal (em verde) e a C-terminal (em roxo) (Huang et al., 2007).

1.2 Estrutura do gene e regulação da expressão das WNKs

1.2.1 WNK1

O gene da WNK1 de humanos tem aproximadamente 160kb contendo 28 exons e apresenta uma regulação transcricional bastante complexa, com a geração de isoformas decorrentes tanto de regiões promotoras quanto de *splicing* alternativos. Wilson et al. (2001), em seus experimentos de *Northen blot*, demonstraram a presença de diversos transcritos com cadeias de tamanhos diferentes, sugerindo a presença de formas variantes de WNK1. Nesse contexto, podemos ressaltar principalmente a KS-WNK1 como uma dessas isoformas já descobertas. O transcrito que codifica essa isoforma é gerado a partir de uma região promotora alternativa a montante do exon 4, gerando um primeiro "exon 4a", diferente do "exon 4" da isoforma WNK1 completa. Dessa forma, a KS-WNK1 perde os primeiros 437 aminoácidos (incluindo praticamente todo o domínio cinase) (Xu et al., 2000).

O promotor de WNK1 contém ilhas CpG que vão desde a região -1453 até +166 em referência ao sítio de início de transcrição (SIT) e, assim como outros promotores do tipo CpG, não apresentam o elemento regulador TATA-box; além disso, é um promotor que pode usar vários pontos para início de transcrição, como é típico dos promotores ricos em CpG (Veríssimo & Jordan, 2001). Adicionalmente, uma complexidade maior surge pela presença de dois sítios de poliadenilação, os quais podem alterar a estabilidade e eficiência de tradução do mRNA (Delaloy et al., 2003).

1.2.2 WNK4

O gene da WNK4 é bastante pequeno quando comparado ao gene das outras WNKs, pois contém cerca de 16kb com 19 exons. Os estudos sobre o promotor de WNK4 ainda são bastante escassos, alguns trabalhos mostram que a região promotora do gene de WNK4 humano (hWNK4) é do mesmo tipo que o de WNK1 humano (hWNK1), contendo ilhas CpG desde a posição -380 até a +425 relativas ao SIT.

Li e colaboradores (2008) mapearam o STI de hWNK4 através da técnica de RACE ("*Rapid amplification of cDNA ends*") e identificaram um possível elemento consensual iniciador usualmente presente em promotores sem TATA-box na posição -27, além disso eles encontraram também elementos consensuais para ligação de receptores para glicocorticóides (GR1 e GR2) e para os fatores de transcrição SP-1 (tipicamente presentes nos promotores do tipo GC-box), AP-1, AP-2α e C/EBP (Figura 04). Vale ressaltar que eles observaram que os sítios de ligação para GR1 e GR2 apresentam efeito inibitório sobre a atividade do promotor.

```
caaggtggcc tggaggggat ggatgaccgg gctctcggtt tgggggaggg actta tcctg -541

gggagtacac acccattccc tatgcagacc agagggacaa caacgtcaga cctttccact -481
AP-2
gacctctccg ttcggcctgg ggctactccg gacagttagg agggggtggt gctgccttat -421
           AP-2α
ctggggtgtg caggagggtg gtagcctccc cctaagtaat cccccactag ggtccgggtg -361

tcgttctctc ctgccctcct ccgcgcacaa acaggtttgc tcactcttag tgcgggagga -301
                          GR2      C/EBP
tgctccgcgg tctccactc agttctggcc tcagagtgag actgcggccg ggggctcggg -241
           GR1
aaagaagggg acgcggctgg gcggggcggt gactaaggtg aggggctgct cgcgggatcc -181
           SP-1
gcaccgcggg agcagctcgg aggggcggcc ctgggggca aggggcggcc gcggggcggc -121
           SP-1                  SP-1          SP-1
gacggggcg gggccaggcc gagctggggg ctggggccgc agccgctcag ccggagcgca -61
      SP-1
gcgcacccag cgagtccgtc tgtcaggccg cctcctctcc ggccgtctga ttttctaccc -1
ttcggcgccc tgctcttcct catgttggca tccccggcca cggagaccac cgtcctcatg +60
                       M  L  A   S  P  A   T  E  T  T   V  L  M
tcccagactg aggccgacct ggccctgcgg cccccgcctc ctcttggcac cgcggggcag +120
 S  Q  T   E  A  D  L   A  L  R   P  P  P   P  L  G  T   A  G  Q
```

Figura 04 – Sequência de nucleotídeos da região flanqueadora 5' e do promotor do gene hWNK4. Potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição estão delimitados por retângulos. O sítio de início de transcrição da proteína está indicado pela seta preta (Li et al. 2008).

Um único variante de WNK4 foi descrito, oriundo de um *splicing* alternativo no exon 22, levando à substituição de 46 aminoácidos terminais por 37 aminoácidos diferentes. Curiosamente, essa substituição elimina a serina que sofre fosforilação pela SGK1 ("*serum- and glucocorticoid-induced kinase 1*") (Rozansky, 2009). SGK1 é uma cinase, cujo promotor do gene é precocemente ativado por aldosterona, que estimula a secreção de K^+ por aumentar a atividade da Na^+/K^+– ATPase, além de aumentar a expressão e a atividade dos canais para Na^+ – ENaC – na membrana apical de células principais.

1.3 Papel das WNKs no organismo

Como comentado acima, a descoberta das WNKs esteve estreitamente relacionada ao PHAII, uma doença autossômica dominante na qual os pacientes exibem hipertensão arterial, hipercalemia, acidose metabólica e hipercalciúria, além disso, é marcada por uma alta sensibilidade a baixas doses de tiazídicos (Mayan et al., 2002). Analogamente, a Síndrome de Gilteman, uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene do NCC (*Na-Cl cotransporter*) que geram inibição deste transportador, causa hipotensão (revertida por aumento da ingesta de sal), hipocalemia, alcalose metabólica e hipocalciúria. Esses achados clínicos sugerem fortemente que o fenótipo do PAHII ocorra devido a um aumento da atividade do NCC decorrente de mutações nas WNKs (San Cristobal et al., 2008). A partir de então, inúmeros grupos de pesquisa buscam identificar as ações das WNKs e como elas regulam o NCC.

A atividade do NCC é regulada principalmente pelos mecanismos que modulam o conteúdo da proteína na célula (Abdallah e al., 2001) e o tráfico e expressão dela na membrana apical (Sandberg ; Maunsbach; McDonough, 2006). Esses mecanismos são controlados por diversos fatores, incluindo o conteúdo de sal na dieta, concentração de sal no lúmen tubular, além de fatores hormonais como angiotensina (Sandberg; Maunsbach; McDonough, 2006) e aldosterona (Velázquez et al., 1996).

O papel exato das WNKs sobre os transportadores de íons é bastante complexo, com diversos trabalhos controversos na literatura (Argaiz & Gamba, 2016). Muitos autores sugerem que a WNK4 reduza a atividade, a fosforilação e a meia-vida do NCC *in vivo* e *in vitro* (Wilson et al., 2003; Yang et al., 2003; Cai et al., 2006; Ko et al., 2012; Lalioti et al., 2006).

Por outro lado, também tem sido descrito que WNK4 ativa o NCC (Castañeda-Bueno et al., 2012; Wakabayashi et al., 2013). A equipe do Dr. Elisson (Yang et al., 2005; Yang; Zhu; Ellison, 2007; Subramanya et al., 2006) em estudos com oócitos de *Xenopus laevis*, sugerem que WNK1 não tenha efeito direto sobre a atividade intrínseca do NCC. Pois quando há expressão de WNK4 em oócito, há inibição do NCC, entretanto, quando há cotransfecção de WNK1 e WNK4, a atividade do NCC não é alterada, mostrando que WNK1 pode prevenir o efeito inibitório de WNK4 sobre o NCC (Lifton; Gharavi; Geller, 2001).

Sabe-se que as WNKs ativam duas cinases intermediárias pertencentes à família de cinases STE20 (Figura 05), chamadas de SPAK (*STE20/SPS1-related Proline/Alanine Rich Kinase*) e OSR1 (*Oxidative Stress-Responsive Kinase 1*) (Richardson & Alessi, 2008) e que estas fosforilam e ativam o NCC. WNK1 e WNK4 fosforilam SPAK e OSR1 em dois resíduos: treonina (T233 em SPAK e T185 em OSR1) e serina (S373 em SPAK e S325 em OSR1). Este seria o mecanismo pelo qual as WNKs ativam o NCC sendo, portanto, um efeito indireto.

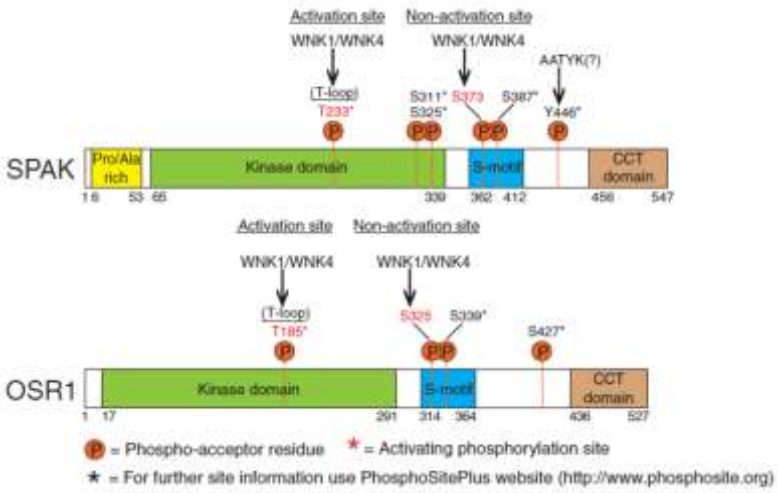

Figura 05 – Esquema da estrutura de SPAK e OSR1 demonstrando os principais sítios de fosforilação por WNK1/WNK4 (Richardson & Alessi, 2008).

Recentemente, utilizando modelos de mutações pontuais e substituição de aminoácidos, foram descritas três observações importantes sobre os mecanismos de ativação do NCC por WNK1. Primeiro, a ativação de NCC depende do sítio catalítico de WNK1, já que o mutante WNK1-D321A não é capaz de ativar NCC; segundo, o efeito de WNK1 é dependente da interação com SPAK/OSR1, já que o mutante WNK1-F316A (que perde a capacidade de fosforilar estas cinases) não ativa NCC e a terceira observação é que o efeito de WNK1 sobre NCC requer a interação de um domínio “HQ” presente na cadeia de WNK1. (Bazúa-Valenti et al., 2014).

O domínio HQ tem os aminoácidos histidina e glutamina conservados ao longo da alça C-terminal de todas WNKs, esse domínio é necessário para a interação WNK-WNK e é provável que esta interação seja um mecanismo crucial para a regulação da função destas enzimas. Nesse contexto, foi descrito inclusive que a dimerização das WNKs é necessária para a ativação delas (Yang; Zhu; Ellison, 2007).

Do ponto de vista da inibição da atividade do NCC, em ensaios usando oócitos de *Xenopus*, WNK4 diminui o conteúdo da proteína NCC na célula e, mais ainda, diminui a abundância dele na membrana apical, obviamente esses efeitos culminam com a diminuição da atividade do transportador. WNK4 diminui o tráfico do NCC para a membrana apical e desvia as vesículas para os lisossomos, num processo que não parece depender de clatrinas (Cai et al., 2006).

Subramanya et al. (2009) mostram evidências que WNK4 diminui o tráfico do NCC em preparações usando o “brefeldin A”, um inibidor da inserção de vesículas na membrana apical. Nestes experimentos, quando as células eram incubadas com brefeldin A, ocorria uma diminuição da densidade de NCC na membrana apical. Após a lavagem das células e remoção do brefeldin A, a densidade do NCC na membrana apical retornava aos níveis normais. Entretanto, quando WNK4 estava superexpressa, a densidade do NCC diminuía com a incubação do brefeldin A, mas após a remoção dele, os níveis de NCC na membrana apical não voltavam à normalidade. Neste mesmo trabalho, os autores mostram colocalização do NCC com AP-3, uma proteína adaptadora presente nas vesículas lisossomais. Esses achados sugerem fortemente que WNK4 desvia o tráfico de vesículas contendo NCC (que seriam inseridas na membrana apical oriundas do retículo endoplasmático) em direção aos lisossomos.

Recentemente, Argaiz et al (2018) demonstraram que a KS-WNK1 é um potente ativador de WNK4 e NCC. Além disso, KS-WNK1 interage com WNK4 e, enquanto estão interagindo, WNK4 permanece na forma autofosforilada na serina 335 (S335). Este efeito é dependente da concentração constante de cloreto no meio.

Outro achado interessante é o de que a sinalização pelo receptor sensível a cálcio (CaSR) é capaz de ativar o NCC através da via WNK4-SPAK (Bazúa-Valenti et al., 2018). É possível que a ativação do CaSR pelo cálcio na membrana apical

das células do túbulo distal aumente a reabsorção de NaCl pelo NCC e, como consequência, acontece a (bem estabelecida) diminuição da reabsorção de Ca^{2+}, levando assim à calciúria.

Além do NCC, já foi relatado que as WNKs também tem relação com vários outros alvos, incluindo o ENaC (*Epithelial Sodium Channel)*, ROMK (*Renal Outer Medullary K^+ Channel)*, SGK, TRPV4/5 (*Transient Receptor Potential Vanilloid-4/5 Ca^{2+}-Channel*), CFTR (*Cistic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), claudinas, dentre outros (Huang et al., 2007). Embora já se saiba muito sobre as WNKs, ainda estamos longe de compreender totalmente o papel delas no organismo.

1.4 Regulação das WNKs

A descoberta da cascata de fosforilação WNK–SPAK/OSR1–NCC teve implicações importantes no entendimento não só de doenças genéticas raras, mas também de mecanismos que regulam a pressão arterial e a homeostase hidrossalina do organismo. Por essa razão, a regulação fisiológica dessa cascata tem sido amplamente estudada e já foram descritos vários agentes capazes de regular as WNKs. Como já comentado, a concentração de sal na dieta é um deles; onde a baixa ingestão de sal aumenta a fosforilação e atividade do NCC, contrariamente, a alta ingestão diminui tanto fosforilação como a atividade (Chiga et al., 2008).

Existem situações fisiológicas nas quais a reabsorção de Na^+ em néfron distal pode estar dissociada da secreção de K^+, como em situações de contração de volume extracelular, tanto em condições de normo ou de hipocalemia. Nestas situações, a reabsorção de Na^+ estará desviada para túbulo convoluto distal (TCD), onde a reabsorção de Na^+ não é eletrogênica e não está associada à secreção de K^+. Paralelamente, a secreção de K^+ (via ROMK) deverá estar diminuída. Uma segunda situação é observada em condições de sobrecarga de K^+ (o que estimula fortemente a secreção de aldosterona) sem alteração do volume extracelular, onde a reabsorção de Na^+ deve ocorrer principalmente em segmento de conexão e ducto coletor cortical (DCC), onde agora ela é eletrogênica (via ENaC). A reabsorção de Na^+ por este receptor despolariza a membrana apical das células principais, afastando o potencial de membrana do potencial de equilíbrio do K^+, o que favorece o movimento deste íon da célula em direção à luz tubular, com maior efluxo de K^+ pelos canais ROMK, culminando com o aumento da secreção de K^+.

Na primeira situação, usualmente observa-se níveis plasmáticos de AngII elevados e de aldosterona apenas levemente aumentados. Já na segunda situação, os níveis de plasmáticos de aldosterona estão muito aumentados e os níveis de AngII estão baixos (Vallon et al., 2009).

A comutação da reabsorção de Na^+ de TCD para DCC depende de WNKs, de SGK e também de PP1 (*phosphatase protein 1)*. Foi demonstrada a participação de SGK1 (ativada por aldosterona) na sinalização WNK4-ROMK

(Rozansky et al., 2009). Lin et al. (2012) sugerem ainda a possibilidade da tirosina cinase Src (c-Src) regular a interação entre WNK4 e SGK1. Neste trabalho, eles mostram que a ligação da proteína PP1 (através do aminoácido 695-9) reverte a ativação de WNK4 por SGK1, pois PP1 desfosforila WNK4, mantendo os efeitos inibitórios dela sobre o ROMK (Figura 06).

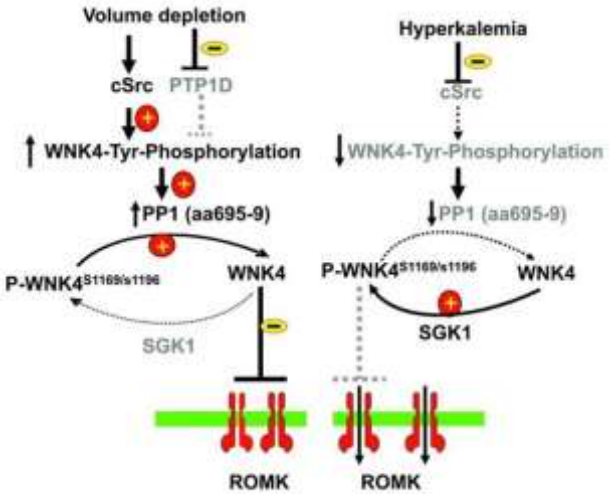

Figura 06 – Modulação da fosforilação de WNK4 por PP1 e SGK1 proposto por Lin et al., 2012.

Já foi demonstrada também a participação das MAP/ERK (*Mitogen-Activated Protein/ Extracelular Signal-Regulated Protein Kinase*) (Vitari et al., 2004; Vitari et al., 2005). Lai et al (2012) observaram que mudanças na ingestão de sal afeta a quantidade da proteína NCC e do mRNA-NCC e que este mecanismo é dependente de WNK4, pois animais submetidos à dieta com alta concentração de sal apresentaram diminuição da expressão de NCC e do mRNA-NCC e aumento do mRNA-WNK4, além disso a fosforilação de ERK1/2 também estava aumentada; contrariamente, a baixa ingestão de sal, aumentou o conteúdo da proteína e do mRNA de NCC e diminuiu o mRNA-WNK4, bem como os níveis de ERK1/2 fosforilada. Além disso, estes autores encontraram aumento de ERK1/2 fosforilada em células com superexpressão de WNK4 e diminuição em células knockdown de WNK4.

Mu et al (2011), mostraram num belíssimo trabalho, que a estimulação dos receptores β2 adrenérgicos (β2-AR) no rim diminui a transcrição do gene de WNK4 através da inibição da HDAC8 (*Histone Deacetylase-8*) e esta inibição é dependente de cAMP-PKA. A inibição de HDAC8, mantém aumentados os níveis de acetilação de histonas no DNA, possibilitando a ligação do receptor para glicocorticóide (GR) – estimulado pela ligação com glicocorticóide – em elementos regulatórios negativos (nGRE – n*egative glucocorticoid-responsive elements*) no promotor do gene de WNK4, logo esta interação GR-nGRE promove diminuição da transcrição gênica de WNK4 (Figura 07).

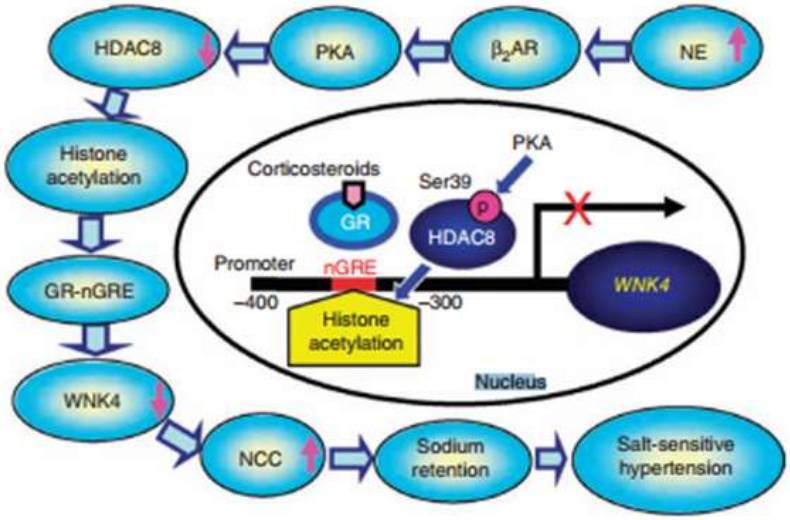

Figura 07 – Esquema hipotético explicando um dos mecanismos envolvidos com a gênese da hipertensão sensível à sal. O aumento estimulação adrenérgica no rim induz a fosforilação da HDAC8 através da via cAMP-PKA, aumentando a acetilação de histonas no promotor do gene de WNK4, possibilitando a ligação do GR em nGRE desta região e diminuição da transcrição gênica de WNK4, afetando o controle da atividade do NCC, aumentando a reabsorção de sódio e água, culminando com a instalação do quadro de hipertensão sensível à sal. (Mu et al., 2011).

