MICHELLE SOUSA AGOSTINHO

EFEITO DO FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS (NFAT) SOBRE O CONTROLE DA EXPRESSÃO DE WITH NO LYSINE KINASE 4 (WNK4) 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 FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS (NFAT) SOBRE O CONTROLE DA EXPRESSÃO DE WITH NO LYSINE KINASE 4 (WNK4) 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 fator nuclear de células T ativadas (NFAT) sobre o controle da expressão de With no Lysine Kinase 4 (WNK4) 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 corrigida.

São Paulo 2018

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar como a expressão de WNK4 (With No Lysine Kinase 4) é modulada por NFAT através da modulação por AnglI (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 assim o co-transportador sódiocloreto (NCC), aumentando a reabsorção de sódio, cloreto e água. A descoberta de que mutações no gene de WNK4 geravam um guadro de hipertensão, hipercalemia e hipercalciúria, 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 AnglI é capaz de aumentar a atividade do NFAT, porém ainda não se sabe qual o papel do NFAT sobre a regulação de WNK4 e como AnglI e CsA podem modular a transcrição gênica de WNK4. Através dos métodos de western blotting verificamos que CsA aumenta o conteúdo de WNK4. Por RT-PCR observamos que AnglI e CsA são capazes de aumentar significativamente o mRNA-WNK4 após 24h de incubação. Utilizando um vetor com promotor de luciferase contendo elementos consensuais para NFAT, observamos que AnglI aumenta a 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 AnglI 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 atividade promotora do gene de WNK4. Assim, concluímos que Angll e CsA são capazes de modular a atividade promotora do gene WNK4, porém o efeito de AnglI parece ser independente de NFAT.

Palavras chave: promotor de WNK4, NFAT, Angiotensina II, ciclosporina A.

ABSTRACT

This work aimed to understand how WNK4 expression is modulated by NFAT through AnglI 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 Angll can modulate this pathway. Genetic mapping studies showed that mutations in WNK gene lead to a hypertension, hyperkalemia and hypercalciuria 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. Angll is able to increases NFAT activity, but it is still unclear how NFAT may modulate WNK4 gene expression. We show, by western blotting technique, that CsA increased WNK4 expression, but Angll had no significant effect. After 24h, Angll and CsA increased mRNA-WNK4 by RT-PCR. Using luciferase assay, we observed that AnglI increases NFAT activity and CsA decreases NFAT activity, both significantly. Angll 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 AnglI and CsA increase WNK4 expression. We made a mapping of genome sites for NFAT binding at WNK4 promoter and we identified four NFAT binding elements. 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 modulate the WNK4 promotor gene activity and this effect is probably independent of NFAT.

Key words: WNK4 promoter gene, NFAT, angiotensin II, cyclosporine A.

1 INTRODUÇÃO

No ano 2000, Melanie Cobb e seus colaboradores¹, 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 cinases de WNKs – <u>With no lysine(K) kinases</u> – 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 órgãos, 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,

¹ The University of Texas Southwesten Medical Center, Dallas, Texas

Richard P. Lifton e seus colaboradores² 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 nossa revisão de literatura na WNK1 e na WNK4.

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 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 (K223) 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. A modulação deste 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 acttatcctg -541 gggagtacac acccatteec tatgeagace agagggaeaa eaacgteaga eettteeaet -481 AP-2 gaceteteeg tteggeetgg ggetacteeg gacagttagg agggggtggt getgeettat -421 $AP = 2\alpha$ ctggggtgtg caggagggtg gtagcctccc cctaagtaat cccccactag ggtccgggtg -361 tcgttetete etgeceteet eegedeacaa acaggtttge teactettag tgegggagga -301 C/EBP GR2 tgctccgcgg tctcdcactc agttdtggcc tcagagtgag actgcggccg ggggctcggg -241 aaagaagggg acgcggct $\frac{1}{SP-1}$ gcggggcggt gactaaggtg aggggctgct cgcgggatcc -181 gcaccgcggg agcagctcgg aggggggcggcc ctgggggggca agggcgggcc gcggggcggc -121gacgggggcg gggccaggcc gagctggggg ctggggccgc agccgctcag ccggagcgca -61gcgcacccag cgagtccgtc tgtcaggccg cetectetec ggccgtetga ttttetacce -1 ttcggcgccc tgctcttcct catgttggca tccccggcca cggagaccac cgtcctcatg +60 S P A ТЕ Т MLA Т V L M teccagaetg aggeegaeet ggeeetgegg ecceegeete etettggeae egeggggeag +120 SQT EADL ALR Ρ P P P L G Т А G

