

Trasporto renale tubulare e forme genetiche di ipotensione

S.M. Viganò^{1,2}, V. Martina^{1,2}, L. Del Vecchio¹, D. Cusi¹

¹Università degli Studi di Milano, U.F. Ipertensione e Nefrologia Preventiva, Policlinico Multimedica, Sesto San Giovanni (MI)

²U.O. Nefrologia e Dialisi Pediatrica, Fondazione Osp. Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

Renal tubular transport and genetic hypotension

The progressive improvement of genetic research technologies has led to the identification of different genes involved in blood pressure regulation. Renal regulation systems of sodium homeostasis play a key role. Mutations capable of determining an increase or a decrease in carrier proteins function could cause not only hypotension or hypertension, but also the related metabolic symptoms and changes, and the possible response to pharmacologic treatment.

Monogenic forms of hyper- or hypotension are rare, though they highlight the importance of sodium tubular transport in blood pressure adjustment. (G Ital Nefrol 2006; 23: 396-405)

KEY WORDS: Salt-handling diseases, Bartter, Gitelman, Sodium tubular transport

PAROLE CHIAVE: Patologie sodio-disperdenti, Bartter, Gitelman, Trasporto tubulare del sodio

Introduzione

La regolazione della pressione arteriosa è un sistema complesso, di tipo multifattoriale e nonostante esistano ancora molte ombre sui meccanismi patogenetici che portano ad alterazioni dei valori pressori, nella maggior parte dei soggetti l'interazione tra fattori ambientali, dietetici e genetici gioca un ruolo prevalente. Come evidenziato da studi su gemelli o analisi di segregazione, i meccanismi genetici rendono conto da un terzo alla metà della variabilità interindividuale dei valori pressori (1). Studi di genetica nella popolazione generale vengono complicati dal fatto che geni diversi, molti ancora sconosciuti, influenzano i valori pressori del singolo individuo. Dal punto di vista quantitativo, inoltre, un determinato gene rende spesso conto solo di variazioni minime della pressione arteriosa ed è a sua volta in grado d'influenzare in modo diverso l'espressione di altri geni. Tale analisi è ulteriormente complicata dall'influenza, di grado variabile, di fattori demografici e ambientali.

Le forme monogeniche d'ipertensione arteriosa, caratterizzate spesso da un esordio precoce e da una modalità di trasmissione mendeliana, sono estremamente rare. Nonostante ciò, esse hanno assunto rinnovato interesse nell'ultimo decennio, grazie alla scoperta di singole mutazio-

ni responsabili delle diverse forme. La mutazione di un solo gene consente di determinare, da un lato l'entità dell'effetto pressorio legato ad esso, dall'altro di capire il funzionamento della proteina da esso codificata. Lo studio dei geni implicati in queste forme rare, combinato con quello di altre che determinano ipotensione, ha permesso d'identificare dei percorsi fisiologici fondamentali a carico del riassorbimento di acqua e sale a livello renale che, se alterati, influenzano il livello dei valori pressori. Punti chiave del meccanismo patogenetico si trovano in alterazioni a livello tubulare, dove avviene fisicamente il riassorbimento del sodio, ma anche in anomalie nella sintesi o regolazione degli ormoni regolatori, in primis l'adosterone, o di altri ormoni surrenalici che in condizioni patologiche ne attivano il recettore.

Regolazione fisiologica dell'omeostasi del sodio

L'omeostasi del sodio ha un ruolo cruciale nel determinare i livelli di pressione arteriosa. L'importanza di tale regolazione è testimoniata dalle forme monogeniche di alterazioni

della pressione arteriosa: le mutazioni dei geni implicati possono determinare sia un aumento che una riduzione dell'attività di singoli trasportatori del sodio lungo il tubulo renale o un'alterazione nella loro regolazione; la sede e la funzione di questi trasportatori condiziona non solo la comparsa d'ipertensione e la gravità di queste, ma anche dei sintomi e delle alterazioni metaboliche ad esse correlate, e la eventuale risposta ad un determinato diuretico.

L'organismo umano mantiene la concentrazione del sodio in un *range* molto stretto, bilanciando con precisione quantità estremamente variabili di apporto dietetico di sale con la quantità escreta. La regolazione di questo equilibrio avviene principalmente a livello renale (Fig. 1), dove circa il 98% della quantità di acqua e sodio filtrate vengono riassorbite a livello tubulare. Il 50-70% degli ioni sodio viene riassorbita a livello del tubulo contorto prossimale in modo iso-osmotico. In questo segmento, il riassorbimento è determinato dall'attività dello scambiatore Na^+/H^+ , e dei cotrasportatori $\text{Na}^+/\text{glucosio}$ e $\text{Na}^+/\text{aminoacidi}$. Ciò è reso possibile grazie all'attività della Na^+/K^+ ATPasi a livello basolaterale della cellula epiteliale, che fornisce l'energia per il trasporto del sodio nell'interstizio.