Além das vias já citadas de regulação do NCC, destaca-se também a participação da PP4 (*protein phosphatase 4*), a qual inibe o NCC através da desfosforilação da tirosina 58 (T58) – T60 em humanos (Glover et al., 2010) e a γ-aducina, uma proteína que se co-localiza com o NCC e parece auxiliar a interação da porção N-terminal do NCC (um domínio que apresenta diversos sítios de fosforilação) com as cinases (Dimke et al., 2011)

Embora tenha sido observado que mutações em WNK1 e WNK4 causavam o PHAII, mais de 70% dos casos de hipertensão familiar não apresentavam mutações nestes genes. Isso levou ao *screening* de outros genes que pudessem estar associados a essa condição genética. Assim, observou-se que mutações em duas outras proteínas também causavam o PHAII, são elas KLHL3 (*Kelch-like 3*) e CUL3 (*Cullin 3*). Isso levou a associação destas proteínas com as WNKs (Boyden et al., 2008).

KLHL3 e CUL3 são proteínas pertencentes ao grupo ubiqutina-ligase E3 (Figura 08), ou seja, elas fazem parte do complexo de ubiquitinação das WNKs, processo no qual resulta no direcionamento destas para o sistema de degradação da célula (Ji & Prive, 2013). CUL3 é expressa de forma ubíqua ao longo do néfron, apresentando alta densidade no túbulo proximal, enquanto a KLHL3 é expressa principalmente no segmento espesso da alça de Henle, no túbulo convoluto distal e no ducto coletor (Bertram et al., 2011).

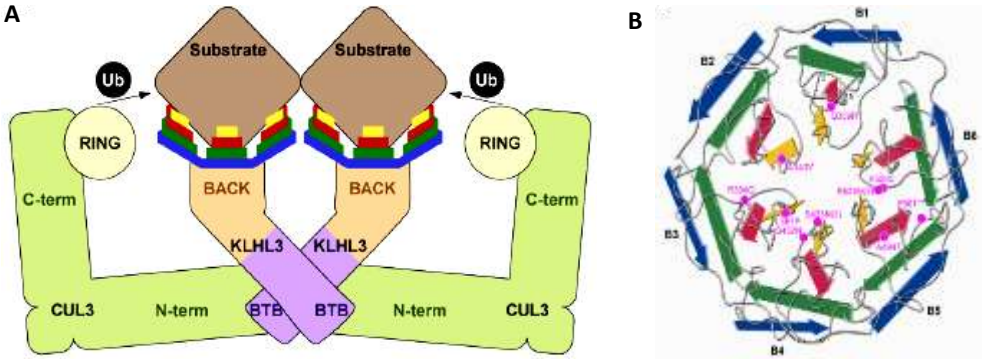

Figura 08 – Esquema do modelo de interação entre o complexo ubiquitina ligase-KLHL3/CUL3 E3 e o substrato a ser ubiquitinado (A). Estrutura tridimensional do domínio β-propeler do domínio KLHL3, local de interação com o substrato (B) (Boyden et al. 2008).

Ohta e colaboradores (2013) mostraram que tanto a WNK1 quanto a WNK4 são alvos do complexo ubiquitina-ligase KLHL3-CUL3 E3, esses pesquisadores demonstraram também que a perda da capacidade de interação entre KLHL3 e WNK4 ocasiona diminuição da degradação de WNK4 e consequente aumento do conteúdo da proteína na célula.

Susa e colaboradores (2014) criaram modelos de camundongo knock-in *KLHL3*$^{R528H/+}$, a mesma mutação apresentada nos pacientes com PAHII (Figura 09), nesta mutação, KLHL3 perde a capacidade de interagir com as WNKs. Eles observaram que estes camundongos apresentavam aumento do conteúdo basal de WNK1 e WNK4, indicando que ambas são reguladas por esse complexo KLHL3/CUL3.

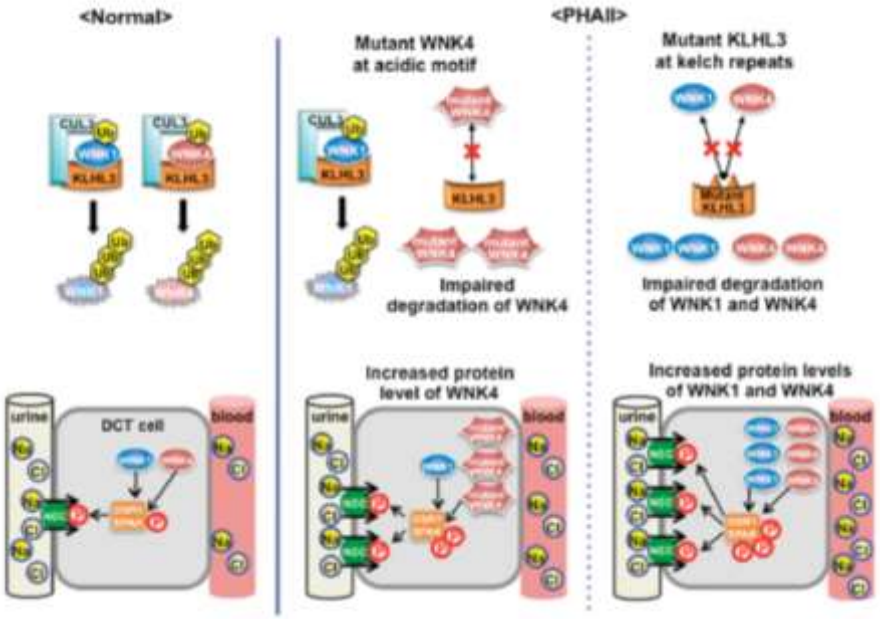

Figura 09 – Esquema das alterações no PAHII. A primeira imagem mostra uma situação de um individuo normal. Na segunda imagem é possível observar as alterações no conteúdo de WNK4 e consequente aumento da atividade do NCC na membrana apical da célula (Boyden et al. 2008).

Shibata et al (2013) demonstraram que a fosforilação da KLHL3 na serina 433 (S433) também é capaz de diminuir a capacidade de interação com as WNKs, curiosamente, este sítio é o mesmo alvo da PKC (*Protein Kinase C*). Portanto, agentes estimuladores da PKC são potenciais inibidores da KLHL3, diminuindo a degradação das WNKs (Figura 11).

Na continuação deste trabalho, Shibata et al (2014) demonstraram que a AngII é capaz de fosforilar KLHL3 na S433, via PKC, e levar ao aumento do conteúdo de WNK4 em células em culturas e em rim de ratos. Estes achados revelam mais um importante mecanismo pelo qual a atividade das WNKs é regulada. Corroborando com esses achados, Wang & Peng 2017, demonstraram num estudo de dinamismo molecular, que a fosforilação de KLHL3 na S433 impede a interação com a WNK4. Ishizawa e colaboradores (2016) demonstraram que a depleção de potássio estimula o NCC através da fosforilação e inativação da KLHL3.

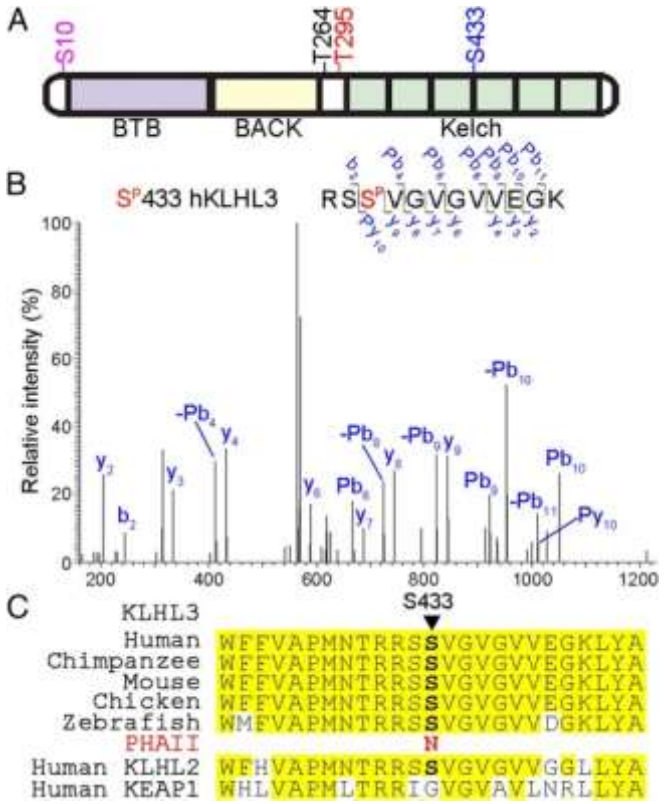

Figura 10 – Mapa de sítios de fosforilação da KLHL3. Em vermelho está destacada a mutação sofrida na S433 no PAHII (Shibata et al., 2014).

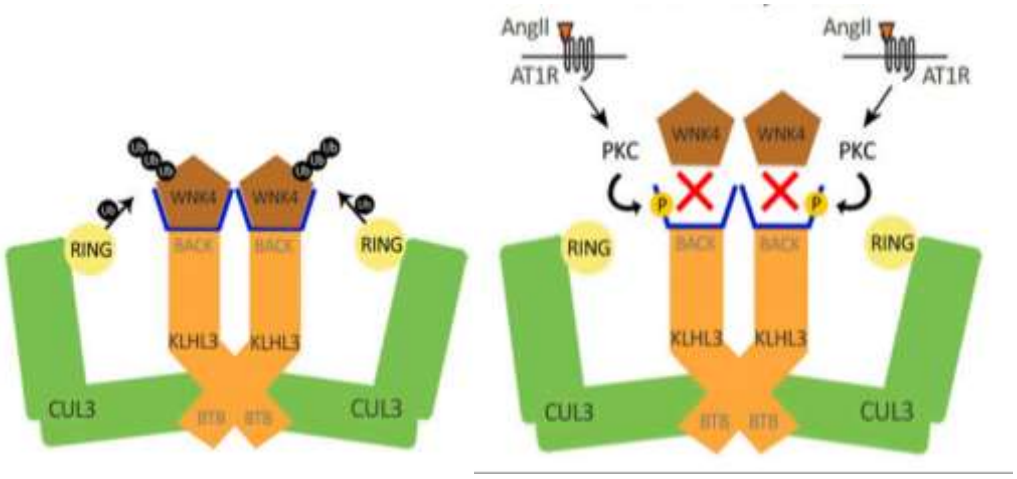

Figura 11 – Esquema proposto por Shibata et al. (2014) exemplificando a atuação do complexo ubiquitina-liga E3 sobre a WNK4 na situação basal (esquerda) e após a ativação do AT1R por AngII (direita).

Adicionalmente aos estudos do Dr. Shibata, Kasagi et al. (2017) demonstraram que ratos knockout para KLHL2, a qual compartilha alta similaridade com KLHL3, apresentavam uma maior concentração de WNK4 na medula renal, sugerindo que a KLHL2 também atue na degradação de WNK4.

Já foi demonstrado também que a insulina é capaz de modular a atividade de WNK4 através da via PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt (Chavez-Canales et al., 2013). Este efeito pode explicar o aumento da sensibilidade ao sal observado em pacientes que apresentam hiperinsulinemia, inclusive naqueles com síndrome metabólica (Uchida et al., 2014). Yoshizaki et al., 2015 demonstrou que as vias Akt e PKA modulam a atividade de WNK4 similarmente devido à capacidade dessas cinases fosforilarem KLHL3 na S433. Estes autores sugerem que a participação da via PKA pode explicar o mecanismo pelo qual o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina atue sobre a atividade de WNK4.

Buscando ainda esclarecer os mecanismos envolvidos no controle da sinalização WNK-SPAK/OSR1, Naguro et al., 2012 demonstraram que WNK1 é regulada negativamente por ASK3 (*apoptosis signal-regulating kinase 3*) membro da família ASK, proteínas que respondem a vários estímulos de estresse e ativam as vias JNK *(c-Jun N-terminal kinases)* e p38MAPK (*p38- Mitogen Activated Protein Kinases*). Além disso, eles demonstraram que camundongos knockout apresentavam hipertensão moderada quando submetidos à dieta com alta ingestão de sal.

Um pouco mais tarde, o mesmo grupo mostrou que o estresse osmótico induz a fosforilação da S575 (Serina 575) e este constitui um novo sítio de regulação da atividade de WNK4 (Figura 12). Este estímulo, ativa a cinase ASK3 e outras MAP3Ks e em ambas as situações, ocorre à ativação da via p38MAPK, culminando com a fosforilação de WNK4 na S575 (Maruyama et al., 2016). Embora não se saiba qual o efeito da fosforilação de WNK4 na S575, estes achados demonstram mais um

alvo de modulação da atividade das WNKs. Além disso, esse trabalho complementa o de Bazúa-Valenti et al. (2004) no qual foi demonstrado que os efeitos de WNK4 sobre o transportador NCC são dependentes da concentração de cloreto na célula, assim WNK4 funcionaria como um importante sensor de estresse osmótico, regulando a atividade do transporte de sódio, cloreto e também do potássio.

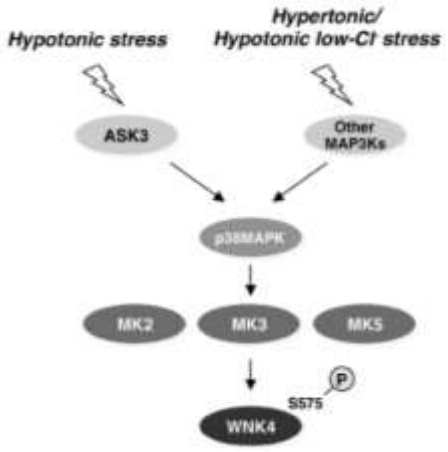

Figura 12 – Modelo esquemático da cascata de sinalização de fosforilação de WNK4 na S575 (Maruyama et al., 2016).

Outro mecanismo que parece estar envolvido com a sinalização das WNKs é a via calcineurina/NFAT (*Nuclear fator of ativated T cells*), essa evidência provém do fato de pacientes transplantados tratados com inibidores da Calcineurina (ICN), como a ciclosporina-A (CsA) ou Tacrolimus, desenvolverem um quadro clínico similar ao PHAII, também atenuado pelo uso de diuréticos tiazídicos. Este é um efeito colateral importante dos inibidores da calcineurina e apresenta relevância clínica bastante significativa uma vez que os ICN são amplamente utilizados na prevenção da rejeição dos órgãos transplantados (rim, fígado, coração e medula óssea) a despeito dos efeitos tóxicos importantes **(**Mihatsch et al., 1985). Adicionalmente, Shoda et al. (2017) observaram que os ICN bloqueiam a desfosforilação do NCC em resposta à alta ingestão de potássio. Ou seja, a hipercaliúria induzida pela alta ingesta de potássio é inibida por tacrolimus, sugerindo assim, que a calcineurina é ativada em situações agudas de alta ingesta de potássio, o que resulta na desfosforilação e inibição do NCC.

A CsA é um peptídeo cíclico com 11 aminoácidos, que se liga a ciclofilina D, que apresenta a capacidade de inibir a atividade da calcineurina (CN), uma fosfatase do tipo serina-treonina ativada por Ca-CMK (*Ca^{2+}-calmodulina cinase*). Quando ativada, CN interage com a porção N-terminal (regulatória) do NFAT e o desfosforila, possibilitando a translocação deste para o núcleo da célula. NFAT faz parte da família Rel, que apresenta alta capacidade de interagir com elementos regulatórios na cadeia do DNA e, por isso, NFAT modula a transcrição de diversos genes, incluindo genes de citocinas, fatores de crescimento celular, fatores de diferenciação muscular, dentre outros (Rao; Luo; Hogan, 1997).

Na literatura, existem evidências que os ICN modulam a expressão de WNK4. Melnicov e colaboradores (2011) observaram aumento no conteúdo das proteínas: WNK4, NCC total e fosforilado, bem como no mRNA-WNK4, em células mDCT incubadas com CsA por 16h. Além disso, observaram aumento de 4 vezes na quantidade da proteína WNK4 em rins de animais tratados com CsA por 14 dias. Similarmente, Hoorn e colaboradores (2011) demonstraram que ratos tratados com tacrolimus apresentaram redução drástica na quantidade do canal para Ca^{2+} TRPV5 (*Transient Receptor Potential Vanilloid)* em néfron distal e aumento da quantidade das proteínas WNK3, WNK4 e SPAK.

Como WNK4 é uma enzima chave na regulação de transporte de Na^{+}, Cl^{-} e K^{+} no néfron distal é possível que os efeitos colaterais renais dos inibidores da calcineurina estejam relacionados à hiperexpressão de WNK4.

Já foi descrita a ativação da via calcineurina/NFAT por AngII (Abraham et al., 2012) e sabe-se que AngII aumenta o conteúdo de mRNA- e pronteína-WNK4 contrariamente, CsA é um inibidor da via calcineurina/NFAT e desencadeia um quadro semelhante de aumento do conteúdo de mRNA- e pronteína-WNK4. Ademais, tanto AngII como CsA causam hipertensão, portanto, chama a atenção como esses dois agentes atuam contrariamente numa mesma via e culminam com um efeito semelhante no organismo e na célula.

Na Figura 13, foi proposto um esquema reunindo, de forma resumida, os mecanismos regulatórios do NCC na célula que foram abordados neste texto.

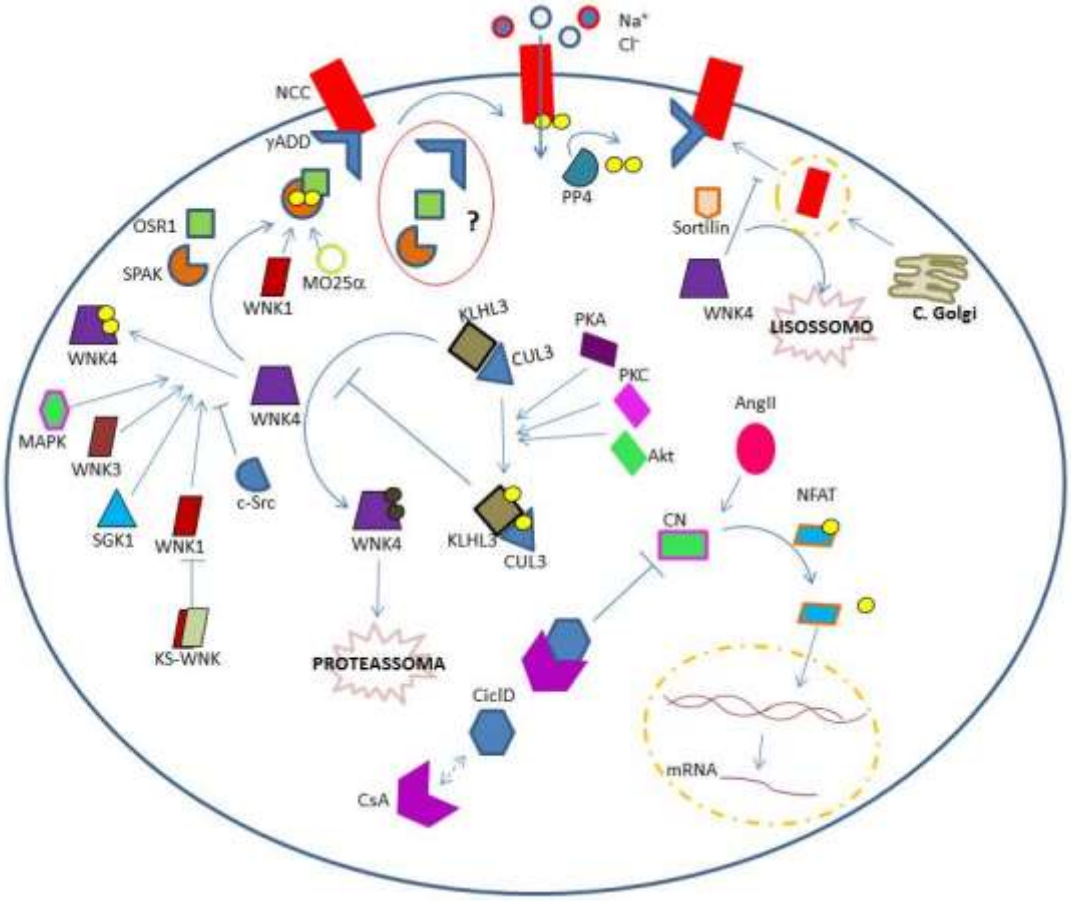

Figura 13 – Esquema resumindo as vias de sinalização envolvidas com as WNKs.
Onde: Na^+ – sódio, Cl^- – cloreto; PP4 – *protein phosphatase* 4, WNK – *with no lysine kinase*, AngII – angiotensina II, NFAT – *nuclear factor of activated T-cells*, CN – calcineurina, CiclD - ciclofilina D, CsA – ciclosporina, CUL3 – culina 3, KLHL3 – *Kelch like 3*, PKA – *protein kinase A*, PKC – *protein kinase C*, KS-WNK – *kidney specific* WNK, MO25α – *mouse protein* 25α, γ-ADD – γ-aducina, OSR1 – *oxidative stress responsive* 1, SPAK – *proline alanine-rich kinase*; SGK1 – *serum- and glucocorticoid-induced kinase 1*; MAPK – m*itogen activated protein kinases.*

.