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 Importância das WNKs no manejo do potássio em néfron distal

1.3.1 Manejo dos eletrólitos em néfron distal

Fisiologicamente, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) age aumentando a reabsorção de sódio durante situações de hipovolemia e secreção de potássio durante situações de hipercalemia. Assim, tem sido estabelecido que angiotensina II (AngII) primariamente aumenta a reabsorção de sódio no túbulo proximal, enquanto que a aldosterona estimula a reabsorção de sódio e secreção de potássio nas porções distais do néfron. Essa região é também conhecida como "néfron sensível à aldosterona" e compreende o túbulo convoluto distal (TCD) túbulo de conexão e ducto coletor (DC). (Meneton P, et al. 2004)

No túbulo próximal, AngII modula a reabsorção de sódio através do cotransportador sódio-hidrogênio do tipo 3 (NHE3) (Saccomani G, et al. 1990), enquanto que no néfron distal, foi demonstrado que o cotransportador sódio cloreto (NCC) – localizado principalmente no primeiro segmento do TCD; o canal epitelial de sódio (ENaC) – expresso principalmente no segmento mais distal do TCD, túbulo de conexão e DC – e o canal para potássio (ROMK – *Renal Outer Medullary Potassium Channel*) – expresso ao longo de todo o néfron distal – são sensíveis à aldosterona. (Kim GH, et al. 1998; Masilamani S, et al. 1999; Beesley AH, et al. 1998; Wald H, et al 1998)

Por outro lado, o aumento da ingesta de K⁺ também aumenta a secreção de aldosterona pela glândula adrenal. (Müller J. 1998). Embora o processamento de eletrólitos seja significativamente diferente na situação de contração de volume (hipovolemia) – com ou sem alteração da concentração plasmática de potássio – quando comparado com a situação de hipercalemia, os níveis circulantes de aldosterona não são expressivamente diferentes nestas situações. Assim, este "contrassenso" recebeu o nome de "paradoxo da aldosterona" e, embora tenham tido grandes avanços, ainda não é completamente compreendido. (Arroyo et al., 2011)

Em resumo, durante a hipovolemia, a reabsorção de Na⁺ é particularmente aumentada no túbulo convoluto distal (TCD), onde a reabsorção de Na⁺ não é eletrogênica e não está associada à secreção de K⁺. Em contraste, na

hipercalemia a reabsorção de Na⁺ é eletrogênica e ocorre principalmente no segmento de conexão e ducto coletor cortical (DCC) e observa-se aumento da secreção de K⁺ sem afetar a excreção urinária de Na⁺. (Vallon et al., 2009) Tem sido demonstrado que AngII parece ser responsável pelas adaptações finais nos segmentos distais do néfron, possibilitando a retenção de Na⁺ e de volume necessárias em estados hipovolêmicos, sem a perda de K⁺, o que seria inevitável se a aldosterona fosse o único modulador do balanço de eletrólitos em néfron distal (Arroyo et al., 2011). A figura 05 mostra um esquema resumindo os efeitos da aldosterona durante a hipovolemia e hipercalemia.