La parte spessa del tratto ascendente dell'ansa di Henle è responsabile di circa il 15-20% del riassorbimento sodico, qui in eccesso rispetto al quantitativo di acqua riassorbito. La Na^+/K^+ ATPasi a livello basolaterale della cellula epiteliale mantiene una bassa concentrazione di sodio all'interno della cellula, che richiama lo ione attraverso il trasportatore luminale $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2), sito di azione dei diuretici dell'ansa.

Il tubulo contorto distale riassorbe dal 2 al 5% del carico filtrato di sodio. Qui il cloruro di sodio viene trasportato passivamente dal lume all'interno della cellula mediante un trasportatore Na^+/Cl^- (NCC), sito d'azione dei diuretici tiazidici. Anche in questo caso, il trasporto è mediato dal gradiente di concentrazione tra lume e comparto intracellulare, generato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi basolaterale.

A livello del dotto collettore, viene riassorbito solo il 1-2% del sodio filtrato, ma è proprio qui che avviene la regolazione fine dell'intero meccanismo. A questo livello le cellule epiteliali esprimono un canale del sodio sulla superficie luminale (ENaC) ed una pompa Na^+/K^+ basolaterale: il sodio entra nella cellula attraverso ENaC, sito d'azione di amiloride e triamterene, e viene trasportato nel liquido interstiziale dalla Na^+/K^+ ATPasi. Il trasporto del sodio genera un differenza di potenziale intraluminale negativa, determinante sia il riassorbimento di cloro per diffusione intercellulare, che la secrezione di potassio nel lume tubulare. Nonostante l'aldosterone sia il principale regolatore del riassorbimento tubulare di sodio, esso media il riassorbimento di non più del 2% del sodio filtrato.

Ciò non è marginale dal punto di vista quantitativo, considerando gli elevati volumi di acqua e sodio filtrati dal rene: questa minima percentuale corrisponde a circa 520 mmol (30 g) al giorno, da 3 a 5 volte la quantità di sodio

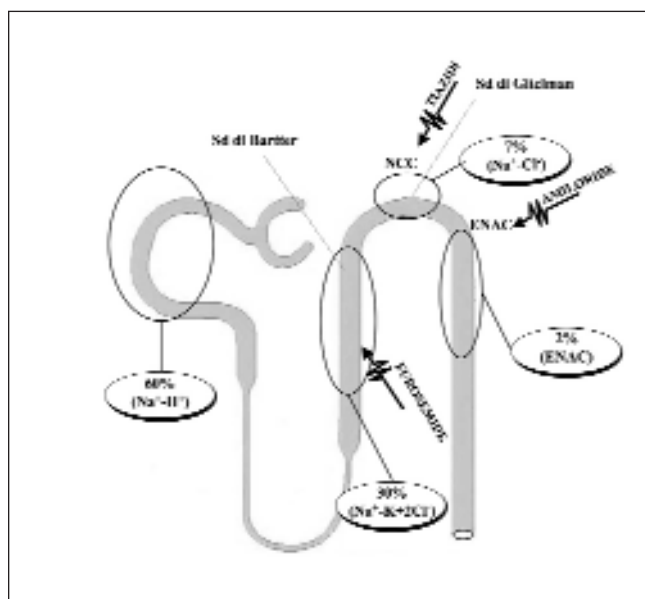


Fig. 1 - Sedi di regolazione del riassorbimento del sodio a livello renale.

oggi comunemente ingerita con la dieta. La sintesi di aldosterone è regolata principalmente dall'angiotensina II, oltre che dall'ACTH e dai livelli plasmatici di sodio e potassio. Come ben noto, l'angiotensina II è un potente vasocostrittore periferico, in grado di ridurre a livello renale il flusso plasmatico e contemporaneamente aumentare la pressione di filtrazione, grazie alla sua azione di vasocostrizione prevalente dell'arteriola efferente.

I livelli di angiotensina II sono a loro volta regolati dalla renina, secreta a livello dell'apparato iuxta-glomerulare renale in risposta a complicati meccanismi di regolazione mediati da variazioni pressorie. La secrezione di renina è inoltre stimolata dall'attività nervosa simpatica ed è inibita dall'angiotensina II, dall'ormone antidiuretico, da elevati livelli ematici di potassio e calcio e dalla concentrazione tubulare di sodio e cloro. Anche il peptide natriuretico atriale, stimolato da un aumento della pressione intracardiaca, interviene nell'omeostasi del sodio, sia aumentandone la filtrazione a livello glomerulare, che inibendone il riassorbimento tubulare. Esso riduce a sua volta la secrezione di renina ed il rilascio di aldosterone mediato dall'angiotensina II.

Le cellule epiteliali del dotto collettore corticale sono il *target* dell'aldosterone. A questo livello l'ormone si lega al recettore per i mineralcorticoidi e ne induce un'attivazione conformazionale, seguita dalla sua traslocazione nel nucleo e dalla successiva trascrizione di geni.