2 OBJETIVOS

Elucidar como AngII e CsA modulam a expressão de WNK4 através em células de túbulo convoluto distal.

2.1 Objetivos específicos

Utilizando uma linhagem de células de cão nas quais observamos características de túbulo convoluto distal e de ducto coletor (MDCK – *Madin Darby Canine Kidney*), pretendemos:

- Avaliar a atividade da calcineurina em células MDCK tratadas com AngII 10^{-7} e 10^{-10}M e CsA 1µM por 4h. Para isso usaremos um kit para dosagem colorimétrica da atividade de calcineurina (*Enzo Life Sciences)*.
- Avaliar a atividade de fatores de transcrição NFATs em células MDCK por meio da transfecção das células com o vetor pGL4.30 [luc2/NAFAT-RE/Hygro], no qual o gene da luciferase está sob o controle de um promotor contendo vários elementos consensuais para a ligação de fatores de transcrição NFAT. A dosagem da luciferase será feita após os estímulos com AngII 10^{-7} e 10^{-10}M, bem como CsA 1µM.
- Avaliar se há aumento do conteúdo de WNK4 em células MDCK (através da técnica de *western-immunoblotting*) após o estímulo com Ang10^{-7} e 10^{-10}M, bem como com CsA 1µM.
- Avaliar se há aumento do conteúdo de mRNA de WNK4 em células MDCK (através da técnica de RT-PCR) após 24h de estímulo com Ang10^{-7} e 10^{-10}M, bem como com CsA 1µM.
- Identificar e isolar o promotor do gene de WNK4 de cães.
- Amplificar e sequenciar o promotor do gene de WNK4 de cães.
- Clonar o promotor de WNK4 de cães no vetor pGL4.10, com gene repórter *Firefly luciferase*.
- Avaliar o efeito da Ang II sobre a atividade do promotor do gene WNK4, clonado no vetor pGL4.10. O controle de transfecção será sempre feito por meio da cotransfecção com vetor pGL4.74, com o gene repórter *Renilla luciferase*.
- Avaliar o efeito da AngII sobre a atividade do promotor do gene WNK4 na presença de CsA, para esclarecer se o efeito da AngII sobre o promotor está relacionado com a calcineurina/NFAT e avaliar também o efeito isolado da CsA.
- Avaliar a resposta a Ang II e CsA do promotor mutado nos elementos NFATs. As mutações serão feitas com o kit *QuikChange*, a partir do construto inicial em pGL4.10-promotor WNK4 *wild type*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análise da modulação do conteúdo da proteína WNK4 através da técnica de *Western-immunoblotting*

Células MDCK cultivadas em meio DMEM *high glucose* em placa de 24 wells, foram incubadas com AngII 10^{-7} ou 10^{-10} M e CsA 1µM, para avaliação da expressão de WNK4. Após 6 e 10 horas, as células foram lisadas e misturadas ao tampão de lise (0,05% SDS, 2% glicerol, β-mercaptoetanol 2%, Tris-HCL 5mM). Essa mistura foi aquecida a 95°C durante 5 minutos e, em seguida, aplicada em gel de acrilamida (8%) e submetido a uma corrente elétrica, seguindo o método convencional de eletroforese de proteínas.

Após a corrida do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF por meio de eletrodufisão, através de um equipamento de transferência, a 400mA durante 3 horas. Para o estudo de imunoblotting, esta membrana foi hidratada em metanol e incubada durante 1 hora com solução de bloqueio composta por 5% de leite em pó de baixo teor de gordura e 0,1% de tween 20 diluídos em PBS (*phosphate saline buffer*) sob agitação leve. Após este período, essa membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído nas concentrações desejadas na mesma solução de bloqueio, durante um período de 16h ou *overnight*, a 4°C também sob agitação leve.

No dia seguinte, foi feita a devida incubação com anticorpo secundário (1h à temperatura ambiente) e a membrana foi então banhada com reagente ECL (*GE Healthcare*®) e o processamento da imagem era feito através do aparelho fotodocumentador (*Amersham Imager 600 GE Healthcare*®) com o tempo de exposição variável. Estas imagens foram processada através de desintometria das bandas usando o programa ImageJ. A tabela 01 relaciona os anticorpos que foram utilizados nesta etapa.

Tabela 01 – Descrição dos anticorpos utilizados no westernblotting.

Descrição	Fabricante	Concentração	Espécie Host
Primário Anti-WNK4	Cell Signaling	1:1000	Rabbit
Primário Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	1:10000	Goat
Secundário Anti-Rabbit		1:2000	Goat
Secundário Anti-Goat		1:2000	Mouse

4.2 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Para avaliar se AngII e CsA modificam os níveis de mRNA-WNK4, fizemos a quantificação relativa deste por meio de transcrição reversa do RNA (Reverse transcription – RT) e PCR cinética (RT-PCR em tempo real) com a

utilização do corante fluorescente *Syber Green (Thermo Scientific®)*. Antes de iniciar estes experimentos, foi feita a padronização das reações por meio de PCR convencional com iniciadores correspondentes ao cDNA de WNK4 e de GAPDH (como controle interno), ambos da espécie canina.

4.3 Extração de RNA

Células MDCK em cultura, com cerca de 80% de confluência, mantidas em meio DMEM high glicose enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF) foram submetidas ao protocolo de extração de RNA total. As células foram tripsinizadas e removidas da garrafa de cultura com o auxilio de uma pipeta e transferidas a um tubo esterilizado. Foram feitas centrifugações, por 5000g a 4°C, sempre descartando o sobrenadante e adicionando PBS. Ao final, o *pellet* celular foi ressuspenso com reagente Trizol, submetido ao vortex e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos, para a dissociação completa dos complexos proteicos.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo esterilizado e adicionado igual volume de isopropanol 100%. Em seguida, incubado novamente por 10 minutos e centrifugado a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet dissolvido em H_2O tratada com DEPC, após lavagem do mesmo com etanol 70%.

Após a visualização da viabilidade da extração de RNA por eletroforese em gel de agarose 1%, o RNA foi submetido ao processo de purificação e tratamento com DNase. Para tal, utilizamos um kit (*Quiagem® RNaesy Mini Kit – 250)* e seguimos as recomendações do fabricante. A amostra foi submetida novamente a eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da eficiência da purificação. Ao final, foi feita a quantificação através de espectrofotometria (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer – Thermo Scientific®)*.

4.4 Síntese de cDNA

Aproximadamente 5ug do RNA total extraído foram utilizados para a síntese de cDNA. A enzima que utilizamos foi Super Script IV (*Invitrogen*®) e as reações de amplificação foram feitas em Termociclador 96 wells (*Applied Biosystems*®).

4.5 Amplificação dos fragmentos

Foram testados 3 pares de primers (Tabela 02) para o gene de WNK4 e para o de GAPDH, bem como diferentes temperaturas de anelamento dos primeirs (Tm). Neste processo, o DNA é desnaturado (94-96°C), os primers são emparelhados com os alvos (60°C) e, posteriormente, a extensão das fitas de DNA é feita utilizando uma enzima DNA-polimerase termoestável (*Taq polymerase* –

Invitrogen®) e desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs) (72°C), ciclos repetidos de 20 a 35 vezes.

Após a reação de PCR as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida (devido os fragmentos serem de tamanho pequeno (~150bp) e este gel permite melhor resolução do tamanho da banda), foram corados com BrEt (Brometo de Etídio) e avaliados através de um transiluminador com luz ultravioleta.

Tabela 02 – Lista dos primers utilizados para a padronização do PCR.

Gene Alvo	Orientação	Sequencia de nucleotídeos 5'-3'	Produto (bp)
WNK4	Sense	CGGAAACTGTCTCGAACCGA	151
	Antisense	TCATGAGTTCGGTGACCAGC	
	Sense	GCGAGACTGATGGCTACCTC	175
	Antisense	CTGTCTCCCGGGGAAAAGTC	
	Sense	GCCAGACTAGCACCCATCTC	197
	Antisense	CTGGCCCAATTCCAGCACTA	
GAPDH	Sense	GGCAAATTCCACGGCACAGTC	152
	Antisense	GTGGTGAAGACCCCAGTGGACT	
	Sense	GCCTCCTGCACCACCAACTG	184
	Antisense	CATCTTCCCAGAGGGGCCGT	
	Sense	GACCAGGTGGTCTCCTGTGAC	172
	Antisense	CTTGGAGGCCATGTGGACCAT	

4.6 PCR em tempo Real (RT-PCR)

Células MDCK em meio DMEM high glucose 10% SBF em placas de 24 wells foram incubadas com AngII 10^{-7}, 10^{-10}M ou CsA 1µM durante 24h antes de serem submetidas à extração de RNA como descrito acima. As fitas únicas de cDNA foram sintetizadas a partir de 2µg do RNA extraído, utilizando primers randômicos (*Invitrogen*®) e a enzima *SuperScript IV* seguindo as recomendações do fabricante.

Para os experimentos de RT-PCR, a amplificação dos fragmentos foi feita no sistema de dectecção ABI Prism 7300 (*Applied Biosystems*®). Foram utilizados 2µl deste cDNA, primers gene específicos para WNK4 e GAPDH (Tabela 03), juntamente com os outros reagentes do kit *Syber-Green PCR Core Reagents* (*Applied Biosystems*®). As amostras foram submetidas, sempre em duplicatas, à ciclos de replicação seguindo a ordem de: 1) desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 2) 30 ciclos a 95°C por 15seg e 60°C por 1min. Ao final de cada experimento, era realizada uma curva de dissociação para verificar a especificidade da reação.

Os níveis de expressão relativa do gene foram calculados de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde ΔCt é a diferença entre o *threshold cycle* de WNK4 (Ct_{WNK4}) e

o *threshold cycle* do GAPDH (Ct_{GAPDH}) da amostra correspondente. A normalização era feita subtraindo o ΔCt de cada amostra pela média dos ΔCt dos controles, esse valor é o ΔΔCt.

Tabela 03 – Primers específicos utilizados no RT-PCR.

Gene Alvo	Orientação	Sequencia de nucleotídeos 5'-3'	Produto (bp)
WNK4	Sense	CGGAAACTGTCTCGAACCGA	151
	Antisense	TCATGAGTTCGGTGACCAGC	
GAPDH	Sense	GGCAAATTCCACGGCACAGTC	152
	Antisense	GTGGTGAAGACCCCAGTGGACT	

4.7 Análise da atividade da calcineurina intracelular (PP2B)

Células MDCK cultivadas em meio DMEM *high glucose* em placa de 24 wells, foram incubadas com AngII 10^{-7} e 10^{-10} M e CsA 1µM, para avaliação da atividade da PP2B intracelular com o auxílio do kit *Calcineurin Cellular Acticity Assay Kit* (BML-AK816-0001 – *Enzo Life Sciences®)*. Após 4h de incubação, as células foram lisadas com tampão para lise celular fornecido pelo kit adicionado de inibidor de proteases (100 µL/well). Após a completa lise mecânica com o auxilio da pipeta, a amostras foram centrifugadas a 14000 rpm sob refrigeração (4ºC) durante 10 min. Esta etapa é necessária para remoção dos extratos nucleares (rico em calcineurina nuclear) e debris celulares. O sobrenadante foi coletado para quantificação da concentração de proteínas pelo método convencional de Lowry. Devido à cultura celular em placas ser bastante homogênea, as amostras estavam com concentrações proteicas semelhantes e dentro da faixa requerida para análise (~5 µg/µL), assim não foi necessário nenhum ajuste de concentração.

Após teste inicial com o reagente BIOMOL GREEN – o qual reage com o fosfato livre e torna a solução com cor verde diretamente proporcional à concentração de fosfato – constatou-se que não havia necessidade de submeter as amostras à remoção de fosfato livre por meio de coluna de resina de dessalinização. Esta etapa é sugerida pelo kit quando as amostras apresentam alta concentração de fosfato livre, o que pode diminuir a acuidade do teste. Sendo assim, iniciou-se o ensaio de acordo com as instruções do kit: descongelar os componentes do kit; diluir a calmodulina; reconstituir o substrato; preparar a curva padrão e pipetar na placa; preparar solução visando medir a atividade total menos a atividade da PP1 e PP2A (portanto, medição da atividade da PP2B) e aplicar na placa; adicionar o substrato aos poços e aguardar 10 min; adicionar as amostras e aguardar 30 min (sob agitação leve); adicionar o BIOMOL GREEN *reagent* (parar reação e colore fosfato gerado) em todos os poços e aguardar 30 min (sob agitação leve) e fazer a leitura da placa em 620 nm.

4.8 Caracterização do promotor do gene de WNK4 de cães por PCR convencional

Nos bancos de dados, a sequência do gene de WNK4 de cão ainda não está devidamente mapeada, por isso primeiramente foi necessário fazer o mapeamento e a caracterização correta desta.

O promotor do gene de WNK4 foi amplificado através do PCR convencional utilizando o DNA genômico como template, tendo como base a sequência obtida no BLAT (UCSC *Genomic Bioinformatocs* - https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html). Abaixo segue a sequência usada como guia para a reação de PCR convencional do promotor do gene de WNK4. Em verde minúsculo está representada a região a montante do primeiro exon, que deve conter o promotor do gene. Em azul maiúsculo estão os exons presentes na sequência de mRNA, em preto minúsculo são os íntrons e em colorido os primers desenhados.

Com base na sequência obtida no BLAT, plataforma na qual podemos definir quantos pares de bases desejamos da sequência 5´flanqueadora e todos os exons e íntrons, fizemos uma cuidadosa verificação de todas as junções exon-intron/intron-exon, com finalidade de confirmar que todas as junções exon-exon estavam na sequência de mRNA obtida no NCBI. A partir desta análise, desenhamos os primers para a amplificação da região 5´flanqueadora e de parte dos primeiros exons.

```
(...)attaagacattcgaatgcttggcctcaagttcacaaaatagaaagggcattctgc
agagaaaagatgaagacaggtggaatgacttgatgaacggaaacatttgaagagttagct
agagggatatgacagggagtccataaaagacagtgctgggctgcactgagagtccagcag
tgaggttagggaatctggggctcagccagcatgatccatgcattttattatttattttta
tttttattttttgatccatgcatttttttttccagtaatacaactgggcccaggagtt
ggggggagagaacagaggcaggggcagggagcaactaccctggtttgggaagtgaccag
caggtagacaagcaaggggacagaactgggtagtctaggctgggtaaggagtcaataag
accaaaatgggtctggagacttgtgatgtgggaagtgaggacatgagagatggatggctg
tagtcagaggaagcaactctgaatcatagaagctgaagtttttccagcgctgaaagctac
aagcgtgctcccatgggtactgcaggagaacagggaatggtgaggtcgaaagacttagca
attgagaagactggggaatgatgaggtgtttgttaaatgcaactgacaacgaacgttagt
attaaaaagctgagcagagtggaaacaagcctcagcagttctgccaaagtgtgccgcttt
ggggaagtcactgcccttctctagagctgcacgagaagacttttcggggttctacacggt
aaggatttttaggataatggcaaacgactggcagaccagcaagatccctcacgtcgttgg
gcctcccctctccgaggaggcatccggaacctttctgctgtgctttttgcccggacgtgc

1 AGAAGCGGAGGCCGGAAGTCCTTTGCCCGGAGGTTCCGAGTTTCCTGGGCTACTACAATG
61 GCGATGAGTTTCGAGTGGCCGTGGCAGTATCGCTTCCCGCCCTTCTTTAC
   gtgaggctcagaccccgagaagccc..........gcgccccaccccttcacccggcag
111 GTTGCAGCCGAACGTGGACACCCGGCAGAAGCAGCTGGCCGCCTGGTGCTCGCTGGTCCT
```

```
171 GTCCTTCTGCCGCCTGCACAAACAGTCCAGCATGACGGTGATGGAAGCTCAGGAGAGCCC
231 GCTCTTCAACAACGTGAAGCTACAGCGTA
    tcctccctcaggctcttccacagcc..........tgcccttcccttaactttaaaccag
260 GGAAGCTCCCTGTGGAATCAATCCAGGTTGTATTAGAGGAACTGAGGAAGAAAG
    tgggttcaggtcctcagatttcct..........ttcttagcataagatgttttca(…)
```

Figura 14 – Sequência de nucleotídeos dos primeiros exons, 5'UTR, promotor e região *upstream* ao promotor do gene de WNK4 disponível nos bancos de dados (NCBI).

Tabela 04 – Primers utilizados no PCR do promotor de WNK4.

Alvo	Orientação	Sequencia de nucleotídeos 5'-3'
Promotor do gene de WNK4	Antisense	ACAGGTGGAATGACTTGATG
	Antisense	AGAGGGATATGACAGGGAGT
	Sense	TGACTCCTTACCCAGCCTAG
	Sense	GGCCACTCGAAACTCATC
	Sense	GCTGGACTGTTTGTGCAG
	Sense	ATTGATTCCACAGGGAGCT
	Sense	ACAGGTGGAATGACTTGATG

4.9 Extração do DNA Genômico

Células MDCK em cultura foram lisadas usando uma solução contendo 27% sacarose, 1 X SSC, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS e 200 mg/mL Proteinase K. Após a lise, a solução resultante foi tratada com RNAse A a 37° por 30 minutos e seguida com extração do DNA genômico utilizando fenol/clorofórmio.

4.10 PCR do DNA Genômico

A reação de PCR foi realizada como descrito acima, os primers identificados na sequência foram utilizados em diferentes combinações, o Tm utilizado foi de 60° e a template foi o DNA genômico. O produto deste PCR foi submetido à eletroforese com gel de agarose 1% para identificação das bandas.

4.11 Transformação de bactérias competentes

Bactérias *E.coli* TOP10 competentes foram transformadas por *heat-shock* e submetidas ao ensaio de β-galactosidase para seleção de colônias brancas (quando apresentavam o gene da β-lactamase), as quais após 24h foram semeadas em meio LB (*Luria Bertani*) líquido por 18h contendo antibiótico. Os clones foram extraídos através de um kit (*QIAprep Miniprep – Quiagen*®).

4.12 Digestão de DNA com enzimas de restrição

Em alguns experimentos foi necessária a digestão de moléculas de DNA com enzimas de restrição. Estes experimentos foram necessários para identificação das cadeias de DNA, para linearização dos vetores ou para a geração de extremidades compatíveis entre vetor e DNA a ser inserido. As reações foram feitas de acordo com as especificações do fabricando, geralmente com até 16h de incubação a 37°C, variando o tampão da reação de acordo com a(s) enzima(s) utilizada(s). Vale ressaltar que no caso de reações utilizando concomitantemente duas enzimas de restrição, foi utilizado o tampão universal Tango Buffer® e foi respeitada a proporção das enzimas, bem como as estratégias de incubação fornecidas pela plataforma online "*DoubleDigest Calculator*" (*ThermoFischer Scientific*®).

4.13 Transfecção em células MDCK

Para definir o melhor protocolo de transfecção das células MDCK, foram feitos testes com células em diferentes confluências, com diferentes concentrações de Lipofectamina (LIPO) 2000 e 3000 (*Invitrogen*®), com diferentes concentrações de DNA plasmidial a ser transfectado, com restrição ou privação de soro; bem como com a troca ou não do meio de transfecção após 5 ou 24 horas. O vetor de GFP (*green flourescence protein)* foi utilizado e a taxa de transfecção foi observada em microscópio de fluorescência (*Laica – DM IRB*®) em aumento de 300x.

4.14 Avaliação do efeito de Angiotensina e Ciclosporina sob a atividade NFAT

Para a avaliação da atividade da via NFAT, as células foram transfectadas em meio DMEM *high glucose* com 5% de SBF contendo 0,4% LIPO 2000 e o 500ng do vetor pGL4.30 [luc2P/NFAT-RE/Hygro] (*Promega*®), o qual contém o gene da luciferase sob o controle de um promotor que apresenta elementos de ligação para NFAT. O controle interno foi feito com a cotransfecção do vetor pRL-CMV (*Promega*®), o qual contém o gene da *Renilla* luciferase sob controle de um promotor bastante ativo CMV (Cytomegalovirus).

Após 24h de transfecção, as células foram incubadas com DMEM *high glucose* com 10% de SBF contendo 1µM de Ionomicina e 100nM de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), a qual chamamos de "solução de indução". Juntamente à solução de indução, as células foram tratadas com AngII 10^{-7}, 10^{-10}M ou CsA 1µM. A leitura foi feita após 17h da indução, utilizando o kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (*Promega*®) seguindo as recomendações do fabricante.

Para os vetores pGL4.10 e pGL4.74, as células foram cotransfectadas em meio DMEM *high glucose* com 5% de SBF, numa solução contendo 0,4% LIPO2000, 500ng pGL4.10 e 12,5ng pGL4.74. Após 24h de transfecção, as células foram incubadas com AngII 10^{-7}, 10^{-10}M ou CsA 1µM por 24h. Após este período, as células foram submetidas ao ensaio de luciferase.