Figura 05 – Efeitos antagônicos da aldosterona durante a hipovolemia e hipercalemia (o "paradoxo da aldosterona"). Durante a hipovolemia (figura à esquerda) angiotensina II (AngII) e a aldosterona agem sinergicamente para aumentar a atividade do cotranportador NCC e do canal epitelial de sódio ENaC, enquanto que a AngII inibe o canal para potássio ROMK. O resultado é uma reabsorção máxima de sódio para a correção da hipovolemia, com conservação do potássio. Já na figura da direita, a hipercalemia aumenta diretamente a secreção de aldosterona independente de renina e de AngII. Devido à ausência de efeitos diretos da AngII associados aos efeitos da hipercalemia, o NCC está menos ativo e o ROMK menos inibido. Em adição, ROMK e ENaC estão maximamente ativos pelo efeito direto da aldosterona. Estes efeitos combinados resultam em um transporte de sódio maior

pelos canais ENaC e consequente facilitação da secreção de potássio através dos canais ROMK. As setas indicam os efeitos estimulatórios, enquanto que duas retas perpendiculares indicam efeitos inibitórios. (Adaptado de Van der Lubbe et al., 2013).

Grandes evidências apontam a WNK4 como a molécula responsável pela comutação do néfron distal entre poupador e secretor de potássio, sendo denominada por alguns autores de "*molecular switch*", ou "interruptor molecular" na tradução livre. Os mecanismos relacionados à regulação das WNKs e como a WNK4 pode agir como "interruptor molecular" na comutação entre o néfron poupador e secretor de potássio serão explanados no texto abaixo.

1.3.2 Evidências que as WNKs modulem o transporte de eletrólitos no néfron distal

Está claro que há uma relação entre a reabsorção de Na⁺ e a secreção de K⁺ no néfron distal, onde a secreção de K⁺ é favorecida pela reabsorção de Na⁺. Além disso, a presença de canais para potássio de alta condutância ativados por cálcio (canais BK ou maxi K) no túbulo de conexão também favorece uma elevada secreção de K⁺ quando o fluido intratubular está aumentado. (Pluznick JL & Sansom SC; 2006). Assim, a alta disponibilidade de Na⁺ no TD favorece a reabsorção de Na+ via ENaC com subsequente secreção de K⁺ via canais para potássio (ROMK e/ou BK).

Clinicamente, a relação entre o fluido tubular e a presença de sódio em associação com a secreção de potássio em néfron distal é claramente evidenciada quando se observa os fenótipos apresentados por pacientes que apresentam mutações que podem levar à perda ou ao aumento da função de transportadores de sódio. Por exemplo, a síndrome de Bartter do tipo 1 é causada por mutações que levam à perda da função do NKCC2 (Simon DB, et al., 1996a) enquanto que a síndrome de Gilteman e causada por mutações que levam à perda da função no NCC (Simon DB, et al., 1996b); ambas culminam com um quadro de hipotensão e alcalose metabólica. Por outro lado, mutações que levam a perda da função do ENaC – denominadas de Pseudohipoaldosteronismo do tipo I (PAHI) – estão

associadas com hipotensão e hipercalemia, devido à diminuição da troca de Na⁺ por K⁺ (Schafer JA, 2002).

Em contraste, nas mutações levando ao aumento da atividade do NCC – síndrome de Gordon ou Pseudohipoaldosteronismo do tipo II (PAHII) – é observado um fenótipo de hipertensão e como há diminuição da disponibilidade de Na⁺ em néfron distal, a reabsorção de Na⁺ e consequentemente a secreção de K⁺ estarão diminuídas, levando à hipercalemia (Mayan H, et al., 2002). Finalmente, na síndrome de Liddle, onde ocorrem mutações com aumento da atividade do ENaC, observa-se hipertensão e hipocalemia (Hansson JH et al., 1995). A Tabela 01 resume as características destas síndromes no tocante ao status da função dos principais transportadores de sódio, à concentração plasmática de potássio e à pressão arterial dos pacientes.