Ciò porta da un lato ad un aumento dell'espressione della Na^+/K^+ ATPasi e, mediante stimolazione della chinasi 1 dipendente dai glucocorticoidi e fosforilazione di Nedd4-2 (ligasi dell'ubiquitina, proteina intracellulare fondamentale nella degradazione proteica mediata da proteosomi e nell'individuazione di proteine di membrana che devono essere degradate all'interno dei lisosomi), ad un incremento del

numero di ENaC attivi sulla superficie luminale. Effetto finale di questa sequenza è l'aumento del riassorbimento tubulare del sodio.

Le patologie sodio-disperdenti: cenni storici

La prima descrizione di questo tipo di patologie avvenne nel 1957, quando due pediatri descrissero un bambino africano di 2 mesi affetto da alcalosi ipokaliemica congenita, ritardo di crescita, disidratazione ed ipostenuria, che morì a 7,5 mesi di età (2).

Successivamente, nel 1962, l'endocrinologo *Bartter* descrisse due pazienti afroamericani normotesi con iperaldosteronismo, iperplasia dell'apparato juxtaglomerulare, alcalosi metabolica ipokaliemica, iperreninemia e resistenza agli effetti pressori dell'angiotensina II (3).

Quattro anni dopo Gitelman (4) si focalizzò su alcuni adulti con sospetta sindrome di *Bartter* che presentavano importante astenia muscolare e dermatite cronica attribuite al deficit di potassio e di magnesio. Questi pazienti presentavano inoltre episodi di tetania anch'essi attribuibili ad ipomagnesemia ed ipokaliemia. Un'ulteriore esame delle urine di questi soggetti rivelò la presenza di bassi livelli di escrezione urinaria di calcio. Tale quadro venne denominato Sindrome di Gitelman.

Nel 1971 Fanconi e McCredie (5, 6) descrissero, in bambini con sospetta sindrome di *Bartter*, un quadro di nefrocalcinosi midollare associato ad elevata escrezione urinaria di calcio.

Negli anni '80 divennero sempre più frequenti le descrizioni di questa variante, soprattutto per il miglioramento della cura dei neonati pretermine in cui era nota una storia di *poli-idramnios* (7). In questi neonati veniva descritta, subito dopo la nascita, poliuria abbondante capace di

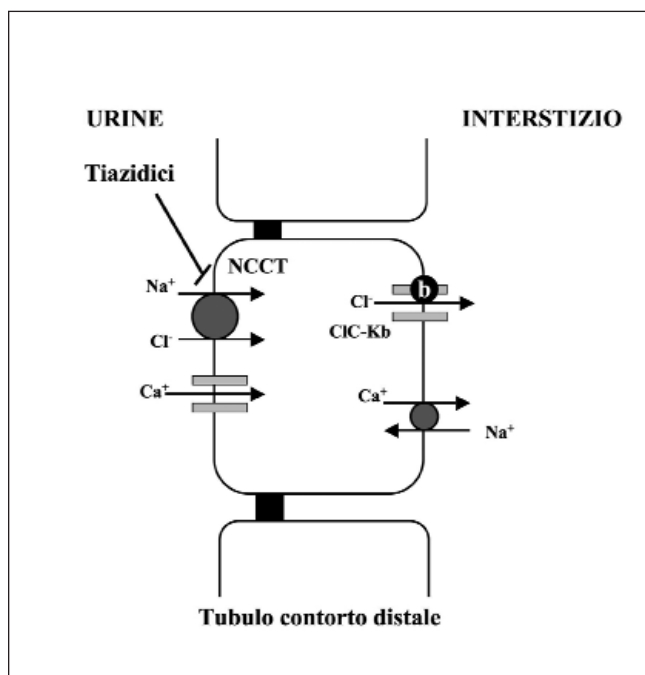


Fig. 2 - Meccanismi di riassorbimento di Na⁺Cl⁻ a livello del tubulo contorto distale. NCCT, co-trasportatore Na⁺Cl⁻; CIC-Kb, canale renale Cl⁻ Kb; b, sub-unità barttin del canale CIC-K Cl⁻.

determinare disidratazione. La riduzione del volume extracellulare si accompagnava ad un incremento della produzione renale ed extrarenale di PGE2. In questa forma antenatale di sindrome di *Bartter* (o sindrome da iperprostaglandina E) la somministrazione di inibitori della sintesi di PG migliorava la sintomatologia con riduzione di poliuria, ipokaliemia e ripresa della crescita (8).