4.15 Obtenção dos constructos mutados

O constructo obtido a partir da inserção do promotor de WNK4 no vetor pGL4.10 foi submetido à mutações com o auxílio do kit *QuickChange II XL Site Direct Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies®). A inserção da mutação foi feita seguindo as instruções do kit, no qual se baseia na amplificação de 10ng do DNA plasmidial oriundo de bactérias *E.coli dam+* (apresentam DNA metilado) em uma reação contendo 125ng de primers que apresentam a orientação das mutações pontuais.

O DNA plasmidial é então amplificado utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (*PfuUltra*) e após a reação de amplificação, a amostra é submetida à digestão pela endonuclease *Dpn I*, a qual tem como alvo a sequência *5'-Gm^{6}ATC-3'* presente no DNA metilado da *E.coli*. Esta etapa digere o DNA plasmidial template, o qual não apresenta mutação. A transformação é feita em bactérias XL10-Gold ultracompetentes em meio NZY+, as quais apresentam alta eficiência de transformação. Os clones são amplificados e extraídos através de *Maxiprep* como já descrito. A confirmação da mutação é feita através de sequenciamento do DNA.

4.16 Sequenciamento do DNA

As amostras foram sequenciadas no serviço de sequenciamento de DNA do Instituto de Química (IQ)-USP.

4.17 Ensaio da atividade da luciferase

Para o ensaio da atividade da luciferase, foi utilizado o kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (*Promega*®) seguindo as recomendações do fabricante. Este método se baseia na emissão de luz emitida da reação de hidrólise da luciferina (presente no reagente do kit – *LARII*®) catalisada pela luciferase (enzima expressa em células transfectadas com o vetor que apresenta o gene repórter Firefly luciferase), assim como pela hidrólise da coelenterazina (também presente no reagente do kit – *Stop&Glo*®) catalisada pela enzima Renilla luciferase (enzima expressa em células transfectadas com o vetor que apresenta o gene repórter Renilla luciferase) – Figura 15.

As células foram lisadas num tampão específico fornecido pelo kit, em seguida, as amostras eram distribuídas em triplicata numa placa branca não translúcida e a leitura era feita no leitor de quimioluminescência *Clarity* (BIO-TECK®). Os resultados são expressos em Unidades Relativas de Luz (RLU – *Relative Luciferase Units)* onde a leitura é dada pela divisão entre a emissão da *Firefly luciferase* pela emissão da *Renilla luciferase* da mesma amostra.

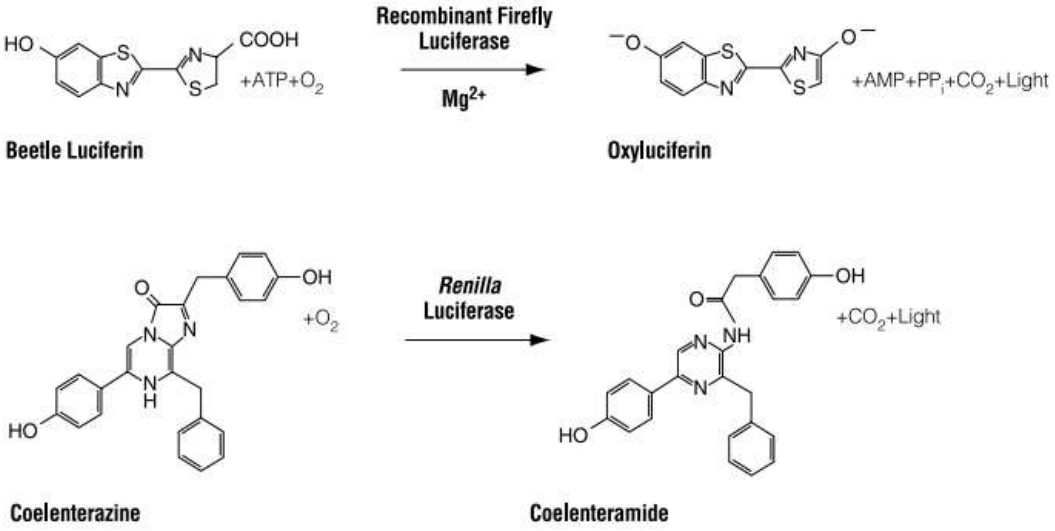

Figura 15 – Reações de bioluminescência catalisadas pela *Firefly* e *Renilla* luciferases (*Datasheet Dual-Luciferase® Reporter Assay System - Promega®*).

4.18 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o software *Graph Pad Prism Inc.,* (*San Diego, Ca, USA*). Os dados foram apresentados como média e erro padrão e a análise estatística foi feita utilizando o teste *one-way* ANOVA, seguido por teste de Bonferroni. Quando apropriado, foi utilizado o teste “t” de *Student*. A diferença entre os grupos foi considerada quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da expressão de proteínas de interesse nas células MDCK

As células MDCK pertecem a uma linhagem celular de néfron distal de cão (Dukes; Whitley; Chalmers, 2011). A figura 16 mostra que elas expressam proteínas presentes em tubulo distal (NCC) e em ducto coletor (ENaC e AQP2), demonstrando a heterogeneidade da linhagem. Além disso, expressam WNK4, proteína alvo deste trabalho.

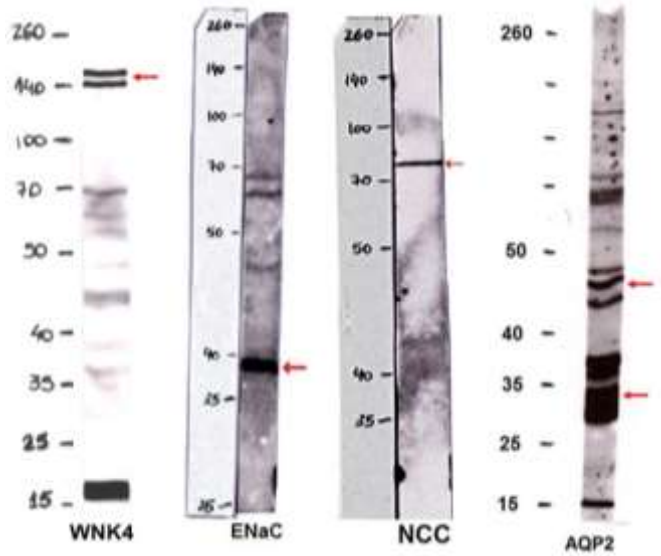

Figura 16 – Westernblotting para as principais proteínas envolvidas no estudo e para caracterização das células MDCK.

5.2 Análise do conteúdo da proteína WNK4 por westernblotting

Como podemos observar na figura 17, CsA é capaz de aumentar o conteúdo de WNK4 em períodos de tempo mais agudos, no caso após 6 horas de incubação. A literatura mostra que AngII é capaz de aumentar o conteúdo da proteína WNK4, entretanto, esse resultado foi bastante difícil de ser reproduzido (Figura 18).

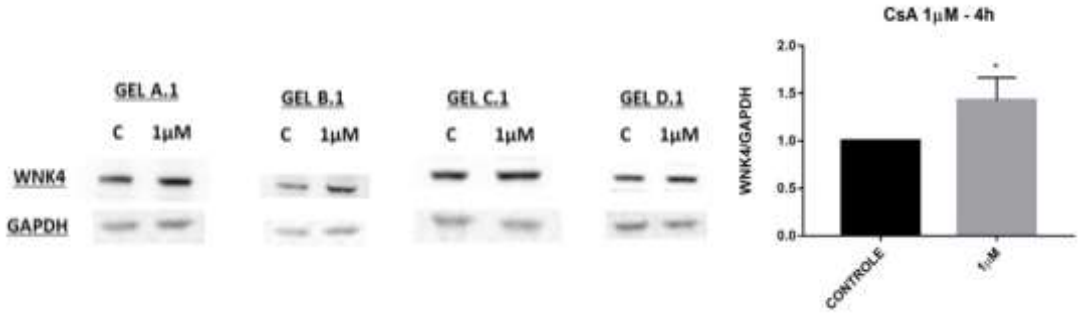

Figura 17 – CsA 1µM aumenta significativamente o conteúdo de WNK4 após 6h de incubação. n=4, Teste “t” de Student. *p<0,05.

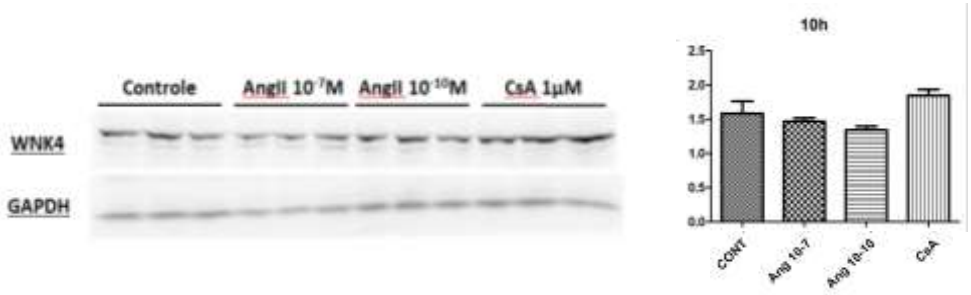

Figura 18 – Após 10h de incubação, AngII parece diminuir o conteúdo de WNK4, enquanto CsA 1µM parece aumentar. Esses valores não foram estatisticamente significantes. n=3.

5.3 Padronização das reações de PCR convencional

As figuras 19 e 20 mostram os produtos de PCR de WNK4 e GAPDH de cão, respectivamente, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida. A presença de banda única, no tamanho esperado permitiu a escolha dos pares de primers (sense e antisense) dos genes de WNK4 e GAPDH a serem utilizados nos experimentos de RT-PCR.

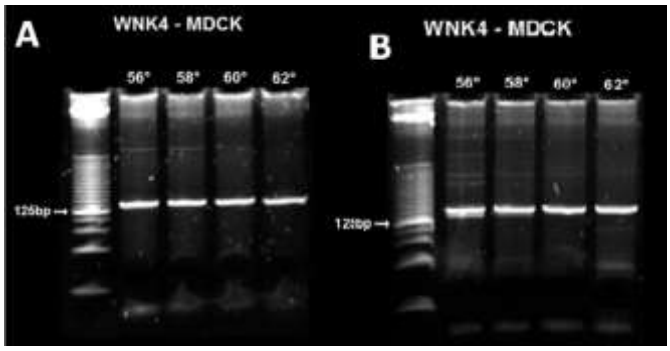

Figura 19 – PCR para cDNA-WNK4 em células MDCK com duas combinações de primers. Os números acima indicam as diferentes temperaturas de anelamento dos primers. Os tamanhos dos fragmentos esperados eram de 151 (A) de 175bp (B). Note a amplificação de bandas únicas e de tamanhos esperados.

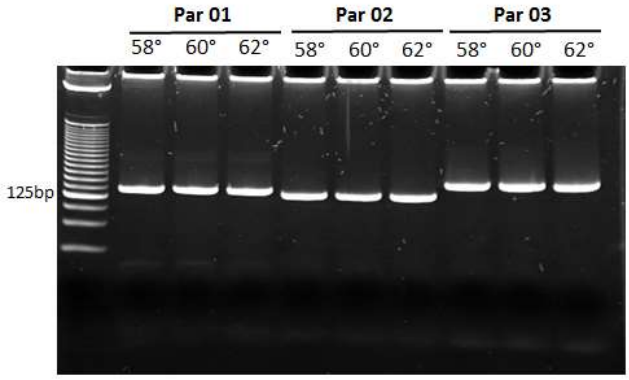

Figura 20 – PCR para cDNA-GAPDH em células MDCK. Os números acima indicam a temperatura de anelamento dos primers. O tamanho dos fragmentos esperado era de 150bp para o Par 01, 136bp para o Par 02 e 168 para o Par 03. Note a amplificação de bandas únicas e de tamanhos esperados.

5.4 Efeito da AngII e CsA sobre a quantidade de mRNA de WNK4

A quantificação relativa do mRNA-WNK4 foi feita através da técnica de RT-PCR após 24h de incubação com AngII 10^{-7}M, 10^{-10}M e CsA 1μM. A figura 21 mostra a curva de dissociação das reações, demonstrando a especificidade dos fragmentos amplificados. Como pode ser visto no gráfico da figura 22, tanto AngII como CsA são capazes de aumentar a quantidade de mRNA-WNK4, vale ressaltar que CsA, mesmo na presença de AngII, foi capaz de aumentar 150% o conteúdo de mRNA em relação ao controle (médias: Controle 1,0000 e CsA 2,4622).

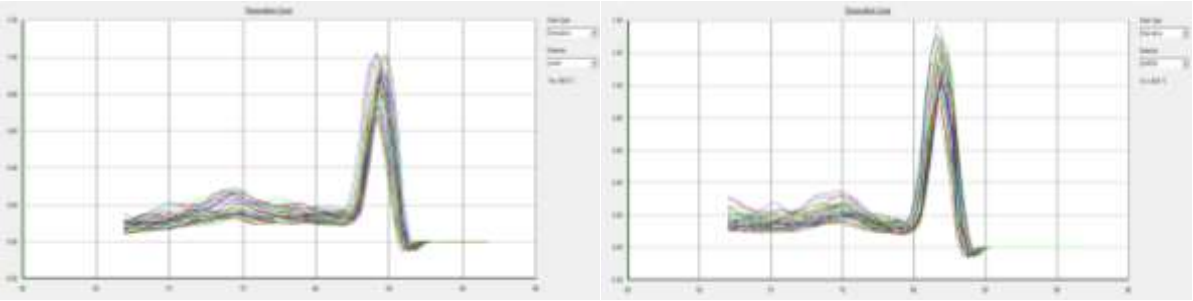

Figura 21 – Curvas de dissociação realizadas ao final das reações de RT-PCR de WNK4 (esquerda) e GAPDH (direita). As curvas apresentam picos únicos e homogêneos, demonstrando a especificidade dos fragmentos amplificados.

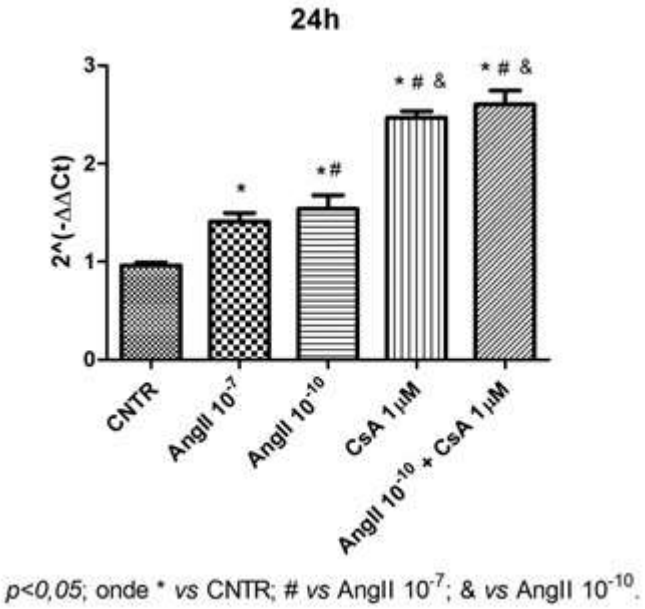

Figura 22 – Efeito da AngII e CsA sobre a quantidade de mRNA de WNK4 após 24h de incubação. AngII em ambas as concentrações de 10^{-7}M e 10^{-10}M, aumenta significativamente o conteúdo de mRNA-WNK4 na célula. Similarmente, CsA 1μM também aumenta significativamente o mRNA-WNK4, porém em maior magnitude, mesmo na presença de AngII. (ANOVA seguido por Bonferroni)

5.5 Obtenção do constructo contendo a sequência do promotor do gene de WNK4

Após a extração do DNA genômico, este foi utilizado como template para a reação de PCR utilizando primers do promotor foram utilizados em diferentes combinações e o Tm utilizado foi de 60°. O produto deste PCR foi submetido à eletroforese com gel de agarose 1% para identificação das bandas (Figura 23).

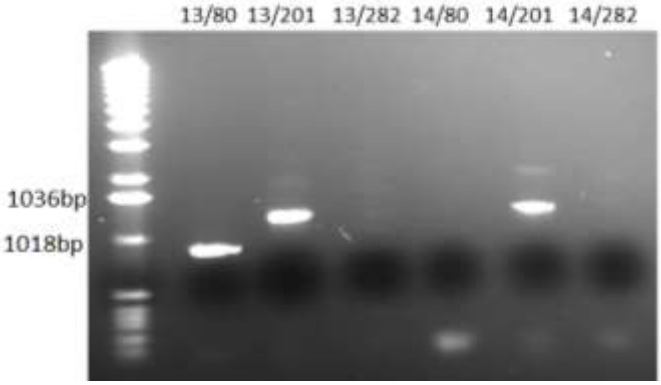

Figura 23 – Reação de PCR do promotor do gene de WNK4. A combinação de primers 13/80, mostra uma única banda no tamanho esperado (~842pb).

A banda de interesse oriunda da combinação 13/80 foi removida e purificada do gel com o auxílio de um kit (*Gel extraction kit - Quiagen®)*. Esse fragmento foi quantificado utilizando o *Nanodrop®* e submetido à digestão com enzima de restrição (a 37° *overnight*) para confirmar a especificidade da sequência. O mapa de restrição da sequencia foi desenhado com o auxílio da plataforma online *NEBCutter*. A figura 24 mostra a lista de enzimas *Single Cutters*, ou seja, aquelas que apresentam um único sítio de restrição na sequência (gerando apenas dois fragmentos). De acordo com essa lista, foi selecionada a enzima NcoI que gera dois produtos de tamanhos parecidos (431 e 425bp), portanto, é provável o aparecimento de apenas uma única banda como resultado da digestão na altura de ~430bp.

Figura 24 – Mapa de restrição da sequência amplificada por PCR. Em destaque a enzima NcoI que foi utilizada para digestão do fragmento na tentativa de confirmar a especificidade da sequência.

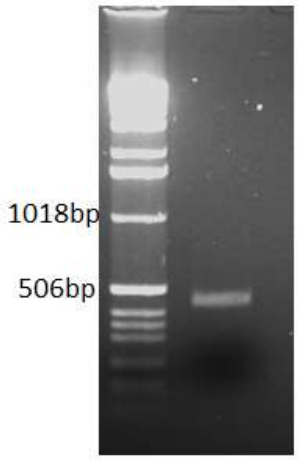

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose da reação de digestão com enzima NcoI do fragmento amplificado por PCR. Note a presença de uma única banda de aproximadamente 430bp, confirmando a especificidade da sequência.

O próximo passo foi a ligação deste fragmento no vetor *pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®),* já que os primers utilizados nesta reação não foram adaptados com sequências de restrição. Bactérias *E.coli* TOP10 competentes foram transformadas por *heat-shock* e inoculadas em meio de cultura sólido (*Luria Bertani e agar agar*) contendo 50µg/ml de ampicilina. Após 24h, as colônias brancas foram selecionadas e semeadas em meio LB líquido contendo 50mg/ml de ampicilina durante 18h. Os clones foram extraídos através de um kit (*QIAprep Miniprep – Quiagen®*) e submetidos à digestão com enzima de restrição.

Este vetor apresenta as extremidades cegas, por isso foi necessário certificar quais vetores haviam recebido o inserto na orientação correta, para tal, foi procedido o PCR das colônias selecionadas usando um primer sense do vetor e um primer antisense do fragmento. O produto deste PCR deve ter aproximadamente 350bp, caso tenha sido inserido na posição contrária ele terá aproximadamente 620bp (Figura 26).

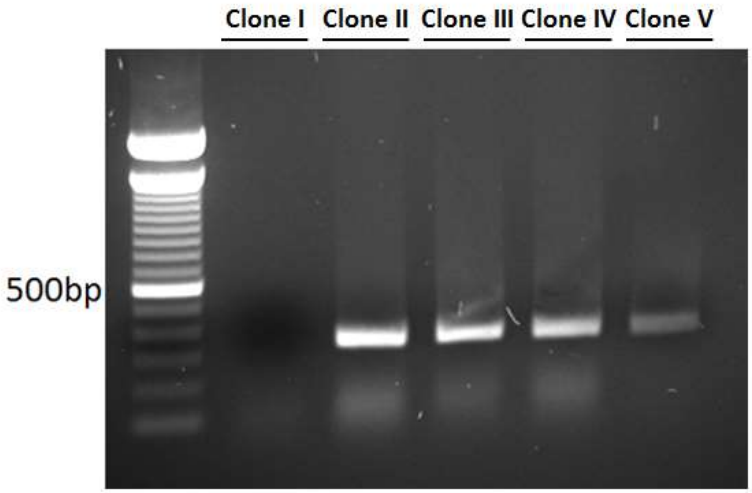

Figura 26 – PCR de triagem de cinco colônias brancas selecionadas após a transformação usando vetor pJET1.2/blunt. Note a presença de uma banda de aproximadamente 350bp em 4 das 5 colônias, confirmando a especificidade da sequência.