	Alvo	Efeito da	Potássio	Status	Pressão
	mutação	mutação	plasmático	ácido-	arterial
				básico	
Síndrome de Bartter	NKCC2	Perda da	Baixo	Alcalose	Hipotensão
(tipo 1)		função		metabólica	
Síndrome de Gilteman	NCC	Perda da	Baixo	Alcalose	Hipotensão
		função		metabólica	
PAHI	ENaC	Perda da	Alto	Acidose	Hipotensão
		função		metabólica	
Síndrome de Gordon ou	NCC	Aumento da	Alto	Acidose	Hipertensão
PAHII		função		metabólica	
Síndrome de Liddle	ENaC	Aumento da	Baixo	Alcalose	Hipertensão
		função		metabólica	

Tabela 01 – Resumo das características observadas em pacientes com mutações nos transportadores de sódio do néfron distal.

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). 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.

1.3.3 WNKs modulam os transportadores de eletrólitos no néfron distal

A atividade do NCC é regulada principalmente pelos mecanismos que modulam o conteúdo da proteína na célula (Abdallah e al., 2001) e o tráfego 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. A figura 06 é um esquema da estrutura molecular de SPAK e OSR1, a qual evidencia, dentre outros detalhes, os sítios de fosforilação por WNK1 e WNK4, tanto ativadores como inibidores.



Figura 06 – 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 tráfego 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 tráfego 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 tráfego 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. A figura 07 traz a representação deste mecanismo de forma mais detalhada.

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 Ca²⁺, levando assim à calciúria.



Figura 07 – Esquema ilustrando o papel da KS-WNK1 (*kidney-specific with no lysine kinase* 1) na ativação de WNK4. À esquerda: na ausência de KS-WNK1, dímeros de WNK4-WNK4 apresentam alta sensibilidade ao cloreto, o qual se liga na WNK4 em um sítio para cloreto no domínio catalítico, assim prevenindo a autofosforilação e consequente ativação de WNK4. À direita: na presença de KS-WNK1, WNK4 é capaz de formar dímeros com a KS-WNK1, esta última obviamente não se liga ao cloreto devido à ausência de domínio kinase. O resultado é a formação de um heterodímero KS-WNK1-WNK4 insensível ao cloreto, possibilitando a fosforilação de WNK4 e assim aumento da atividade sobre as cinases da família STE20 e finalmente, modulação da atividade dos cotransportadores de Na+ e CI- (SPAK-NCC). (Argaiz et al., 2018)

1.3.4 WNKs são reguladas por diversos mecanismos

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).

Como comentado, a comutação da reabsorção de Na⁺ de TCD para DCC depende de WNKs, de SGK e também de PP1 (*phosphatase protein 1*). Foi também 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 08).



Figura 08 – Esquema ilustrando o papel da fosfatase serine/treonina PP1 atuando sobre WNK4 no resíduo de aminoácidos 695-699, mediando os efeitos da c-Src na interação WNK4-SGK1. Seta contínua e pontilhada representam ativação e inibição, respectivamente. Em cinza, representa que a via está inbida. (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 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 09).



Figura 09 – 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 10), 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 10 – 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 11), 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 11 – 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 12).

Na continuação deste trabalho, Shibata et al (2014) demonstraram que a AnglI 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 (figura 13). 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 12 – Mapa de sítios de fosforilação da KLHL3. Em vermelho está destacada a mutação sofrida na S433 no PAHII (Shibata et al., 2014).



Figura 13 – 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 (*phosphatidylinosiltol 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 14). 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 14 – Modelo esquemático da cascata de sinalização de fosforilação de WNK4 na S575. Quando as células são expostas ao estresse osmótico, a fosforilação de WNK4 na S575 é aumentada via p38MAPK-MK. ASK3 é necessária para a ativação de p38MAPK induzida por estimulação hipotônica. Já quando o estímulo é por estresse hipertônico ou estimulação hipotônica com baixo cloreto, outras MAP3K podem estar envolvidas na ativação de p38MAPK. Entretanto, a função específica da fosforilação da S575 ainda permanece desconhecida e os resultados deste trabalho sugerem que a ativação da via p38MAPK-MK pode regular WNK4 de forma dependente de estresse osmótico. (Maruyama et al., 2016)