È diventato nel tempo sempre più chiaro che sotto il nome di sindrome di *Bartter* è compreso un gruppo etero-

TABELLA I - GENI E PROTEINE COINVOLTE NELL'EZILOGIA DELLE TUBULOPATIE SODIO-DISPERDENTI EREDITARIE E LORO LOCALIZZAZIONE LUNGO IL NEFRONE

Gene	SLC12A1	KCNJ1	BSND	CLCNKA + CLCNKB	CLCNKB	SLC12A3
Prodotto del gene	NKCC2 (Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ - co-transporter)	ROMK (renal outer-medullary potassium channel)	Barttin	CIC-Ka + CIC-Kb (kidney chloride channel)	CIC-Kb (kidney chloride channel)	NCCT (Na-Cl co-transporter)
Patologia	<i>Bartter</i> antenatale	<i>Bartter</i> antenatale	<i>Bartter</i> antenatale+ sordità neurosensoriale		<i>Bartter</i>	Gitelman
Segmento tubulare coinvolto	Tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle	Tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle	Tratto sottile ascendente dell'ansa di Henle		Tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle/ tubulo contorto distale	Tubulo contorto distale
OMIM	600839	600359	606412	602024 e 603023	603023	600968

geneo di patologie caratterizzato da un disordine tubulare renale primitivo associato ad alcalosi metabolica ipokaliemica ed iperreninemia con normotensione. In presenza di segni e sintomi importanti quali *poli-idramnios*, poliuria e disidratazione (9) è possibile porre una diagnosi neonatale. Nella maggioranza dei casi, invece, la diagnosi viene fatta durante l'infanzia con la comparsa di crisi tetaniche o ritardo di crescita. Altri pazienti, completamente asintomatici, vengono diagnosticati durante l'adolescenza o l'età adulta in seguito all'esecuzione di esami di routine prescritti per altri motivi. Nonostante l'eterogeneità dei quadri di presentazione di questi disordini (10) è evidente un'origine genetica. Sono stati infatti osservati casi patologici in fratelli. L'incidenza in entrambi i sessi e la penetranza indicano che siamo in presenza di un gruppo di patologie a carattere autosomico recessivo.

Indagini genetiche

I miglioramenti che si sono avuti nella conoscenza dei meccanismi genetici alla base delle patologie sodio-dispendenti sono dovuti in gran parte al gruppo di Lifton (11-14), che durante diversi anni di ricerca è riuscito ad identificare le principali mutazioni genetiche, responsabili di alcalosi ipokaliemica, sodio-dispendenza ed ipotensione.

Altri gruppi hanno confermato questi risultati ed evidenziato una correlazione tra genotipo e fenotipo (Tab. I, (15-19)).

Sindrome di Gitelman

La sindrome di Gitelman è un disordine renale tubulare ereditario a carattere autosomico recessivo e, in alcune famiglie, pseudo-dominante, caratterizzato da alcalosi metabolica ipokaliemica in combinazione con ipomagnesemia e bassi livelli di calcio urinario (20, 21).

Un attraente gene candidato per la sindrome di Gitelman è quello codificante per il cotrasportatore Na-Cl sensibile ai diuretici tiazidici (Fig. 2), che è considerato il principale mediatore del riassorbimento di sodio e cloro nel tubulo contorto distale e determina una significativa parte del riassorbimento netto di sodio a livello renale (22-25).

Simon prendendo spunto dagli studi effettuati da Gamba (26, 27) su modelli animali sul cDNA codificante per il cotrasportatore Na-Cl, ha clonato l'omologo umano per tale proteina ed il difetto responsabile per tale sindrome è stato identificato con la perdita di funzione a carico del gene SLC12A3 (14, 26, 28).

Usando un metodo basato sulla PCR, Chang (29) ha isolato il cDNA codificante per il cotrasportatore Na-Cl umano sensibile ai tiazidici. L'analisi tramite *Northern Blot* ha rivelato che la proteina viene codificata principalmente a livello del rene, ma in piccola percentuale anche a livello di piccolo intestino, placenta, prostata, colon e milza. La

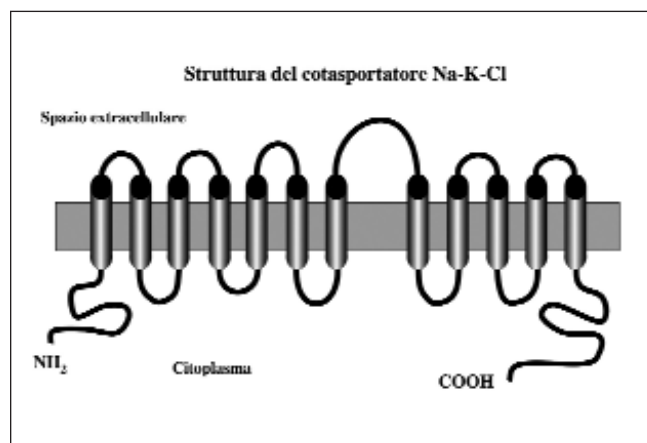


Fig. 3 - Struttura delle altre proteine appartenenti alla famiglia dei cotrasportatori Na-K-Cl.

sequenza proteica di 1,021 aminoacidi (112 kD) ha una struttura comune a quella delle altre proteine della famiglia dei cotrasportatori Na-K-Cl: 12 domini transmembrana e 2 sequenze intracellulari amino e carbossi-terminali (Fig. 3).

Il gene mappa sul cromosoma 16 (16q13) (18, 29).