Nesse momento é importante explicar como foi feita a digestão dos vetores. A ideia final era clonar o promotor que foi amplificado por PCR e clonado inicialmente no vetor pJET1.2 no vetor pGL4.10 (*Promega®)*, no qual não há promotor para a transcrição do gene da luciferase, dessa forma, podemos inserir a sequência a ser estudada e medir sua atividade como promotor do gene da luciferase, que é o gene repórter. Portanto, é extremamente importante que a sequência seja inserida corretamente no vetor, e para isso, usamos a digestão com duas enzimas de restrição para gerar extremidades coesivas diferentes para que a inserção ocorra de forma orientada.

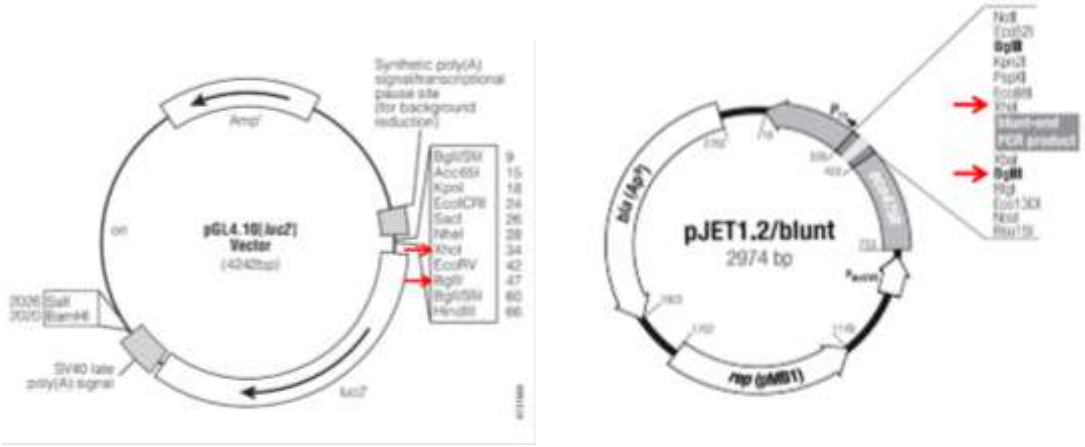

Figura 27 – Backbone dos vetores pGL4.10 e pJET1.2/*blunt*. Em destaque os sítios de restrição de interesse.

Ao comparar a sequência do vetor pGL4.10 com o vetor pJET1.2, verificamos que eles apresentam os sítios de reconhecimento para as enzimas XhoI a montante e BglII a jusante, por isso, essas enzimas foram utilizadas para a geração de extremidades no vetor pGL4.10. Dessa forma, após PCR dos minipreps dos clones III e IV, usando primers do fragmento – par 13/80 – e confirmando a especificidade da sequência (figura 29),foi feita a digestão de ambos os clones e do vetor pGL4.10 com a enzima XhoI (a 37° *overnight*). O resultado é a linearização de ambos, como mostra a figura 30.

Essas reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% (Figura 28), as bandas correspondentes aos vetores foram extraídas e purificadas do gel usando um kit (*Gel extraction kit - Quiagen®*).

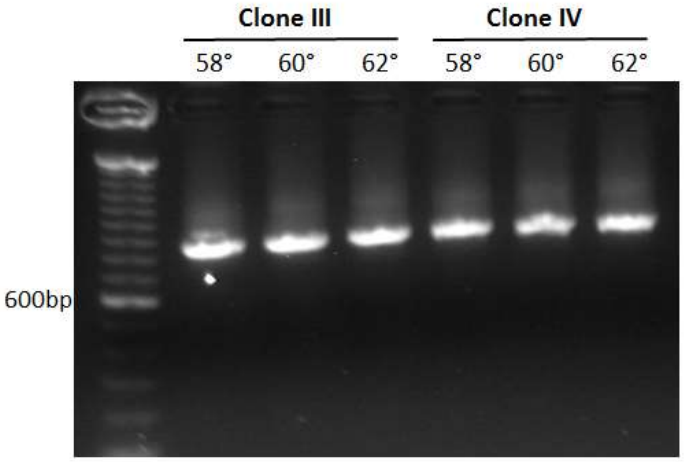

Figura 28 – PCR de triagem do vetores pJET1.2 clonados com o promotor do gene de WNK, para confirmação da especificidade da sequência. A temperatura de anelamento dos primers está descrita acima. Note a presença de banda única e no tamanho esperado (~890bp) em todas as reações.

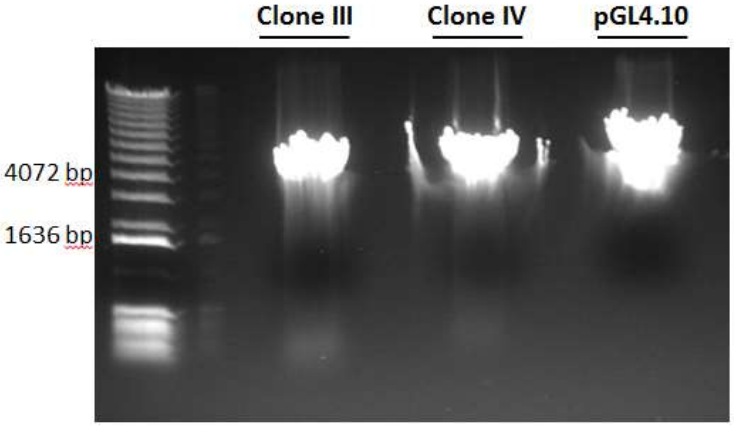

Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose 0,5% da reação de digestão com enzima XhoI dos Clones III e IV, bem como do vetor pGL4.10. Note a presença de uma única banda no tamanho esperado, confirmando a linearização dos vetores.

O próximo passo é remover o fragmento contendo o promotor do gene de WNK4 de aproximadamente 890bp do vetor pJET, bem como tornar as extremidades do vetor pGL4.10 compatíveis com o fragmento a ser inserido. Para tal, as bandas foram extraídas do gel e foi feita a segunda digestão dos vetores utilizando a enzima BglII (a 37° *overnight*). O resultado esperado é a separação do fragmento do promotor do gene de WNK4 dos clones III e IV e a geração de extremidades compatíveis com as extremidades do pGL4.10. Essas reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% (Figura 30) e os fragmentos de ~890bp e o vetor pGL4.10 (linearizado) foram novamente extraídos e purificados do gel com o auxílio do kit (*Gel extraction kit - Quiagen*®).

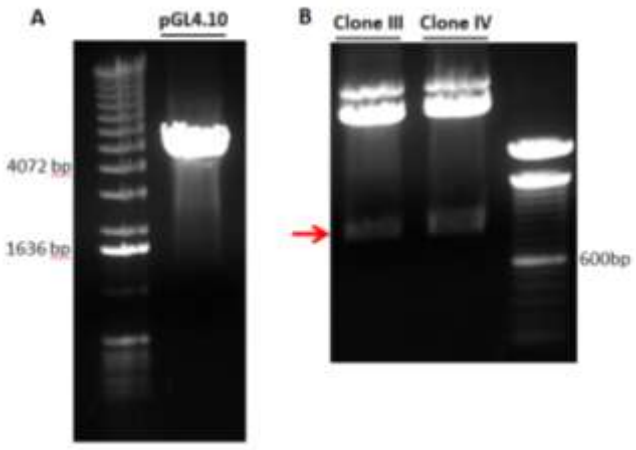

Figura 30 – Eletroforese em gel de agarose 0,5% da reação de digestão com enzima BglII do vetor pGL4.10 (A) e dos Clones III e I (B). Note a presença de uma única banda no tamanho esperado, confirmando a linearização do vetor pGL4.10 e em destaque a seta indica a separação do fragmento do promotor de WNK4 de ~890bp após a digestão dos Clones III e IV.

Após a extração do gel, o vetor pGL4.10 e os fragmentos do promotor do gene de WNK4 apresentam extremidades coesivas para que a ligação ocorra de maneira orientada. A ligação foi feita utilizando a enzima *T4 DNA ligase*, numa reação *overnight* a 4°C. A fórmula abaixo indica a proporção de vetor e fragmento a ser calculada na reação. Para estes experimentos, foi utilizada a proporção padrão de 3:1 e a de 10:1 a fim de garantir a ligação.

P/ 50ng do vetor, temos:

$$\text{X ng do inserto} = \frac{\text{50ng (vetor) x tamanho do inserto (bp) x 3 (proporção 3:1)}}{\text{tamanho do vetor (bp)}}$$

$$\text{X ng do inserto} = \frac{\text{50ng (vetor) x tamanho do inserto (bp) x 3 (proporção 10:1)}}{\text{tamanho do vetor (bp)}}$$

Figura 31 – Cálculo das quantidades dos fragmentos em ng de DNA a serem utilizados na reação de ligação.

No dia seguinte, as reações de ligação foram utilizadas na transformação de bactérias TOP10 competentes, como já descrito anteriormente, na expectativa de formarem clones após a seleção em meio de cultura contendo ampicilina.

Após 18h, observou-se a presença de duas colônias brancas, uma em cada placa oriunda da transformação dos clones III, denominados REC A e B (Recombinante A e B). Para triagem dessas colônias, foi realizada uma a reação de PCR utilizando primers do promotor (fragmento que foi inserido) – Figura 32.

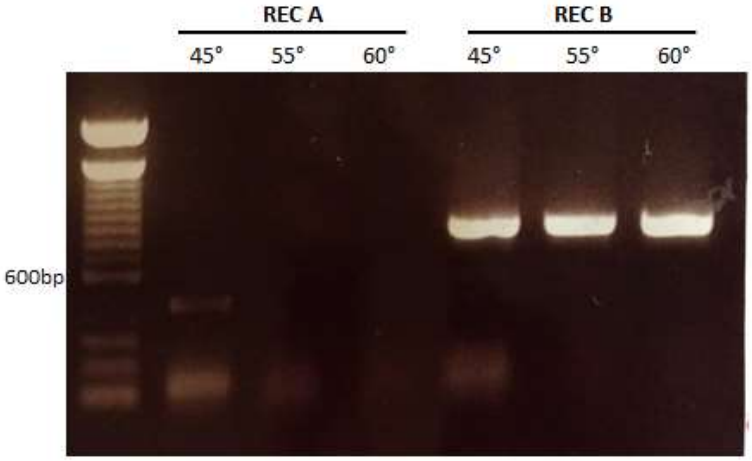

Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR para triagem das colônias. Note a presença de uma banda no tamanho esperado (~890bp) na reação referente ao REC B nas três temperaturas testadas, demonstrando a presença do fragmento do promotor nas bactérias desta colônia.

A colônia REC B foi semeadas em meio LB líquido contendo 50µM de ampicilina e mantida a 37°C *overnight*, sob agitação de 225 rpm. No dia seguinte, esse meio foi submetido ao protocolo de miniprep seguindo as instruções do kit como já descrito anteriormente. As amostras obtidas foram quantificadas utilizando o equipamento *Sinergy HI® Bioteck*.

Para prosseguir os experimentos, é necessário confirmar a perfeita inserção e orientação do fragmento no o vetor pGL4.10, caracterizando assim que o vetor é recombinante com fragmento do promotor do gene de WNK4, para tal, foi realizada a digestão utilizando as enzimas KpnI e HindIII, onde o resultado deve ser a remoção do fragmento clonado no vetor (Figura 33); bem como o PCR com primer sense que se anela no vetor a montante do sítio de inserção do fragmento, denominado de primer RV3 (*Reporter vector primer 3)* – 5'CTAGCAAAATAGGCTGTCCC3' – Figura 34.

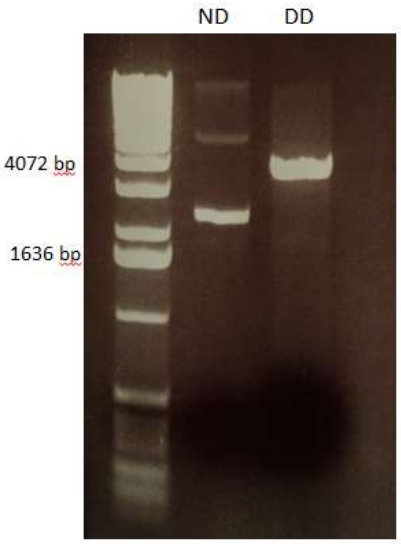

Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de digestão utilizando as enzimas KpnI e HindIII. Note a presença de duas bandas na reação ND (vetor Não Digerido), compatível com o padrão "*supercolied*", bem como a presença de banda única na reação DD (*Double-Digest* – vetor digerido com KpnI e HindIII) de aproximadamente 4000bp. Este resultado sugere apenas a linearização do vetor sem a remoção do fragmento de ~900bp correspondente ao fragmento do promotor.

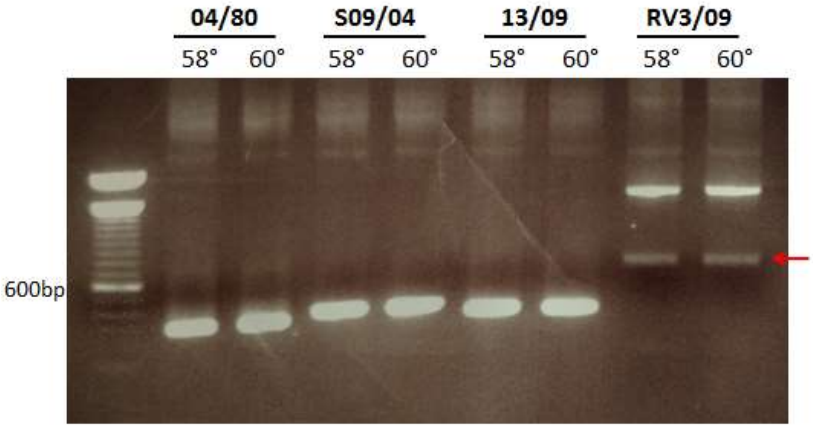

Figura 34 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR do vetor REC B utilizando primers internos da sequencia do promotor. O tamanho esperado dos produtos era de 300bp para a reação 04/80; 351bp para a S09/04; 294bp para 13/09 e 379bp para RV3/09. Note que apenas a reação utilizando o primer RV3 apresentou banda no tamanho diferente do esperado (seta vermelha*).*

A reação de PCR utilizando o *RV3 primer* é essencial para obter a orientação da inserção do fragmento, ou seja, se ela foi clonada da orientação 5'-3' ou 3'-5'. Neste caso, o tamanho esperado do produto de PCR utilizando o primer RV3 e primer 09 (específico da sequencia do promotor clonado) era de ~379bp no caso da orientação correta 5'-3', entretanto observamos uma banda em ~900bp, tamanho compatível com a orientação 3'-5'. Dessa forma, a ligação do fragmento se deu de maneira invertida, impossibilitando a utilização deste vetor, uma vez que é estritamente necessário que a orientação seja correta, pois a atividade do promotor essencial (*core promoter*) requer orientação correta para a montagem do complexo transcricional.

Na tentativa de melhorar a estratégia de clonagem, foram desenhados primers contendo sequências específicas para as enzimas KpnI e HindIII nas extremidades 5' do primer sense e antisense, respectivamente, chamados de primers com adaptadores. Foram utilizados os mesmos primers (13/80), aos quais foram adicionadas as sequências adaptadoras e retomados os experimentos de PCR do DNA genômico como já descrito (Figura 35).

Tabela 05 – Sequência de nucleotídeos dos primers com e sem adaptadores. Em vermelho está indicada a sequência de restrição reconhecida pela enzima correspondente.

Alvo	Orientação	Denominação	Sequencia de nucleotídeos 5'-3'
Promotor do gene de WNK4	Sense	13	AGAGGGATATGACAGGGAGT
	Antisense	80	GGCCACTCGAAACTCATC
	Sense	13KpnI	ACACGGTACvCAGAGGGATATGACAGGGAGT
	Antisense	80HindIII	CACAAvAGCTTGGCCACTCGAAACTCATC

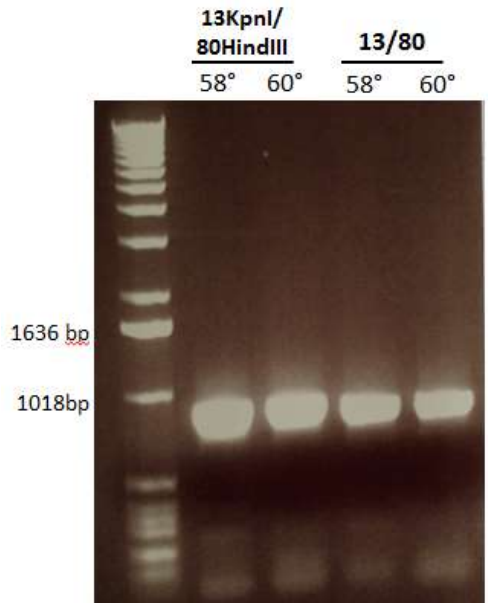

Figura 35 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR do promotor de WNK4 utilizando o DNA genômico como template. Note bandas no tamanho esperado (~900bp) em todas as reações. Foi repetido o PCR com os primers sem adaptadores apenas como controle da reação.

As bandas referentes à reação de PCR com os primers com adaptadores foram extraídas do gel e submetidas à digestão com as enzimas KpnI e HindIII, assim como o vetor pGL4.10, numa reação *overnight* a 4°C (Figura 36).

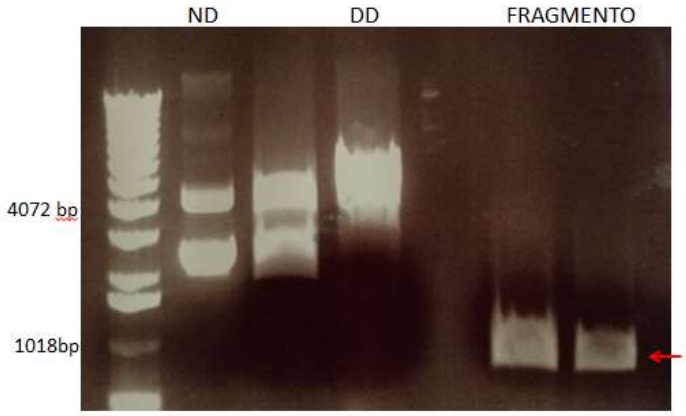

Figura 36 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de digestão com as enzimas KpnI e HindIII do vetor pGL4.10 (DD) e do fragmento de PCR obtido com os primers com adaptadores (FRAGMENTO) – ver seta vermelha. Note bandas no tamanho esperado (~900bp) na reação do fragmento de PCR, bem como linearização do vetor (banda única) na reação DD. O poço ND refere-se ao pGL4.10 não digerido, compatível com o padrão de migração do tipo *supercoiled*.

Posteriormente, foram seguidas as reações de ligação, transformação e clonagem como já descrito anteriormente. Ao final deste processo, foram obtidas dezenas de colônias brancas, sugerindo alta eficiência de ligação. A reação de PCR das colônias utilizando o primer sense RV3 (específico do vetor pGL) e o primer antisense 09 (específico da sequência do promotor) foi feita para a identificação de colônias recombinantes – Figura 37).

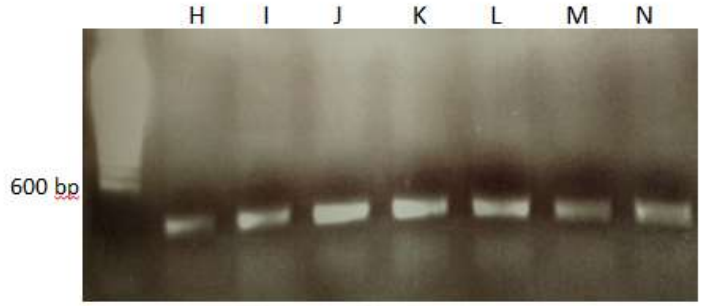

Figura 37 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR para triagem das colônias recombinantes. Note a presença de uma banda de ~360bp em todas as amostras. A partir dessa reação, foram escolhidas as colônias J e K.

Diversas colônias apresentaram a sequência no tamanho esperado (cerca de 20), foram selecionadas duas (colônia J e K) para prosseguir com o *Miniprep* e a partir daí foram denominadas de CLONE J e CLONE K. Estes vetores foram submetidos à digestão com enzimas de restrição KpnI e HindIII para confirmar a inserção do fragmento.