Todos esses achados mostram como o controle da atividade das WNKs é bastante complexo e, além disso, as diversas ações sobre os transportadores de eletrólitos ao longo do néfron evidenciam a importância desta família de proteínas no controle da homeostase hidrossalina e da pressão arterial de mamíferos. Já foi dito que AngII parece ser o mediador responsável pelo ajuste final do manejo dos eletrólitos no néfron distal em situações de hipovolemia e de hipercalemia e que WNK4 parece ser o "interruptor molecular" capaz de tornar o néfron distal poupador ou secretor de potássio. Esta hipótese é suportada pelo fato de ter sido observado que WNK4 é capaz de inibir o NCC e este efeito é perdido quando há eliminação do domínio catalítico ou quando ocorrem mutações do PAHII. (Yang CL et al., 2003) Isso sugere que em certas circunstâncias, WNK4 seja um inibidor de NCC e em outras, um ativador.

Por outro lado, WNK4 inibe a atividade de ROMK, porém o este efeito inibitório é aumentado quando WNK4 sofre mutação no PHAII. (Kahle KT et al., 2003) Fato semelhante acontece com as claudinas, WNK4 aumenta a atividade e a fosforilação das claudinas, porém em situações de mutação de WNK4 (como no PHAII) este efeito é aumentado. (Kahle KT et al., 2004) Em resumo, enquanto as consequências de mutações em WNK4 vistas no PHAII culminam com a perda da função sobre o NCC e ENAC, efeito contrário é visto em relação às claudinas e ao ROMK, onde ocorre aumento da função. Sabe-se que os sintomas do PHAII são controlados quando há redução da atividade do NCC: tanto quando pacientes humanos são tratados com diuréticos tiazídicos (Mayan H et al., 2002), como quando se observa completa remissão dos sintomas em camundongos oriundos de cruzamento entre camundongos com PHAII e camundongos NCC-*null* (ou seja, sem NCC), mesmo em condições de lata ingesta de potássio. (Lalioti MD et al., 2006)

Estes resultados reforçam a relevância do efeito da atividade do NCC na modulação da secreção de K⁺ no néfron distal sensível à aldosterona. Assim, em resumo observa-se que WNK4 apresenta três diferentes status funcionais (Figura 15): 1 – no status basal, no qual WNK4 inibe NCC, ENaC e ROMK; 2 – quando WNK4 sofre mutações no PHAII, situação na qual há perda de inibição do NCC e do ENaC (levando assim ao aumento da reabsorção de Na⁺ e consequente hipertensão) em adição ocorre o aumento da atividade inibitória sobre ROMK (diminuindo a secreção de K⁺, causando hipercalemia) e 3 – observado durante a

hipercalemia (situação na qual há aumento da secreção de aldosterona e sinalização por SGK1) onde WNK4 não sofre mutação, assim a inibição sobre o NCC e ENaC estão preservadas (além disso, o segmento inicial do TCD é insensível à aldosterona), isso aumenta a oferta de Na⁺ nos segmentos mais distais do néfron, o qual é reabsorvido paralelamente à secreção de K⁺. Adicionalmente, a fosforilação de WNK4 em S1169 por SGK1, "libera" WNK4 do status inibitório sobre ENaC e ROMK, aumentando assim a atividade destes dois canais, culminando com aumento da troca Na⁺/K⁺. (Arroyo, et al., 2011)



Figura 15 – Em situações basais no néfron distal, WNK4 age como inibidor de NCC, ENaC e ROMK. Durante condições de hipovolemia (onde há altos níveis de AngII e de aldosterona) e na condição do PHAII, WNK4 inibe ROMK ao longo do néfron distal, mas aumenta a atividade do NCC no TCD1 e 2 e do ENaC no néfron distal sensível à aldosterona. Já durante a hipercalemia, WNK4 inibe tanto NCC quanto ROMK no TCD1 (favorecendo a oferta de Na⁺ nos segmentos distais do néfron) e deixa de inibir ENaC e ROMK no néfron distal sensível à aldosterona, favorecendo a reabsorção de Na⁺ e secreção de K⁺. (Arroyo et al., 2011)