La percentuale di eterozigoti per il gene SLC12A3 nella popolazione osservata era dell'1%. L'analisi dei figli di soggetti eterozigoti ha mostrato che 22 dei 33 soggetti studiati per tale gene erano affetti da sindrome di Gitelman, molto più di quanto previsto. Resta ancora da determinare se questi dati siano il risultato di un *bias* di selezione o di un'anomalia della segregazione (14).

Con il suo lavoro Simon ha identificato 17 diverse mutazioni a carico di 26 alleli mutanti del gene SLC12A3. Tre di queste sono state trovate in omozigosi, mentre la maggioranza si presenta in eterozigosi. Mutazioni missense sono state trovate in 13 di queste 17 varianti e tutte queste alterano dei residui che sono filogeneticamente molto conservati, tanto da ritrovarsi identiche nell'uomo e nella platessa (specie che si sono separate almeno 400 milioni di anni fa).

Nadia Mastroianni, tramite l'uso della PCR e della SSCP ha analizzato le mutazioni della sindrome di Gitelman. Ha descritto 12 mutazioni, nella popolazione italiana, responsabili della perdita di funzione del cotrasportatore Na-Cl. Ha inoltre descritto 2 mutazioni missense, R209W e P349L, già identificate da Simon oltre a 3 delezioni, 2 inserzioni e 6 diverse mutazioni missense, che sembrano essere più frequenti a livello dei domini intracellulari della molecola.

Uno studio recente (30) ha identificato la presenza di alcune mutazioni in pazienti con sindrome di Gitelman, ipotizzando che in condizioni di eterozigosi tali mutazioni siano protettive nei confronti dell'ipertensione e le ha ricercate in soggetti normotesi ed ipertesi, non trovandole in questi ultimi. Dall'analisi del genotipo nella popolazione è risultato che l'omozigosi per Gln904 è sovrarap-

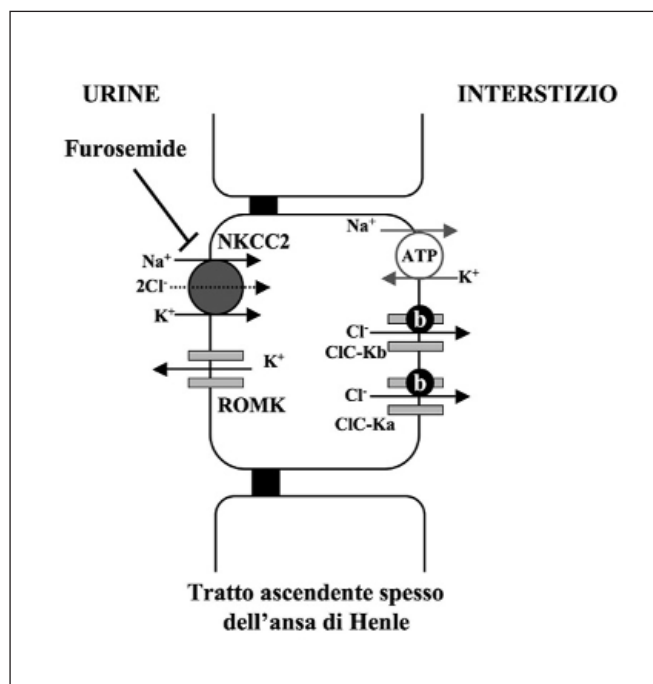


Fig. 4 - Meccanismi di riassorbimento di Na^+Cl^- a livello del tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle. NKCC2, cotrasportatore $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ di tipo 2; ROMK, canale renale del potassio; CIC-Ka e CIC-Kb, canale renale Cl^- -Ka e Kb; b, sub-unità barttin del canale CIC-K Cl^- .

presentata nei soggetti ipertesi, rispetto ai normotesi, concludendo che tale variante può determinare un aumentato rischio per ipertensione essenziale.

Sindrome Bartter tipo I o antenatale

La forma antenatale di sindrome di Bartter è una patologia severa che si manifesta con alcalosi metabolica ipokaliemica, dispersione di sodio ed ipotensione, ma che si differenzia dalla sindrome di Gitelman per ipercalcemia, normali valori di magnesio ed una presentazione neonatale più severa (31-33). Il tipo di disordine elettrolitico visto in questi pazienti è simile a quello descritto nei soggetti che assumono diuretici dell'ansa, potenti inibitori del cotrasportatore $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ (NKCC2), che si trova nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (Fig. 4).

Quaggin (34) ha evidenziato che il gene SLC12A1 che codifica per tale cotrasportatore nell'uomo e nel topo è correlato dal punto di vista della struttura con un altro trasportatore Na-K-Cl (SLC12A2, precedentemente chiamato NKCC1), che viene espresso in diversi tessuti, compresa la membrana epiteliale basolaterale, dove viene mediata la secrezione attiva di cloro.