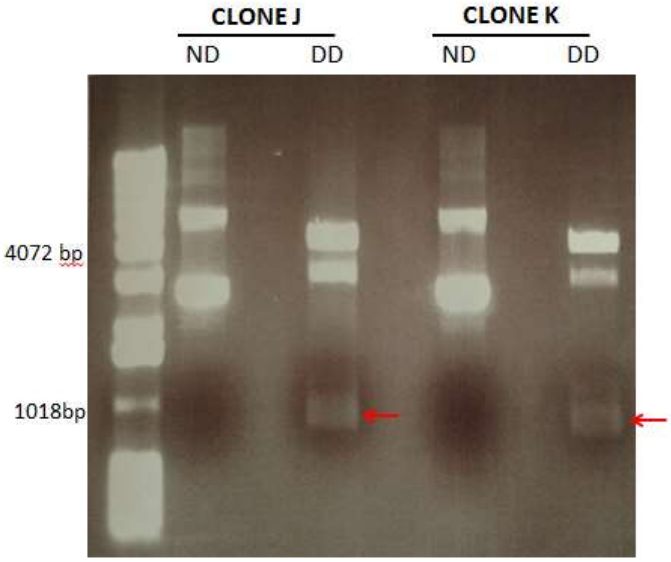

Figura 38 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de digestão com as enzimas KpnI e HindIII dos clones J e K. Note bandas no tamanho esperado (~900bp) nas reações DD (double digest) mostrando a remoção completa do fragmento do promotor clonado (setas vermelhas). O poço ND refere-se aos vetores não digeridos, compatível com o padrão de migração do tipo *supercoiled.*

O clone J foi selecionado para prosseguir com o *Maxiprep* para a obtenção de produtos em quantidade necessária para a realização dos experimentos seguintes. Após a extração e purificação, o clone J foi submetido a uma reação de PCR com primers internos da sequência, bem como utilizando o primer RV3 para confirmação da inserção na orientação 5'-3'.

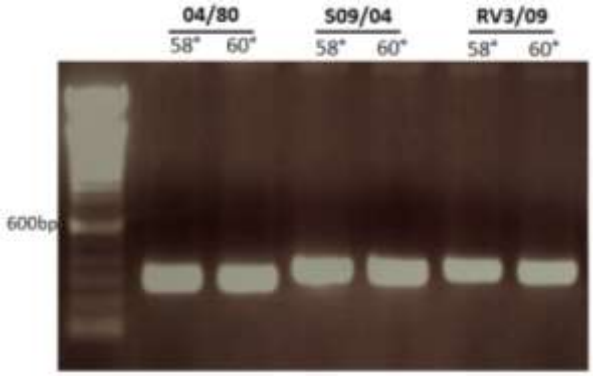

Figura 39 – Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR do vetor CLONE J utilizando primers internos da sequencia do promotor. Os números acima indicam as combinações de primers utilizadas, bem como as diferentes temperaturas de anelamento. O tamanho esperado dos produtos era de 300bp para a reação 04/80; 351bp para a S09/04; 294bp para 13/09 e 379bp para RV3/09. Note a presença de bandas específicas nos tamanhos esperados em todas as reações, confirmando a especificidade da sequência, bem como a inserção adequada do fragmento na orientação 5'-3'.

5.6 Eficiência de transfecção de células MCDK

Antes de iniciarmos a transfecção com os vetores repórteres, foi necessária a padronização das condições de transfecção das células MDCK. A partir da transfecção com vetor GFP em diferentes condições de confluência celular, concentração de reagentes e Lipo2000 ou 3000, como mostra a figura 40, numa análise subjetiva, pode-se observar que 500ng de DNA, bem como 2ul de Lipo2000 (0,4% Lipo2000) são suficientes para uma taxa de transfecção razoável. Além disso, é possível observar que as células transfectadas com Lipo3000 apresentaram baixa eficiência de transfecção.

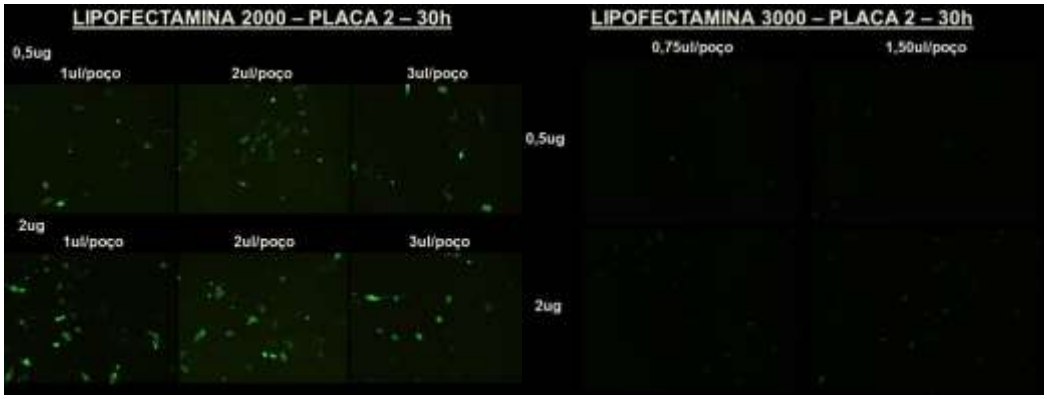

Figura 40 – Análise subjetiva da eficiência de transfecção de células MDCK em diferentes condições experimentais. As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência em aumento de 300x.

5.7 Avaliação dos efeitos de AngII sobre a modulação da via calcineurina/NFAT

Como podemos ver na figura 41, AngII aumenta a atividade de NFAT na concentração de 10^{-10}M e CsA inibe a atividade NFAT mesmo na presença de AngII. As referências 1:40 e 1:100 se referem a proporção entre pGL4.30 e pRL-CMV, onde 1:40 (2µg pGL4.30 para 50ng pRL-CMV/poço) e 1:100 (2µg pGL4.30 para 20ng pRL-CMV/poço).

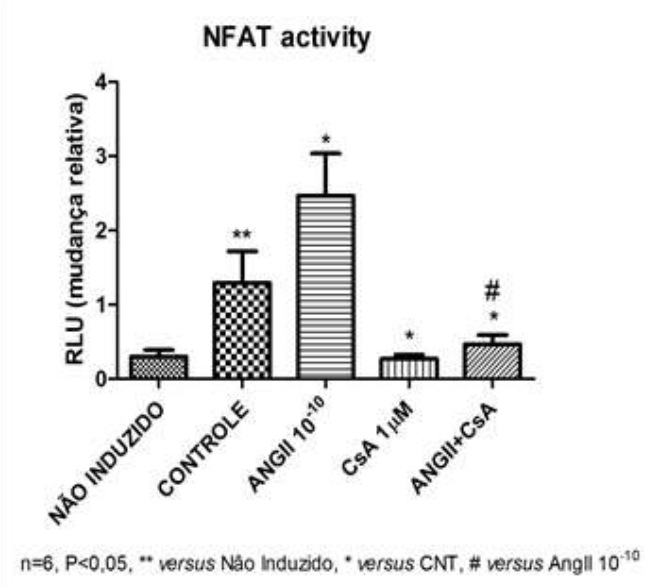

Figura 41 – Efeito da AngII e CsA sob a atividade de NFAT em células MDCK co-transfectadas com pGL4.30 e pRL-CMV. Teste (ANOVA seguido por Bonferroni; RLU = Relative Luciferase Units.)

5.8 Avaliação da atividade da PP2B intracelular

A figura 42 mostra o efeito de AngII e CsA sobre a atividade da calcineurina intracelular (PP2B). Como esperado, CsA inibiu significativamente a atividade da PP2B; entretanto, AngII não teve efeito.

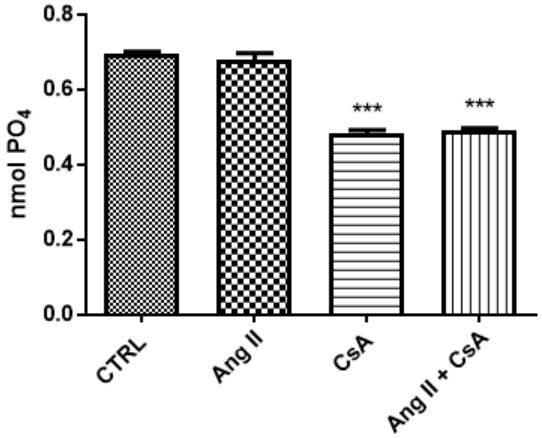

Figura 42 – Efeito da AngII e CsA sobre a atividade da calcineurina intracelular em células MDCK tratadas por 4h. (***_vs._ CTRL; _P_<0,001 – ANOVA seguido por Bonferroni; RLU = Relative Luciferase Units.)

5.9 Avaliação da especificidade do constructo CLONE J através do sequenciamento gênico

Embora tenhamos feito a avaliação da especificidade da sequência do promotor de WNK4 (através de PCR convencional) e também a confirmação de que a ligação do fragmento ocorreu de maneira orientada, realizamos também o sequenciamento gênico do constructo.

O sequenciamento foi necessário tanto para obtermos a sequência de nucleotídeos curada, como para realizar o mapeamento dos elementos regulatórios dentro do promotor do gene de WNK4 de cão. Abaixo está o alinhamento entre a sequência obtida pelo sequenciamento do CLONE J (linha de cima - Fragm) e da sequencia dos bancos de dados (pROM – linha de baixo). O alinhamento foi feito com a ajuda da plataforma online *CLUSTALW*, onde "*" corresponde a 100% de identidade.

```
Fragm  GCGCAGACATTTCTCTGGCCTAACTGGCCGGTACCAGAGGGATATGACAGGGAGTCCATA
pROM   ----------------------------------AGAGGGATATGACAGGGAGTCCATA
                                          *************************

Fragm  AAAGACAGTGCTGGGCTGCACTGAGAGTCCAGCCGTGAGGTTAGGGAATCTGGGGCTCAG
pROM   AAAGACAGTGCTGGGCTGCACTGAGAGTCCAGCAGTGAGGTTAGGGAATCTGGGGCTCAG
       ********************************* **************************

Fragm  CCAGCATGATCCATGCATTTTATTATTTATTTTTATTTTTTATTTTTTATTTTTTGATCC
pROM   CCAGCATGATCCATGCATTTTATTATTTA-------TTTTTATTTTTTATTTTTTGATCC
       ******************************       ************************

Fragm  ATGCA-TTTTTTTTTCCAGTAATACAACTGGGCCCAGGAGTTGTGGGGGAGAGAACAGAG
pROM   ATGCATTTTTTTTTTCCAGTAATACAACTGGGCCCAGGAGTTGGGGGGGAGAGAACAGAG
       ***** ************************************* ****************

Fragm  GCAGGGGCAGGGAGCAACTACCCTGGTTTGGGAAGTGACCAGCAGGTAGACAAGCAAGGG
pROM   GCAGGGGCAGGGAGCAACTACCCTGGTTTGGGAAGTGACCAGCAGGTAGACAAGCAAGGG
       ************************************************************

Fragm  GACAGAACTGGGTAGTCTAGGCTGGGTTAAGGAGTCAAACTGGCTAGATCAATAAGACCA
pROM   GACAGAACTGGGTAGTCTAGGCTGGG-TAAGGAGTCA-------------AATAAGACCA
       *************************** **********             **********

Fragm  AAATGGGTCTGGAGACTTGTGATGTGGGAAGTGAGGACATGAGAGATGGATGGCTGTAGT
pROM   AAATGGGTCTGGAGACTTGTGATGTGGGAAGTGAGGACATGAGAGATGGATGGCTGTAGT
       ************************************************************

Fragm  CAGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAGCTGAAGTTTTTCCAGCGCTGAAAGCTACAAGC
pROM   CAGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAGCTGAAGTTTTTCCAGCGCTGAAAGCTACAAGC
       ************************************************************

Fragm  GTGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACAGTGAATGGTGAGGTCGAAAGACTTAGCAATTG
pROM   GTGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACAGGGAATGGTGAGGTCGAAAGACTTAGCAATTG
       ****************************** ******************************
```

```
Fragm  AGAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTGTTAAATGCAACTGACAACGAACGTTAGTATTA
pROM   AGAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTGTTAAATGCAACTGACAACGAACGTTAGTATTA
       ************************************************************

Fragm  AAAAGCTGAGCAGAGTGGAAACAAGCCTCAGCAGTTCTGCCAAAGTGTGCCGCTTAAGCG
pROM   AAAAGCTGAGCAGAGTGGAAACAAGCCTCAGCAGTTCTGCCAAAGTGTGCCGCT------
       ***************************************************

Fragm  CTTTGGGGAGTCACTGCCCTTCTCTAGAGCTGCACGAGAAGACTTTTCGGGGTTCTACAC
pROM   -TTGGGGAAGTCACTGCCCTTCTCTAGAGCTGCACGAGAAGACTTTTCGGGGTTCTACAC
        ** *** **************************************************

Fragm  GGTAAGGATTTTTAGGATAATGGCAAACGACTGGCAGACCAGCAAGATCCCTCACGTCGT
pROM   GGTAAGGATTTTTAGGATAATGGCAAACGACTGGCAGACCAGCAAGATCCCTCACGTCGT
       ************************************************************

Fragm  TGGGCCTCCCCTCTCCGAGGAGGCATCCGGAACCTTTCTGCTGTGCTTTTTGCCCGGACG
pROM   TGGGCCTCCCCTCTCCGAGGAGGCATCCGGAACCTTTCTGCTGTGCTTTTTGCCCGGACG
       ************************************************************

Fragm  TGCAGAAGCGGAGGCCGGAAGTCCTTTGCCCGGAGGTTCCGAGTTTCCTGGGCTACTACA
pROM   TGCAGAAGCGGAGGCCGGAAGTCCTTTGCCCGGAGGTTCCGAGTTTCCTGGGCTACTACA
       ************************************************************

Fragm  ATGGCGATGAG-TTCGAGTGGCCAATTGTAGTAGCCCAGGAAACTCGGAACCTCCGGGCA
pROM   ATGGCGATGAGTTTCGAGTGGCC-------------------------------------
       *********** ***********
```

5.10 Avaliação da atividade do promotor de WNK4 clonado no vetor pGL4.10

O promotor de WNK4 clonado no vetor pGL4.10 como descrito acima, gerando um vetor recombinante chamado “Clone J”, foi transfectado em células MDCK para a avaliação da atividade basal, juntamente com a transfecção do vetor pGL4.74 (*Renilla luciferase*) para controle interno de transfecção. A figura 42 mostra que o vetor Clone J apresenta um promotor ativo, pois foi capaz de aumentar a síntese de luciferase em condições basais da célula, quando comparado com o vetor pGL4.10 vazio, ou seja, sem promotor no gene de luciferase.

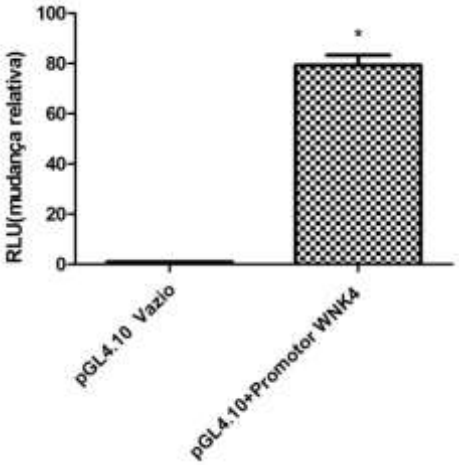

Figura 43 – O vetor recombinante “Clone J” apresenta o promotor de WNK4 ativo mesmo sem estimulação, demonstrando a eficiência do constructo. Teste “t” de Student. * p <0,05 *vs*. CNT. (n=4). RLU = Relative Luciferase Units.

5.11 Avaliação dos efeitos de AngII e CsA sobre a atividade do promotor de WNK4

Para avaliar se AngII e CsA são capazes de modular a atividade do promotor do gene de WNK4, foram procedidos experimentos de transfecção transitória com o vetor Clone J (pGL4.10 recombinante com o fragmento do promotor de WNK4), bem como o vetor pGL4.74 (*Renilla luciferase*) como controle interno de transfecção.

Após 24h de tempo de transfecção as células foram incubadas com AngII nas concentrações 10^{-10}M, CsA 1uM e ambas em combinação. Após 24h de incubação, foram submetidas ao ensaio de luciferase como descrito acima. O gráfico abaixo mostra que tanto AngII como CsA são capazes de aumentar a atividade da luciferase de forma significativa, ou seja, ambas são capazes de estimular o promotor de WNK4.

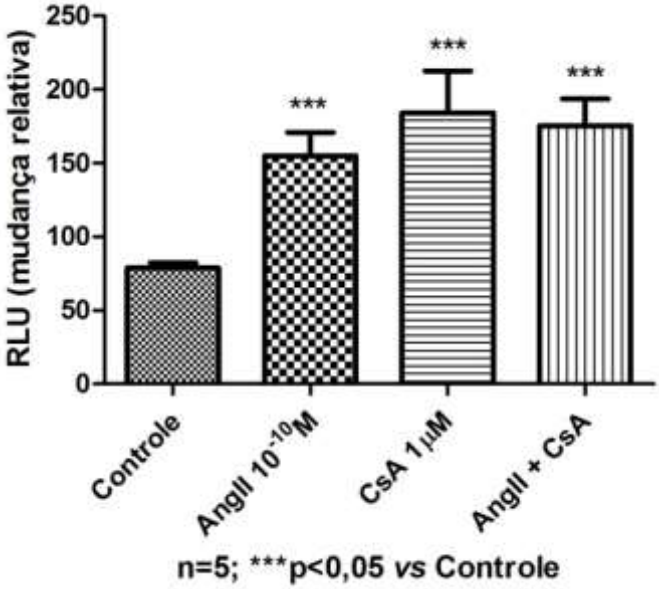

Figura 44 – Efeito da AngII e CsA sobre o promotor de WNK4. Tanto AngII quanto CsA são capazes de estimular significativamente a atividade do promotor. Teste ANOVA seguido por Bonferroni. *** p <0,05 *vs*. CNT. (n=5). (RLU = Relative Luciferase Units.)

5.12 Mapeamento dos elementos de regulação gênica do promotor de WNK4 e mutação dos elementos regulados por NFAT

Com o intuito de identificar elementos de regulação responsivos à NFAT no promotor do gene de WNK4, foi feita a análise da sequência completa utilizando a plataforma *MatInspector Release Professional* (*Genomatix®)* com corte de similaridade de 0,75. A busca de sequencias consensuais para sítios de ligação para fatores de transcrição no promotor de *Canis lupus familiaris* foi feita utilizando as sequências correspondentes de *Rattus novergicus*, *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Foram identificados 260 elementos de regulação dentro do promotor do gene de WNK4 de cães, sendo quarto (4) para NFAT. O NFAT se liga em

elementos no promotor gênico na sequência consensual do padrão T/AG**GGAA**NA/T/C (Rothermel B et al, 2.000).

Tabela 06 – Dados extraídos da plataforma *MatInspector* demonstrando a localização e a sequencia de quatro elementos para NFAT no promotor de WNK4.

	Detailed Family Information	Matrix	Opt.	Start	End	Anchor pos.	Strand	Matrix sim.	Mat. sim. - opt.	Sequence
65	Nuclear factor of activated T-cells	V$NFAT5.01	0,83	182	200	191	-	0,911	0,081	tactGGAAaaaaaatgca
119	Nuclear factor of activated T-cells	V$NFAT5.02	0,87	446	464	455	-	0,903	0,033	cgctGGAAaaacttcagct
163	Nuclear factor of activated T-cells	V$NFAT.01	0,95	610	628	619	+	0,968	0,018	cagagtGGAAacaagcctc
164	Nuclear factor of activated T-cells	V$NFAT5.01	0,83	612	630	621	+	0,875	0,045	gagtGGAAacaagcctcag

Após o mapeamento dos elementos de ligação para NFAT, seguimos com o desenho dos primers que serão utilizados nas reações do kit. Os primers foram desenhados manualmente com o auxílio do software *AnnHyb*®. Seguimos a linha de substituição de duas bases não consecutivas dentro do elemento, por bases não complementares. Abaixo temos a sequencia do promotor do gene amplificado e clonado WNK4 *canis* (Wild type) com a sinalização dos primers que serão utilizados para promover a mutação nos elementos para NFAT:

```
1       GCGCAGACATTTCTCTGGCCTAACTGGCCGGTACCAGAGGGATATGACAGGGAGTCCATA
61      AAAGACAGTGCTGGGCTGCACTGAGAGTCCAGCCGTGAGGTTAGGGAATCTGGGGCTCAG
121     CCAGCATGATCCATGCATTTTATTATTTATTTTTATTTTTTATTTTTTATTTTTTGATCC
181     ATGCATTTTTTTTCCAGTAATACAACTGGGCCCAGGAGTTGTGGGGGAGAGAACAGAG
240     GCAGGGGCAGGGAGCAACTACCCTGGTTTGGGAAGTGACCAGCAGGTAGACAAGCAAGGG
300     GACAGAACTGGGTAGTCTAGGCTGGGTTAAGGAGTCAAACTGGCTAGATCAATAAGACCA
360     AAATGGGTCTGGAGACTTGTGATGTGGGAAGTGAGGACATGAGAGATGGATGGCTGTAGT
420     CAGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAGCTGAAGTTTTTCCAGCGCTGAAAGCTACAAGC
480     GTGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACAGTGAATGGTGAGGTCGAAAGACTTAGCAATTG
540     AGAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTGTTAAATGCAACTGACAACGAACGTTAGTATTA
600     AAAAGCTGAGCAGAGTGGAAACAAGCCTCAGCAGTTCTGCCAAAGTGTGCCGCTTAAGCG
660     CTTTGGGGAGTCACTGCCCTTCTCTAGAGCTGCACGAGAAGACTTTTCGGGGTTCTACAC
720     GGTAAGGATTTTTAGGATAATGGCAAACGACTGGCAGACCAGCAAGATCCCTCACGTCGT
780     TGGGCCTCCCCTCTCCGAGGAGGCATCCGGAACCTTTCTGCTGTGCTTTTTGCCCGGACG
840     TGCAGAAGCGGAGGCCGGAAGTCCTTTGCCCGGAGGTTCCGAGTTTCCTGGGCTACTACA
900     ATGGCGATGAGTTCGAGTGGCCAATTGTAGTAGCCCAGGAAACTCGGAACCTCCGGGCA
959     AAGGACTTCCGGCCTCCGCTTCTGCACGTCCGGGCAAAAA
```

A Tabela 07 mostras os dados das sequências dos elementos para ligação dos fatores de transcrição NFAT encontrados no promotor de WNK4, bem como os primers utilizados nas reações de mutação pontual. Os elementos estão identificados com as cores correspondentes na sequencia do promotor de WNK4 para facilitar a visualização.