1.3.5 Evidências que a via Calcineurina/NFAT module WNK4

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 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 (figura 16). 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

Ca²⁺ TRPV5 (*Transient Receptor Potential Vanilloid*) em néfron distal e aumento da quantidade das proteínas WNK3, WNK4 e SPAK.



Figura 16 – Efeito da ciclosporina (CsA) sobre o mRNA e o conteúdo de proteína WNK4 e do NCC em células endógenas de TCD. (b + c) Estudo dose-dependente da CsA depois de 16h de incubação. (b) *western* usando anticorpos anti-WNK4, anti-NCC, anti-PKCa e anti-tubulina com aumento da concentração de CsA de 10nM até 30µM. (c) Análise do *western blotting* por densitometria. Os níveis de proteína de WNK4 e NCC foram normalizados pelos níveis de tubulina. (d + e) análise temporal do conteúdo de WNK4 e NCC em células de TCD expostas à 3µM de CsA por até 32h. (d) *western blotting* usando os mesmo anticorpos mostrando que não houve mudança nas bandas de PKCa, enquanto que houve aumento nas bandas de WNK4 e NCC ao longo do tempo. (e) Análise do *western blotting* por densitometria. Os níveis de proteína de WNK4 e NCC foram normalizados pelos níveis de tubulina. (d + e) análise temporal do conteúdo de bando os mesmo anticorpos mostrando que não houve mudança nas bandas de PKCa, enquanto que houve aumento nas bandas de WNK4 e NCC ao longo do tempo. (e) Análise do *western blotting* por densitometria. Os níveis de proteína de WNK4 e NCC foram normalizados pelos níveis de tubulina. (Melnicov et al., 2011)

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.

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. Esta é a hipótese do nosso trabalho e iremos tentar esclarecer se a AngII e a CsA são capazes de modular a expressão gênica de WNK4 e se este mecanismo é dependente da via de calcineurina/NFAT.

3 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 modula a atividade promotora de WNK4 e este efeito parece ser dependente 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 pressupor que o efeito estimulador de CsA sobre a síntese proteica de WNK4 parece ser independente de NFAT, porém mais estudos são necessários para esclarecer o papel da CsA na modulação da transcrição gênica de WNK4.

Os achados deste trabalho trazem perspectivas interessantes de como a via calcineurina/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. Concluímos assim que a via calcineurina/NFAT parece estar sim envolvida na síntese proteica de WNK4 e mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo pela qual a AngII e a CsA atuam nesta via.

4 Referências Bibliográficas

- 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.
- 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.
- 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+CI- cotransporter by with-no-lysine kinase 4. Curr Opin Nephrol Hypertens. Sep;25(5):417-23, 2016.
- 5. Arroyo JP, Ronzaud C, Lagnaz D, Staub O, Gamba G. Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. Physiology (Bethesda). Apr;26(2):115-23, 2011.
- 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.
- 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.
- Beesley AH, Hornby D, White SJ. Regulation of distal nephron Kb channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney. J Physiol; 509 (Pt 3):629–634, 1998.
- 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.
- Bossemeyer D.The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element.). Trends Biochem Sci., 19, 201 ± 205, 1994.
- 11. 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.
- 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.
- 13. 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain. BMC Cell Biology, 12:43, 2011.
- 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.
- Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel c subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. Nat Genet; 11: 76– 82,1995.
- 21. 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.
- 22. 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.
- 23. 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.
- Ishizawa K1, Xu N2, Loffing J3, Lifton RP4, Fujita T5, Uchida S1, Shibata S. Potassium depletion stimulates Na-CI cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3. Biochem Biophys Res Commun. Nov;480(4):745-751, 2016.
- 25. Ji AX, Prive GG. Crystal structure of KLHL3 in complex with Cullin3. PLos One 8: e60445, 2013.
- Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS, Lifton RP. WNK4 regulates apical and basolateral CI- flux in extrarenal epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A;101:2064–2069, 2004.
- Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS, Lifton RP. WNK4 regulates apical and basolateral CI flux in extrarenal epithelia. Proc Natl Acad Sci USA 101: 2064–2069, 2004.

- Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC, Lifton RP. WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K secretion. Nat Genet 35: 372– 376, 2003.
- 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.
- Kim GH, Masilamani S, Turner R, et al. The thiazide-sensitive Na–Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. Proc Natl Acad Sci USA; 95:14552–14557, 1998.
- 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.
- 32. 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.
- 33. 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.
- 34. 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.
- 35. 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.
- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. Cell 104: 545–556, 2001.
- 37. 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.
- 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.
- Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, et al. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. J Clin Invest; 104:R19–R23, 1999.
- 40. Mason JM, Arndt KM. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. Chembiochem;5:170–176, 2004.
- 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.

- 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.
- 43. 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.
- Meneton P, Loffing J, Warnock DG. Sodium and potassium handling by the aldosteronesensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. Am J Physiol Renal Physiol; 287:F593–F601, 2004.
- 45. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. Kidney Int Suppl. Dec;52:S63-9, 1995.
- 46. 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.
- Müller J. Aldosterone: the minority hormone of the adrenal cortex. Am J Physiol; 275:F239– F245, 1998.
- 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.
- 49. 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.
- 50. 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.
- 51. 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.
- Pluznick JL, Sansom SC. BK channels in the kidney: role in K secretion and localization of molecular components. Am J Physiol Renal Physiol 291: F517–F529, 2006.
- 53. Rao A, Luo C, Hogan PG.. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function; Annu Rev Immunol 15:707-47, 1997.
- 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.
- 55. 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.
- 56. 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.

- 57. Saccomani G, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin II stimulation of Naþ-Hþ exchange in proximal tubule cells. Am J Physiol; 258:F1188–F1195, 1990.
- 58. 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.
- 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.
- 60. Schafer JA. Abnormal regulation of ENaC: syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct. Am J Physiol Renal Physiol 283: F221–F235, 2002.
- 61. 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.
- 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.
- 63. 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.
- 64. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, Di Pietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. Nature Genetics 13: 183–188, 1996.(a)
- 65. Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet FE, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ, Lifton RP. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazidesensitive Na-Cl cotransporter. Nature Genetics 12: 24–30, 1996.(b)
- Subramanya AR, Liu J, Ellison DH, Wade JB, Welling PA. WNK4 Diverts the Thiazidesensitive NaCl Cotransporter to the Lysosome and Stimulates AP-3 Interaction. J Biol Chem;284:18471–18480, 2009.
- 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.
- 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.
- 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.
- 70. 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.
- 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.

- 72. Van der Lubbe N, Zietse R, Hoorn EJ. Effects of angiotensin II on kinase-mediated sodium and potassium transport in the distal nephron. Curr Opin Nephrol Hypertens. Jan;22(1):120-6, 2013.
- 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.
- 74. Verissimo F, Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. Oncogene;20:5562–5569, 2001.
- 75. 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.
- 76. 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.
- 77. 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.
- Wald H, Garty H, Palmer LG, Popovtzer MM. Differential regulation of ROMK expression in Steroids. Jan;60(1):2-9, 1995.
- 79. 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.
- 80. Wenger RM. Synthesis of cyclosporine and analogues: structural requirements for immunosuppressive activity. Angew Chemie. 24:77–85, 1985.
- 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.
- 82. 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.
- 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.
- 84. 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.
- 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.

- 86. Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH. WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. J Clin Invest 111: 1039–1045, 2003
- 87. 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.
- 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.
- 89. 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.