Quaggin ha effettuato studi di *linkage* per identificare la posizione del gene SLC12A1: nel topo, Slc12a1 è in *linkage* prossimalmente con Thbs1 e distalmente con l'interleukina beta 1, entrambi questi geni, nel topo, sono noti per

essere posizionati sul cromosoma 2. Slc12a1 mappa in una regione del cromosoma 2 che presenta un'elevata *sintenia* con il cromosoma umano 15. Nel topo il gene per la fibrilina 1, è il più distale in un gruppo di *linkage* sintenico con la regione 15q11-q22 umana ed è prossimale con il complesso dell'interleukina 1 e probabilmente è distale a Slc12a1 (34).

Gli studi effettuati hanno dimostrato che SLC12A1 mappa sul cromosoma 15.

In 5 probandi con sindrome di Bartter antenatale, nati da consanguinei, Simon ha escluso l'esistenza di *linkage* con la regione del cromosoma 16 dove si trova il gene NCCT coinvolto nella sindrome di Gitelman. Usando sequenze dinucleotidiche ripetute ha dimostrato l'esistenza, in queste famiglie, di *linkage* con il gene NKCC2 sul cromosoma 15, che codifica per il trasportatore Na-K-Cl. Ha quindi effettuato l'analisi di *linkage* in 6 famiglie di consanguinei con sindrome di Bartter. Tutti i soggetti erano nati pretermine con un quadro neonatale di disidratazione ed ipercalcemia severa. Questi pazienti erano tutti omozigoti per gli alleli utilizzati come *markers* per il locus NKCC2. Lo screening delle mutazioni a livello dei 26 esoni codificanti la proteina ha permesso a Simon e Lifton di identificare nuove varianti che cosegregano con la malattia in tutti i soggetti affetti. L'analisi della sequenza di DNA di queste varianti ha rivelato la presenza di mutazioni che alterano in modo drastico la proteina, incluse 3 mutazioni *fram-shift*, dovute all'inserzione/delezione di un singolo paio di basi e 3 mutazioni missense che introducono una sostituzione non conservativa a livello dei residui, completamente conservata in tutti i membri di questa famiglia. Le mutazioni determinano tutte la perdita di funzione di NKCC2, con riduzione del riassorbimento di NaCl , deplezione di sodio, ipovolemia, ipotensione, attivazione del sistema renina-angiotensina, e conseguente alcalosi ipokaliemica. È necessario il normale funzionamento di NKCC2 per determinare a livello lumenale del tratto ascendente dell'ansa di Henle il voltaggio transepiteliale positivo che determina il riassorbimento di calcio nel distretto vascolare (35). Di conseguenza, la perdita di funzione a carico di NKCC2 impedisce il riassorbimento del calcio e produce la severa ipercalcemia che si osserva nella sindrome di Bartter di tipo I. Tali dati sono stati confermati in una *coorte* di 20 pazienti del Costa Rica dove è stata identificata una mutazione nonsense del gene NKCC2. Questo allele mutante era contenuto all'interno di un comune singolo aplotipo, suggestivo del fatto che la maggior parte dei pazienti con sindrome di Bartter in Costa Rica presentavano un antenato comune. Tutti i pazienti presentavano alcalosi metabolica ipokaliemica, ipostenuria e ritardo di crescita. Alcuni soggetti presentavano ipercalcemia e nefrocalcinosi (36).

Successivamente, Vargas-Poussou (19), tramite l'analisi molecolare della sequenza codificante e dei confini tra esoni ed introni del gene NKCC2 in 15 probandi con sindrome di Bartter antenatale appartenenti a 13 famiglie, ha

trovato 14 nuove mutazioni, oltre a 3 isoforme dell'NKCC2 umano derivate da *splicing* alternativo.

Takahashi (37) usando topi *knockout* per NKCC2 ha osservato che: topi omozigoti NKCC2 *-/-* nascevano nel numero previsto e sani. Dal 1° giorno di vita iniziavano a mostrare segni di ipovolemia con ematocrito elevato, intorno al 7° giorno, presentavano ritardo di crescita, forte disidratazione ed insufficienza renale, con iperpotassiemia, acidosi metabolica, idronefrosi di diversa entità ed elevata concentrazione plasmatica di renina. Il trattamento con indometacina a partire dal giorno 1, preveniva il ritardo di crescita e il 10% dei trattati per 3 settimane sopravviveva, anche se mostrava, in età adulta poliuria severa, idronefrosi grave, ipopotassiemia, alcalosi, ipercalcemia e proteinuria. I topi *wildtype* (con NKCC2 presente e funzionante) trattati con furosemide, mostravano un fenotipo simile ai topi adulti NKCC2 *-/-* curati dall'indometacina, tranne che l'idronefrosi era minore. La poliuria, la policalcemia e la proteinuria sia dei topi adulti NKCC2 *-/-* trattati con indometacina che i *wildtype* trattati con furosemide erano non responsivi agli inibitori del sistema renina-angiotensina, alla vasopressina e ad un'ulteriore terapia con indometacina. L'assenza del gene murino NKCC2 è quindi responsabile di poliuria non compensabile da altre strutture nel nefrone.

Sindrome Bartter tipo II

In due famiglie di consanguinei con sindrome di *Bartter* antenatale, l'analisi di *linkage* ha escluso il *locus* NKCC2 (12).