Tabela 07 – Sequências consensuais para ligação dos fatores de transcrição NFAT no promotor do gene de WNK4 e primers utilizados nas reações de mutação.

Elemento	Posição na sequência	Orientação da fita	Sequências
ELEMENTO 65	182-200	COMPLEMENTAR	5′ TGCATTTTTTTTTCCAGTA 3′ SEQUECIA SENSO 5′ tactGGAAaaaaaatgca 3′ SEQUENCIA ANTISENSO 3′ ATGACCTTTTTTTTTACGT 5′ SEQUENCIA SENSO 5′ TGCATTTTTTTTTCCAGTA 3′ SEQUENCIA SENSO 5′ TGCATTTTTTTGTACAGTA 3′ SUGESTÃO DE PRIMER 5′ TGCATTTTTTTGTACAGTA 3′ SEQUENCIA SENSO MUTADA
ELEMENTO 119	446-464	COMPLEMENTAR	5′ AGCTGAAGTTTTTCCAGCG 3′ SEQUENCIA SENSO 5′ cgctGGAAaaacttcagct 3′ SEQUENCIA ANTISENSO 3′ GCGACCTTTTTGAAGTCGA 5′ SEQUENCIA SENSO 5′ AGCTGAAGTTTTTCCAGCG 3′ SEQUENCIA SENSO 5′ AGCTGAAGTTTGTACACGC 3′ SUGESTÃO DE PRIMER 5′ AGCTGAAGTTTGTACACGC 3′ SEQUENCIA SENSO MUTADA
ELEMENTO 163	610-628	SENSO	5′ cagagtGGAAacaagcctc 3′ SEQUENCIA SENSO 3′ GTCTCACCTTTGTTCGGAG 5′ SEQUENCIA ANTISENSO 5′ GAGGCTTGTTCCACCTCTG 3′ SEQUENCIA ANTISENSO 5′ GAGGCTTGGTACACCTCTG 3′ SUGESTÃO DE PRIMER 5′ CAGAGTGTACACAAGCCTC 3′ SEQUENCIA SENSO MUTADA
ELEMENTO 164	612-630	SENSO	5′ gagtGGAAacaagcctcag 3′ SEQUENCIA SENSO 3′ CTCACCTTTGTTCGGAGTC 5′ SEQUENCIA ANTISENSO 5′ CTGAGGCTTGTTTCCACTC 3′ SEQUENCIA ANTISENSO 5′ CTGAGGCTTGTGTACACTC 3′ SUGESTÃO DE PRIMER 5′ GAGTGTACACAAGCCTCAG 3′ SEQUENCIA SENSO MUTADA

A inserção da mutação foi feita seguindo as instruções do kit *QuickChange II XL Site-Direct Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies®). A transformação foi feita em bactérias XL10-Gold ultracompetentes em meio NZY+. Após 18h de incubação a 37°C, foram observadas diversas colônias. Foram selecionadas cinco colônias para cada reação de mutação, seguimos com o PCR para triagem, miniprep e posterior sequenciamento dos clones selecionados.

5.13 Mutação dos elementos NFAT

Foram sequenciados 5 clones para cada mutação a fim de identificar pelo menos um clone que tivesse sofrido a mutação corretamente. Porém, surpreendentemente todos os 20 clones selecionados apresentaram a mutação correta na sequencia. Assim, selecionados a “colônia A” de cada elemento para seguir com os experimentos de maxiprep e posteriormente com os estudos funcionais de luciferase. Abaixo o sequenciamento na região correspondente à mutação da “colônia A” de cada elemento mutado, as quais foram utilizadas nos experimentos funcionais:

- Mutação colônia A - ELEMENTO 65:

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
(...)
sequencia_selvagem      CCAGCATGATCCATGCATTTTATTATTTATTTTTATTTTTTATTTTTTATTTTTTGATCC
sequencia_mutada        CCAGCATGATCCATGCATTTTATTATTTATTTTTATTTTTTATTTTTTATTTTTTGATCC
                        ************************************************************

sequencia_selvagem      ATGCATTTTTTTTCCAGTAATACAACTGGGCCCAGGAGTTGTGGGGGAGAGAACAGAGG
sequencia_mutada        ATGCATTTTTTTGTACAGTAATACAACTGGGCCCAGGAGTTGTGGGGGAGAGAACAGAGG
                        ************ * *********************************************

sequencia_selvagem      CAGGGGCAGGGAGCAACTACCCTGGTTTGGGAAGTGACCAGCAGGTAGACAAGCAAGGGG
sequencia_mutada        CAGGGC-AGGGAGCAACTACCCTGGTTTGGGAAGTGACCAGCAGGTAGACAAGC------
                        *****  **********************************************
(...)
```

- Mutação colônia A – ELEMENTO 119:

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
(...)
colônia119A             AATGGGTCTGGAGACTTGTGATGTGGGAAGTGAGGACATGAGAGATGGATGGCTGTAGTC
promotor                AATGGGTCTGGAGACTTGTGATGTGGGAAGTGAGGACATGAGAGATGGATGGCTGTAGTC
                        ************************************************************

colônia119A             AGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAGCTGAAGTTTGTACAGCGCTGAAAGCTACAAGCG
promotor                AGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAGCTGAAGTTTTTCCAGCGCTGAAAGCTACAAGCG
                        ************************************ * ********************

colônia119A             TGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACAGTGAATGGTGAGGTCGAAAGACTTAGCAATTGA
promotor                TGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACAGTGAATGGTGAGGTCGAAAGACTTAGCAATTGA
                        ************************************************************

colônia119A             GAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTGTTAAATGCAACTGACAACGAACGTTAGTATTAA
promotor                GAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTGTTAAATGCAACTGACAACGAACGTTAGTATTAA
                        ************************************************************
(...)
```

- Mutação colônia A – ELEMENTO 163:

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

(...)
colonia163A             GATGGCTGTAGTCAGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAGCTGAAGTTTTTCCAGCGCTG
promotor                GATGGCTGTAGTCAGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAGCTGAAGTTTTTCCAGCGCTG
                        ************************************************************

colonia163A             AAAGCTACAAGCGTGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACAGTGAATGGTGAGGTCGAAAG
promotor                AAAGCTACAAGCGTGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACAGTGAATGGTGAGGTCGAAAG
                        ************************************************************

colonia163A             ACTTAGCAATTGAGAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTGTTAAATGCAACTGACAACGA
promotor                ACTTAGCAATTGAGAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTGTTAAATGCAACTGACAACGA
                        ************************************************************

colonia163A             ACGTTAGTATTAAAAAGCTGAGCAGAGTGTACACAAGCCTCAGCAGTTCTGCCAAAGTGT
promotor                ACGTTAGTATTAAAAAGCTGAGCAGAGTGGAAACAAGCCTCAGCAGTTCTGCCAAAGTGT
                        ***************************** * ****************************

colonia163A             GCCGCTTTA---------------------------------------------------
promotor                GCCGCTTAAGCGCTTTGGGGAGTCACTGCCCTTCTCTAGAGCTGCACGAGAAGACTTTTC
                        ******* *
(...)
```

- Mutação colônia A – ELEMENTO 164:

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
(...)
colônia164A          AAGTGAGGACATGAGAGATGGATGGCTGTAGTCAGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAG
promotor             AAGTGAGGACATGAGAGATGGATGGCTGTAGTCAGAGGAAGCAACTCTGAATCATAGAAG
                     ************************************************************

colônia164A          CTGAAGTTTTTCCAGCGCTGAAAGCTACAAGCGTGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACA
promotor             CTGAAGTTTTTCCAGCGCTGAAAGCTACAAGCGTGCTCCCATGGGTACTGCAGGAGAACA
                     ************************************************************

colônia164A          GTGAATGGTGAGGTCGAAAGACTTAGCAATTGAGAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTG
promotor             GTGAATGGTGAGGTCGAAAGACTTAGCAATTGAGAAGACTGGGGAATGATGAGGTGTTTG
                     ************************************************************

colônia164A          TTAAATGCAACTGACAACGAACGTTAGTATTAAAAAGCTGAGCAGAGTGTACACAAGCCT
promotor             TTAAATGCAACTGACAACGAACGTTAGTATTAAAAAGCTGAGCAGAGTGGAAACAAGCCT
                     ************************************************* * ********

colônia164A          CAGCAGTTCTGCCAAAGTGTGCCGCTTTAAATAAC-------------------------
promotor             CAGCAGTTCTGCCAAAGTGTGCCGCTTAAGCGCTTTGGGGAGTCACTGCCCTTCTCTAGA
                     *************************** *
(...)
```

5.14 Efeito da mutação dos elementos para ligação de NFAT na transcrição gênica

Após a obtenção dos constructos mutados nos elementos para ligação de NFAT, seguimos com os experimentos de luciferase como descrito anteriormente, com o intuito de observar o efeito da mutação na regulação da síntese proteica no promotor de WNK4.

Como podemos ver a figura 44, as mutações nos diferentes elementos pra ligação de NFAT no promotor do gene de WNK4 alterou o perfil de síntese proteica mesmo em condições basais.

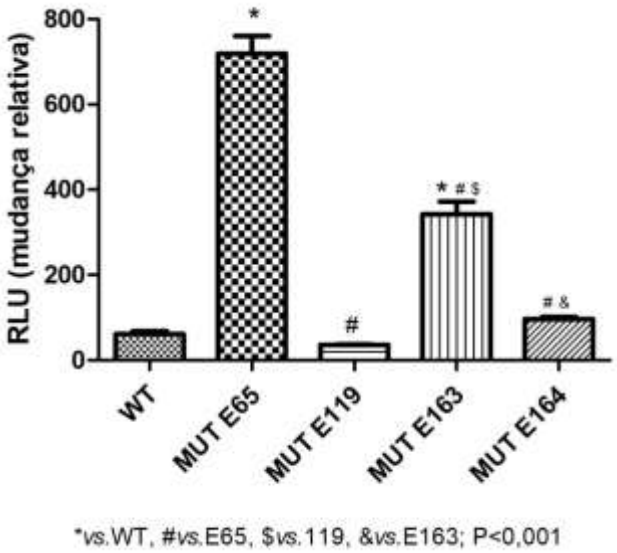

Figura 45 – Efeito da mutação de elementos para NFAT no promotor de WNK4 em condições basais da célula. ANOVA seguido por Bonferroni (n=4). (RLU = Relative Luciferase Units).
WT – promotor *wild type*.

Quando as células são submetidas à situação em que o aporte de NFAT no núcleo está aumentado, como na sinalização por AngII (Figura 45), os clones mutados apresentam um comportamento bastante diferente daquele da situação basal.

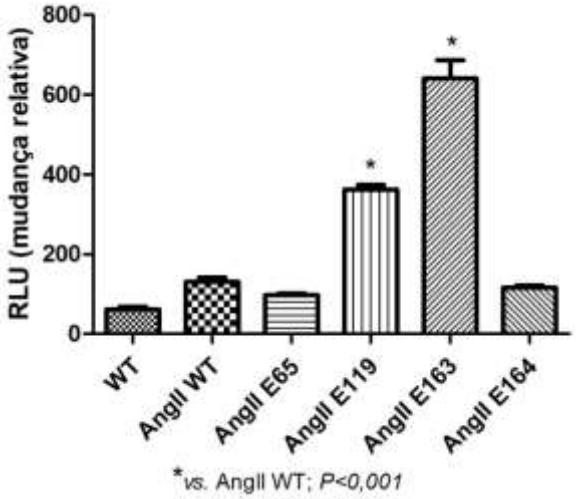

Figura 46 – Efeito da mutação de elementos para NFAT no promotor de WNK4 em condições de alta concentração de NFAT no núcleo da célula. Teste ANOVA seguido por Bonferroni. *** p <0,001 *vs*. AngII WT. (n=4). (RLU = Relative Luciferase Units.). WT – promotor *wild type*.

6 Discussão

A caracterização das mutações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento do PHAII foi um passo importante para um melhor entendimento de elementos chave na regulação da função renal. Neste contexto, as WNKs apresentam papel importante, pois são proteínas que modulam diversos mecanismos, dentre eles a atividade de vários transportadores de íons ao longo do néfron. WNK4, além de inibir canais para K^+ (ROMK), modula a atividade do NCC e o tráfico deste para a membrana apical, processos que requerem regulação fina, pois o correto funcionamento do NCC é extremamente importante para a manutenção hidrossalina do organismo, tanto é que mutações em WNK4 (e WNK1) culminam com o quadro clínico importante do PHAII; bem como mutações no próprio NCC causam a Síndrome de Gilteman.

A literatura científica trás inúmeras informações sobre as WNKs, pois devido à relevância do tema, dezenas de grupos de pesquisa têm dedicado esforços na busca do esclarecimento dos mecanismos que envolvem as WNK. Já está estabelecido, por exemplo, que o controle do conteúdo da proteína WNK4 na célula pode ser mediado pela ubiquitinação e que diversos agentes podem regular esta via. Entretanto, ainda existem inúmeros processos que carecem de esclarecimentos, dentre eles podemos citar a regulação da transcrição gênica.

Neste contexto, o fato da CsA (um inibidor da via calcineurina/NFAT) ser capaz de aumentar o conteúdo da proteína- e do mRNA-WNK4 e porque NFAT atua na modulação da transcrição de inúmeros genes, nos levou a pensar que a via NFAT pudesse estar envolvida também com o controle da transcrição gênica de WNK4. Curiosamente, AngII apresenta efeito semelhante ao de CsA sobre o conteúdo da proteína WNK4 na célula, mas age de maneira antagônica sobre a sinalização calcineurina/NFAT, já que age como estimulador desta via. Esse efeito antagônico de CsA e AngII nos levou a querer investigar como a via de sinalização calcineurina/NFAT pode estar relacionada com a transcrição do gene de WNK4.

No que concerne ao estudo da regulação gênica, é possível observar uma maior densidade de informações a cerca de WKN1 em relação às demais WNKs. Dessa forma, este trabalho objetivou estudar a regulação gênica de WNK4, de modo a identificar os elementos regulatórios na sequência do promotor do gene e, assim, proporcionar um entendimento maior a cerca dos fatores que estão envolvidos na transcrição gênica de WNK4.

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a MDCK, uma linhagem heterogênea de células oriundas de néfron distal de cão, tendo características mistas de células de túbulo convoluto distal, segmento de conexão e ducto coletor. A escolha desta linhagem foi oportuna porque WNK4 é amplamente expressa neste segmento. Entretanto, por se tratar de uma espécie relativamente pouco utilizada em pesquisa, quando comparado com rato ou camundongo, nos deparamos com

algumas dificuldades, como a ausência de mapeamento adequado do gene em estudo.

Para dar início à investigação dos efeitos de AngII e CsA sobre a regulação gênica de WNK4, a primeira pergunta a ser respondida foi se AngII e CsA seriam capazes de modular a síntese de mRNA-WNK4 em células MDCK. Para isso, realizamos experimentos de RT-PCR e, corroborando com a literatura (Melnicov et al., 2011), observamos que AngII e CsA aumentam o mRNA-WNK4 após 24h de incubação, validando a linhagem celular para o estudo. A sequência de mRNA-WNK4 foi obtida dos bancos de dados (NCBI) e, após análise por alinhamento de nucleotídeos, foi observado grande similaridade com a sequência de humano, rato e camundongo, permitindo a utilização dela neste estudo.

Assim como descrito por Abraham e colaboradores (2012), AngII foi capaz de aumentar a sinalização via NFAT após 24h de incubação de maneira bastante significativa e como já esperado, ciclosporina inibiu significativamente a atividade NFAT, efeito amplamente estabelecido na literatura (Wenger, 1985). Adicionalmente, observamos que a ciclosporina é capaz de inibir a atividade da calcineurina (PP2B) intracelular de maneira significativa, mesmo na presença de AngII. Porém, neste modelo de incubação de 4h, AngII não alterou a atividade da calcineurina.

O fato de não termos observado efeito da AngII sobre a atividade da calcineurina, pode ser decorrente de uma questão temporal. Pois em cardiomiócitos, Ni e colaboradores (2006) propõem que a via pela qual AngII aumenta a atividade da calcineurina seja decorrente da inibição da degradação desta. Este modelo envolve a fosforilação do fator de transcrição FOXO por Akt (PI3K/Akt). FOXO fosforilado sai do núcleo e vai para o citoplasma, o que elimina o efeito ativador da transcrição do gene atrogina-1, uma proteína da família E3-ubiquitina ligase, que induz a degradação da calcineurina. Assim, o estímulo com AngII impede a ubiquitinação da calcineurina e, consequentemente, sua degradação, com aumento da atividade dessas fosfatases e ativação de genes dependentes de NFAT (Figura 47). Dessa forma, acreditamos que o efeito estimulador da atividade de AngII sobre a calcineurina aconteça em um período de tempo mais tardio.

Utilizando a sequência do mRNA de WNK4 de cães disponível nos bancos de dados, fizemos dezenas de alinhamentos com sequencia de rato, camundongo e humano para a máxima confirmação possível da natureza da sequência. Assim, desenhamos primers específicos e conseguimos amplificar, por PCR convencional, um fragmento de cerca de 800bp a montante do primeiro exon. Após diversos testes de alinhamento, especificidade e inserção do fragmento na orientação 5’-3’ (orientação necessária para a montagem do complexo transcricional), obtivemos um constructo contendo o promotor de WNK4 de cão regulando o gene de luciferase no vetor pGL4.10. Estes experimentos foram animadores, pois pudemos verificar que AngII e CsA são capazes de estimular a síntese de luciferase, ou seja, apresentam atividade estimuladora sobre o promotor

de WNK4, corroborando com os resultados de RT-PCR, nos quais observamos estímulo da síntese de mRNA de WNK4

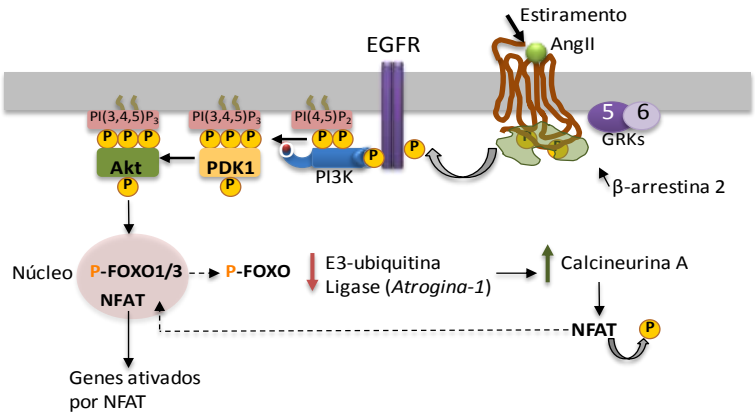

Figura 47 – Mecanismo pelo qual a ativação de AT1R por AngII ou por estiramento induz aumento da atividade da calcineurina. Receptores tirosina cinase ativados por AngII ativam a via PI3K/Akt que, ao fosforilar FOXO, diminui a degradação da calcineurina, aumentando sua atividade.

Na literatura existem diversos estudos sobre a regulação do conteúdo de proteína WNK4 e da fosforilação desta, entretanto, não existem muitos estudos sobre a regulação gênica desta proteína. Embora Sun e colaboradores (2013) tenham demonstrado que diversos agentes (dentre eles AngII) são capazes de regular o promotor do gene de WNK4, este trabalho apresenta resultados pobres e pouco aprofundados. Portanto, o nosso trabalho abre espaço para a discussão destes processos até então pouco abordados, já que a regulação do gene de WNK4 ainda é pouco conhecida.

Ao observar o efeito da mutação gênica de elementos pontuais regulados por NFAT no promotor de WNK4, nos deparamos com diversos achados muito interessantes. É importante analisar estes resultados levando em conta que o promotor do gene de WNK4 é regulado por diversos elementos além do NFAT e que estes elementos estão intactos e atuando simultaneamente ao NFAT, porém devemos pensar que as mutações são específicas para sítios NFAT, as quais causam uma “perturbação” na regulação por esta via. Para avaliar o efeito do NFAT especificamente, seguimos com o estudo das mutações em situações de aumento do NFAT no núcleo, como na sinalização por AngII.

Na situação basal (Figura 48), onde a sinalização por NFAT está sendo amplamente regulada por diversos mecanismos celulares, observamos que o constructo que apresenta mutação no E65 tem uma atividade de síntese muito aumentada. Esse achado isoladamente, nos faz pensar que o E65 representa um elemento de ligação para fator de transcrição (no caso NFAT) repressor da síntese proteica, pois a não ligação do NFAT (devido à mutação), torna a síntese proteica

muito aumentada. Uma suposição para este achado ser que os outros elementos regulados por NFAT devam apresentar uma atividade estimuladora importante e com alta afinidade por NFAT, uma vez que mesmo em baixas concentrações de NFAT (basal), a síntese proteica acontece expressivamente.

Já quando vemos os efeitos da mutação no E119, observamos que a taxa de síntese proteica se assemelha ao controle. Isoladamente, podemos suspeitar que o NFAT, ao ligar-se no E119, induza um efeito estimulador sobre a síntese proteica, mas este efeito só pode ser discutido em situações de estímulo da sinalização por NFAT. Além disso, os outros elementos juntos parecem estar em equilíbrio e mantém a síntese proteica em níveis normais.

Seguindo com as observações da mutação no E163, vemos que a inibição da ligação do NFAT neste elemento (devido à mutação) promove uma resposta estimuladora sobre a síntese proteica. Assim, podemos pressupor que o E163 apresenta efeito repressor sobre a síntese, porém em uma magnitude inferior ao efeito repressor do elemento E65. Além disso, os outros elementos devem estar atuando de forma estimuladora.

Finalmente, ao analisarmos o comportamento do constructo com mutação no E164, observamos que a síntese proteica também se mantém em níveis semelhantes ao controle. Assim, isoladamente, podemos pressupor que o E164 deva ter um efeito estimulador e a sinalização nos demais elementos mantém a síntese proteica em níveis normais.

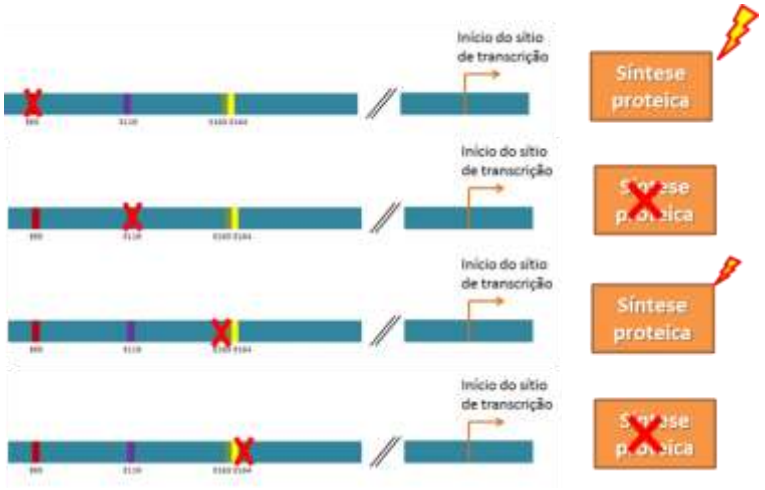

Figura 48 – Esquema do efeito das mutações pontuais dos elementos para NFAT no promotor de WNK4 em condições basais da célula.

Na situação em que o aporte de NFAT no núcleo está aumentado (Figura 49), ou seja, há estímulo da sinalização por NFAT, os constructos mutados nos elementos para NFAT apresentam comportamentos ainda mais complexos, dos quais podemos tirar informações valiosas.

O NFAT atuando sobre o constructo com mutação no E65 apresenta não induz síntese proteica significativa, com taxas semelhantes ao controle. Ou seja, o NFAT atuando sobre os outros elementos estimuladores não é capaz de induzir síntese proteica. Assim, o efeito do NFAT ao ligar-se no elemento repressor (E163) é preponderante ao efeito nos elementos estimuladores (E119 e E164). Este achado sugere que o E163 (repressor) tenha alta capacidade de repressão quando em situações de alta concentração de NFAT no núcleo.

A mutação no E119 torna a síntese proteica aumentada em condições de alta concentração de NFAT no núcleo da célula. Se pressupusermos que o E119 é um elemento estimulador e que, mesmo com a inibição da ligação do NFAT neste elemento devido à mutação, a síntese proteica se torna aumentada, podemos imaginar que este efeito se dá pelo estímulo de NFAT no outro elemento estimulador, no caso o E164. Além disso, nesta situação, os elementos repressores E65 e E163 estão atuando no controle da expressão gênica. Se considerarmos que o saldo positivo de síntese proteica está acontecendo por estimulação do E164 a despeito do efeito repressor de E65 e E163, pode-se imaginar que o E164 tenha alta capacidade de estimular a síntese proteica em resposta ao aumento de concentração de NFAT no núcleo.

Mesmo em situações de aumento da sinalização por NFAT, observamos que não há a estímulo sobre a transcrição gênica quando o promotor está mutado no E164. Ou seja, o NFAT nos outros elementos não é capaz de induzir síntese e esta se mantém em níveis normais, comparáveis aos do controle. De acordo com todas essas observações, Este efeito corrobora com a hipótese do E164 ter alta capacidade estimulatória (comparado ao efeito estimulatório do E119) em resposta ao NFAT, pois a mutação deste elemento torna o efeito (repressor) dos demais elementos repressores preponderante ao efeito estimulatório do E119.

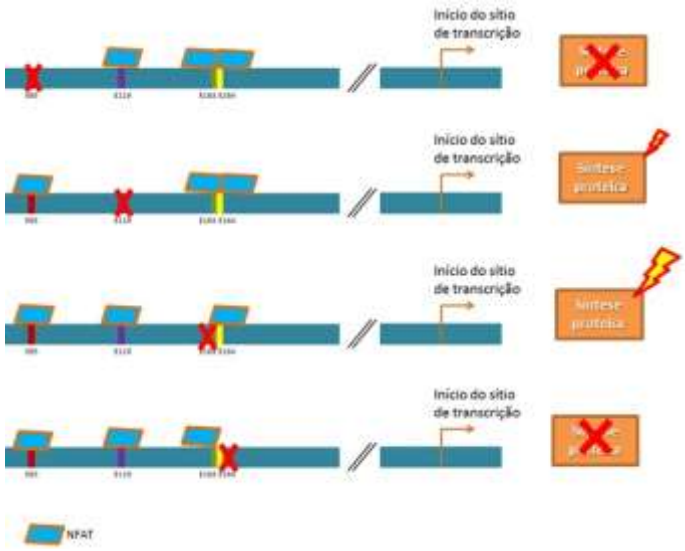

Figura 49 – Esquema do efeito das mutações pontuais dos elementos para NFAT no promotor de WNK4 em condições de estímulo da sinalização por NFAT, como no caso do tratamento com AngII.

7 Conclusão

Nossos experimentos mostram que a angiotensina é capaz de ativar significativamente a via de sinalização por NFAT, mesmo não apresentando efeito sobre a atividade da calcineurina. Além disso, AngII foi capaz de aumentar o conteúdo de mRNA de WNK4 e de estimular a síntese proteica no promotor de WNK4. Esses resultados mostram que AngII é capaz de estimular a síntese de WNK4 através da modulação da via de sinalização por NFAT.

Observamos também que a CsA aumenta o conteúdo de mRNA e de proteína WNK4. CsA também estimula significativamente o promotor de WNK4. Entretanto, contrariamente aos efeitos da AngII, CsA inibe a sinalização por NFAT e a atividade da calcineurina. Assim, podemos concluir que o efeito estimulatório de CsA sobre a síntese proteica de WNK4 parece ser independente de NFAT.

Os achados deste trabalho trazem perspectivas interessantes de como o NFAT pode se comportar na regulação da transcrição gênica de WNK4. Observamos que os elementos para ligação de fatores de transcrição NFAT no núcleo apresentam comportamentos diversos, tendo sido identificados elementos para ligação com fator de transcrição NFAT tanto estimuladores como repressores da síntese proteica. Além disso, observamos que esses elementos apresentam grau de afinidade de ligação ao NFAT, além de capacidade estimulatória e repressora diferentes, tornando assim, o estudo da regulação gênica de WNK4 por NFAT bastante complexo.

Em resumo, Ang é capaz de estimular a síntese de WNK4 através de ativação da via de sinalização por NFAT e que a CsA induz síntese de WNK4 provavelmente por uma via de sinalização independente de NFAT.

8 Referências Bibliográficas

1. Abdallah JG, Schrier RW, Edelstein C, Jennings SD, Wyse B, Ellison DH. Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive Na(+)/Cl(−)-cotransporter abundance: role of aldosterone. J Am Soc Nephrol;12:1335–1341, 2001.
2. Abraham F, Sacerdoti F, De León R, Gentile T, Canellada A. Angiotensin II Activates the Calcineurin/NFAT Signaling Pathway and Induces Cyclooxygenase-2 Expression in Rat Endometrial Stromal Cells. PLoS One;7(5):e37750, 2012.
3. Argaiz ER, Chavez-Canales M, Ostrosky-Frid M, Rodriguez-Gama A, Vázquez N, Gonzalez-Rodriguez X, Garcia-Valdés J, Hadchouel J, Ellison DH, Gamba G. Kidney-specific WNK1 isoform (KS-WNK1) is a potent activator of WNK4 and NCC. Am J Physiol Renal Physiol. 2018 May 30. doi: 10.1152/ajprenal.00145.2018. [Epub ahead of print].
4. Argaiz ER, Gamba G. The regulation of Na+Cl- cotransporter by with-no-lysine kinase 4. Curr Opin Nephrol Hypertens. Sep;25(5):417-23, 2016.
5. Bazúa-Valenti S, Rojas-Vega L, Castañeda-Bueno M, Barrera-Chimal J, Bautista R, Cervantes-Pérez LG, Vázquez N, Plata C, Murillo-de-Ozores AR, González-Mariscal L, Ellison DH, Riccardi D, Bobadilla NA, Gamba G. The Calcium-Sensing Receptor Increases Activity of the Renal NCC through the WNK4-SPAK Pathway. J Am Soc Nephrol Jul;29(7):1838-1848, 2018.
6. Bazúa-Valenti, S; Chávez-Canales, M; Rojas-Vega, L; González-Rodríguez, X; Vázquez, N; Rodríguez-Gama, A; Argaiz, ER; Melo, Z; Plata, C; Ellison, DH; García-Valdés, J; Hadchouel, J.; Gamba, G. The Effect of WNK4 on the NaCl Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride. J Am Soc Nephrol. Aug;26(8):1781-6, 2015.
7. 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.
8. Bossemeyer D.The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element.). Trends Biochem Sci., 19, 201 ± 205, 1994.
9. Boyden LM, Choi M, Choate KA, et al. Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. Nature 482: 98–102, 2012.
10. 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.
11. 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 SA 109: 7929–7934, 2012.
12. Chavez-Canales M, Arroyo JP, Ko B et al. Insulin increases the functional activity of the renal NaCl cotransporter. J Hypertens; 31: 303–311, 2013.
13. Chiga M, Rai T, Yang SS et al. Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone.Kidney Int; 74: 1403–1409 ; 2008.
14. Delaloy C, Lu J, Houot AM, Disse-Nicodeme S, Gasc JM, Corvol P, Jeunemaitre X. Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. Mol Cell Biol;23:9208–9221, 2003.
15. Dimke H, San-Cristobal P, de Graaf M, Lenders JW, Deinum J, Hoenderop JG, Bindels RJ. γ-Adducin stimulates the thiazide-sensitive NaCl cotransporter. J Am Soc Nephrol. Mar;22(3):508-17, 2011.
16. Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain. BMC Cell Biology, 12:43, 2011.
17. Glover M, Mercier Zuber A, Figg N, O'Shaughnessy KM. The activity of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter is regulated by protein phosphatase PP4. Can J Physiol Pharmacol. Oct;88(10):986-95, 2010.

18. Holden S, Cox J, Raymond FL. Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). Gene;335:109–119; 2004.
19. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Furstenberg A, Yang CL, Roeschel T, Paliege A, Howie AJ, Conley J, Bachmann S, Unwin RJ, Ellison DH: The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. Nature medicine 17:1304-9, 2011.
20. Huang CL, Cha SK, Wang HR, Xie J and Cobb MH. WNKs: protein kinases with a unique kinase domain. Exp and Molec Med, Vol. 39, No.5, 565-573, October 2007.
21. Ishizawa K1, Xu N2, Loffing J3, Lifton RP4, Fujita T5, Uchida S1, Shibata S. Potassium depletion stimulates Na-Cl cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3. Biochem Biophys Res Commun. Nov;480(4):745-751, 2016.
22. Ji AX, Prive GG. Crystal structure of KLHL3 in complex with Cullin3. PLos One 8: e60445, 2013.
23. Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS, Lifton RP. WNK4 regulates apical and basolateral Cl- flux in extrarenal epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A;101:2064–2069, 2004.
24. Kasagi Y, Takahashi D, Aida T, Nishida H, Nomura N, Zeniya M, Mori T, Sasaki E, Ando F, Rai T, Uchida S, Sohara E. Impaired degradation of medullary WNK4 in the kidneys of KLHL2 knockout mice. Biochem Biophys Res Commun. May 27;487(2):368-374, 2017.
25. Ko B, Mistry AC, Hanson L, Mallick R, Cooke LL, Hack BK, Cunningham P, Hoover RS: A newmodel of the distal convoluted tubule. Am J Physiol Renal Physiol 303: F700–F710, 2012.
26. Lai L; Feng X ; Liu D; Chen J; Zhang Y; Niu B; Gu Y; Cai H. Dietary salt modulates the sodium chloride cotransporter expression likely through an aldosterone-mediated WNK4-ERK1/2 signaling pathway. Pflugers Arch - Eur J Physiol 463:477–485, 2012.
27. 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.
28. Li C, Li Y, Liu H, Sun Z, Lu J, Zhao Y. Glucocorticoid repression of human with-no-lysine (K) kinase-4 gene expression is mediated by the negative response elements in the promoter. Journal of molecular endocrinology;40:3–12, 2008.
29. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. Cell 104: 545–556, 2001.
30. Lin DH, Yue P, Rinehart J, Sun P, Wang Z, Lifton R, Wang WH. Protein phosphatase 1 modulates the inhibitory effect of With-no-Lysine kinase 4 on ROMK channels. Am J Physiol Renal Physiol Jul 1;303(1):F110-9, 2012.
31. Maruyama J, Kobayashi Y, Umeda T, Vandewalle A, Takeda K, Ichijo H, Naguro I. Osmotic stress induces the phosphorylation of WNK4 Ser575 via the p38MAPK-MK pathway. Nature/Scientific Reports | 6:18710 | DOI: 10.1038/srep18710, 2016.
32. Mason JM, Arndt KM. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. Chembiochem;5:170–176, 2004.
33. Mayan H, Vered I, Mouallem M, Tzadok-Witkon M, Pauzner R, Farfel Z. Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. J Clin Endocrinol Metab 87: 3248–3254, 2002.
34. Melnikov S, Mayan H, Uchida S, Holtzman EJ, Farfel Z: Cyclosporine metabolic side effects: Association with the wnk4 system. European journal of clinical investigation 41:1113-20, 2011.
35. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. Kidney Int Suppl. Dec;52:S63-9, 1995.
36. Mu SY, Shimosawa T, Ogura S, Wang H, Uetake Y, Kawakami-Mori F, Marumo T, Yatomi Y, Geller DS, Tanaka H, Fujita T. Epigenetic modulation of the renal β-adrenergic–WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. Nature Medicine Vol 17, N 5, May 2011.
37. Naguro I, Umeda T, Kobayashi Y, Maruyama J, Hattori K, Shimizu Y, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Uchida S, Vandewalle A, Noguchi T, Nishitoh H,Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. ASK3

responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. Nat. Commun. 3, 1285, 2012.

38. Ni YG, Berenji K; Wang N, Oh M, Nita Sachan N, Dey A et al. Foxo Transcription Factors Blunt Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Calcineurin Signaling. Circulation 114:1159-68, 2006.
39. O'Reilly M, Marshall E, Speirs HJ, Brown RW. WNK1, a Gene within a Novel Blood Pressure Control Pathway, Tissue-Specifically Generates Radically Different Isoforms with and without a Kinase Domain. J Am Soc Nephrol;14:2447–2456, 2003.
40. Ohta A, Schumacher FR, Mehellou Y et al. The CUL3–KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms: disease-causing mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction. Biochem J; 451: 111–122, 2013.
41. Rao A, Luo C, Hogan PG.. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function; Annu Rev Immunol 15:707-47, 1997.
42. Richardson C & Alessi DR.The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. Journal of Cell Science 121, 3293-3304, 2008.
43. Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. J Biol Chem 275:8719–25, 2000.
44. Rozansky DJ, Cornwall T, Subramanya AR, Rogers S, Yang YF, David LL, Zhu X, Yang CL, Ellison DH. Aldosterone mediates activation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. J Clin Invest;119:2601–2612, 2009.
45. San Cristobal P, De Los Heros P, Ponce-Coria J, Moreno E, Gamba G. WNK kinases, renal ion transport and hypertension. Am J Nephrol 28:860–870, 2008.
46. Sandberg MB, Maunsbach AB, McDonough AA. Redistribution of distal tubule Na+-Clcotransporter (NCC) in response to a high-salt diet. Am J Physiol Renal Physiol;291:F503–508, 2006.
47. Shibata S, Arroyo JP, Castañeda-Bueno M, Puthumana J, Zhang J, Uchida S, Stone KL, Lam TT, Lifton RP. Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch like 3, preventing WNK4 degradation. Proc Natl Acad Sci USA. Oct 28;111(43):15556-61, 2014.
48. 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 USA. May 7;110(19):7838-43, 2013.
49. Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Calcineurin inhibitors block sodium-chloride cotransporter dephosphorylation in response to high potassium intake. Kidney Int. Feb;91(2):402-411, 2017.
50. 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.
51. Subramanya AR, Yang CL, Zhu X, Ellison DH. Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. Am J Physiol Renal Physiol 290: F619–F624, 2006.
52. Sun ZJ, Li Y, Li YH, Zhang JS, Ding Q, Li-Ling J, Liang Y, Zhao YY: Regulation of wnk4 gene transcription in the kidneys. Genet Mol Res 12(3):2332-4, 2013.
53. Susa K, Sohara E, Rai T et al. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. Hum Mol Genet; 23: 5052–5060, 2014.
54. Uchida S, Sohara E, Rai T et al. Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins. Biol Cell; 106: 45–56, 2014.
55. Vallon V, Schroth J, Lang F, Kuhl D and Uchida S. Expression and phosphorylation of the Na+-Cl- cotransporter NCC in vivo is regulated by dietary salt, potassium, and SGK1. Am J Physiol Renal Physiol 297(3): F704-12, 2009.
56. Velázquez H, Bartiss A, Bernstein PL, Ellison DH. Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by the rat renal distal tubule. Am J Physiol;270:F211–F219, 1996.

57. Verissimo F, Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. Oncogene;20:5562–5569, 2001.
58. Vitari AC, Deak M, Collins BJ, Morrice N, Prescott AR, PhelanA, Humphreys S, Alessi DR WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. Biochem J 378:257–268, 2004.
59. 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.
60. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara 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.
61. Wang L, Peng JB. Phosphorylation of KLHL3 at serine 433 impairs its interaction with the acidic motif of WNK4: a molecular dynamics study. Protein Sci. Feb;26(2):163-173, 2017.
62. Wenger RM. Synthesis of cyclosporine and analogues: structural requirements for immunosuppressive activity. Angew Chemie. 24:77–85, 1985.
63. Wilson FH, Disse-Nicode`me 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. Aug 10;293(5532):1107-12, 2001.
64. 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 mutantWNK4. ProcNatl Acad Sci USA 100: 680–684, 2003.
65. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH. WNK1, a Novel Mammalian Serine/Threonine Protein Kinase Lacking the Catalytic Lysine in Subdomain II. The Journal of Biol. Chemistry. Vol. 275, No. 22, Issue of June 2, pp. 16795–16801, 2000.
66. Xu B, Lee B, Min X, Lenertz L , Heise CJ, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobbi MH. WNK1: analysis of protein kinase structure, downstream targets, and potential roles in hypertension. Cell Research, 15(1):6-10, Jan 2005.
67. Xu B, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ and Cobb MC. Regulation of WNK1 by an Autoinhibitory Domain and Autophosphorylation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 277, No. 50, Issue of December 13, pp. 48456–48462, 2002.
68. Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH: WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. J Clin Invest 111: 1039–1045, 2003.
69. 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.
70. Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, Ellison DH. Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. J Clin Invest 115: 1379–1387, 2005.
71. Yoshizaki Y, Mori Y, Tsuzaki Y, Mori T, Nomura N, Wakabayashi M, Takahashi D, Zeniya M, Kikuchi E, Araki Y, Ando F, Isobe K, Nishida H, Ohta A, Susa K, Inoue Y, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S, Sohara E. Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3. Biochemical and Biophysical Research Communications 467 229e234, 2015.