In altre 3 famiglie nei soggetti malati, non sono state trovate mutazioni a livello di NKCC2.

I soggetti malati di queste 5 famiglie erano indistinguibili, clinicamente, da quelli con sindrome di *Bartter* dovuta a mutazioni di NKCC2 (12). Questi dati forniscono prova dell'eterogeneità genetica (di *locus*) della sindrome di *Bartter*.

L'ipotesi fatta in base a questi dati era che sindrome di *Bartter* potesse essere anche causata anche da mutazioni a livello delle proteine di regolazione di NKCC2.

Uno di questi regolatori a livello della parte spessa del tratto ascendente dell'ansa di Henle, ROMK (Fig. 4), è un canale apicale, ATP-sensibile, che richiama K all'interno del lume del tratto ascendente dell'ansa di Henle (38). Un'ipotesi plausibile era quindi che una perdita di funzione a carico di questo canale potesse inibire l'attività di NKCC2, determinando lo stesso fenotipo della sindrome di *Bartter*.

Nel 1993 Ho (39) ha clonato il cDNA *Romk* dal rene di ratto e mostrato che la proteina presenta solo due domini transmembrana, in contrasto con i 6 visti negli altri canali potassio.

Nel 1994 Yano (40) ha utilizzato l'ibridizzazione in situ per mappare il gene ROMK1 sul cromosoma 11q24 e ne ha identificato due isoforme (ROMK1A e ROMK1B) che dif-

feriscono come conseguenza di *splicing* alternativo. Entrambe le isoforme vengono espresse a livello renale. L'anno successivo un altro gruppo di ricercatori (41) ha utilizzato il cDNA del *Romk* murino per clonare l'omologo renale umano. Oltre all'omologo per il gene murino sono state caratterizzate altre 4 forme derivate da *splicing* alternativo.

Per verificare il ruolo di ROMK nello sviluppo della sindrome di *Bartter* sono state ricercate, nei soggetti affetti, delle mutazioni a livello dei 5 esoni codificanti per il canale. In tutti i pazienti sono state identificate delle varianti molecolari che cosegregano precisamente con la malattia. Il sequenziamento del DNA di queste varianti ha rilevato due codoni terminali prematuri, due mutazioni *frameshift* e tre mutazioni missense; una sostituzione rimuove un sito di fosforilazione di una *serin protein* chinasi A, che si è rivelato critico per la normale funzione del canale ROMK (42). In base a questi dati è stato quindi concluso che in queste famiglie, la sindrome di *Bartter* è causata da mutazioni a carico di ROMK (12, 43).

4 mutazioni associate a questa forma di sindrome di *Bartter* sono state causate sperimentalmente in ratti *Kcnj1* (44). Tre di queste mutazioni sono responsabili della formazione di canali con un flusso di K fortemente ridotto, ma i meccanismi responsabili non sono univoci e includono anomalie della fosforilazione, processi di proteolisi e *tafficking* proteico.

L'analisi di mutazioni nelle regioni *core* (45) ha evidenziato che queste determinano un effetto dominante negativo, con ripercussioni sulla conduttanza del canale.

Questi canali responsabili del riassorbimento del potassio sono importanti regolatori del potenziale di membrana e dell'eccitabilità cellulare. La loro attività è fortemente dipendente dall'integrità della interazione con il fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato (PIP2). Lopes (46) ha identificato residui importanti per l'interazione con PIP2. Nelle sindromi di *Bartter* e Andersen (sindrome caratterizzata da paralisi periodiche potassio-sensibili, ectopia ventricolare e dismorfismi, determinata da mutazioni missense a carico di KCNJ2, sul cromosoma 17), mutazioni a livello di questi residui riducono la forza dell'interazione del canale con PIP2.

Sindrome Bartter tipo III

Tramite il reclutamento di pazienti con alcalosi ipokaliemica ereditaria, normomagnesemia e normo o ipercalcemia sono state ricercate altre mutazioni oltre a quelle già descritte. Nella maggioranza di questi soggetti non sono state riscontrate anomalie a carico di NKCC2 o ROMK. L'analisi di *linkage* condotta su 11 famiglie di consanguinei con sindrome di *Bartter* non ha trovato un *linkage* con NKCC2 e ROMK (13), suggerendo l'esistenza di un altro regolatore del riassorbimento del sodio a livello dell'an-

sa di Henle responsabile per questo fenotipo.

Kieferle (47) ha clonato gli omologhi murini e umani di due canali del cloro (ClCK1 e ClCK2). Nel ratto questi due canali sembrano essere espressi nel nefrone a partire dalla parte sottile del tratto ascendente dell'ansa di Henle in poi. Questi canali appartengono alla famiglia dei canali del cloro, con 12 domini transmembrana e terminazioni intracitoplasmatiche. Gli omologhi umani di questi due geni (CLCNKA e CLCNKB), codificano per proteine di 687 aminoacidi e sono mappati sul cromosoma 1p36 (48) e sembrano mediare il riassorbimento del cloro attraverso la membrana basolaterale delle cellule renali tubulari nel lume vasale (49).

Considerando CLCNKA e CLCNKB come possibili geni candidati per la sindrome di Bartter Simon ha genotipizzato tre loci polimorfi nei suoi pazienti. 5/11 di questi pazienti erano omozigoti per tutti i loci, consistenti in un *linkage* con CLCNKA/CLCNKB sul cromosoma 1. Sono state evidenziate: in 10 famiglie con soggetti affetti da sindrome di Bartter di tipo III, una delezione omozigote del gene CLCNKB, in una famiglia un *crossing-over* asimmetrico tra i geni CLCNKA e CLCNKB. Inoltre in altre 7 famiglie sono state identificate una mutazione nonsense, uno *splicing* e cinque mutazioni missense (13).

Nessun paziente con sindrome di Bartter con la mutazione CLCNKB presenta nefrocalcinosi, così che questo gruppo di pazienti è facilmente distinguibile da quelli con mutazioni di NKCC2 e ROMK.

Sindrome Bartter tipo IV

Barttin (50, 51) è una subunità B del canale ClC-K (Fig. 4) e una mutazione capace di determinare una perdita di funzione (52) a carico di Barttin è responsabile della sindrome di Bartter associata a sordità neurosensoriale (Bartter tipo IV). Questi soggetti non presentano mutazioni a carico dei geni responsabili per la Sindrome di Bartter tipo I-III, ed il fenotipo sordità neurosensoriale co-segrega su un cromosoma differente, 1p31 (53).

Mutazioni a carico di Barttin producono un fenotipo severo di Bartter con ritardo di crescita estremo, importante perdita renale di sali e scarsa risposta all'indometacina. Questo tipo di mutazione determina la perdita di attività del canale ClC-K in tutti i segmenti del nefrone che lo esprimono. Per il normale funzionamento delle cellule che mediano la sensazione uditiva è richiesta la secrezione di endolinfa ricca di ione potassio da parte delle cellule marginali della stria vascolare dell'orecchio interno (54, 55). A livello di queste cellule sono espressi entrambi i geni per il canale ClC-K, e Barttin è necessario per il funzionamento di tali canali ClC-K (54-56). Il passaggio transcellulare di K è mediato da NKCC1 che assicura l'ingresso di K nelle cellule marginali. I canali K voltaggio-dipendenti mediano la secrezione di K nell'endolinfa. Per il suo funzionamento NKCC1 richiede la presenza di Cl che ricircola dalle cellule all'interstizio. Barttin media questo ricircolo di Cl. Alterazioni sia a carico di Barttin che dei canali apicali del K possono abolire la secrezione di K nell'endolinfa determinando sordità neurosensoriale (57).

TABELLA II - DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE PATOLOGIE SODIO DISPERDENTI

	Età di presentazione	Sintomi principali	Dati di laboratorio
Gitelman	> 6 aa	Astenia, crampi, affaticamento, ritardo di crescita, condrocalcinosi	Alcalosi ipokaliemica, ipocalciuria, ipomagnesemia
Bartter I	Antenatale	Poli-idramnios materno, poliuria, ritardo di crescita	Iso-ipostenuria, iponatremia, ipocloremia, elevati livelli di aldosterone nel fluido amniotico
Bartter II	Antenatale-neonatale	Poli-idramnios materno, nascita prematura, poliuria, nefrocalcinosi	Isostenuria, ipercalcemia, elevati livelli di aldosterone plasmatico
Bartter III	1 anno	Ritardo di crescita, disidratazione, ipotonia muscolare, letargia	Iponatremia, ipocloremia, alcalosi ipokaliemica, aldosterone plasmatico poco aumentato
Bartter IV	Antenatale	Poli-idramnios materno, poliuria fetale, disidratazione, IR progressiva, sordità neurosensoriale	Ipcloremia, ipomagnesemia

Sindrome Bartter tipo V

Il *calcium sensing-receptor* (CaSR) è una proteina di membrana che appartiene alla superfamiglia delle proteine recettoriali G (58), ha un ruolo importante nell'omeostasi minerale e mutazioni a suo carico determinano l'ipocalciuria ipercalcemica familiare e l'ipocalcemia autosomica dominante (58). Il CaSR è attivato dall'incremento della concentrazione extracellulare di ione calcio (58). CaSR è altamente espresso a livello della membrana basolaterale della parte spessa del tratto ascendente dell'ansa di Henle (59, 60) e la sua attivazione determina il trasporto di sodio (*furosemide-like effect*; (58, 61)). Due studi recenti (62, 63) hanno permesso di identificare dei soggetti con mutazioni attivanti di CaSR (ipocalcemia autosomica dominante) responsabili del fenotipo sindrome di *Bartter*.

Trattamento Sindrome di Bartter

Attualmente il trattamento della sindrome di *Bartter* è rivolto alla correzione della disidratazione e dei disordini elettrolitici.

Pazienti con forme poco severe di *Bartter* possono mantenere il bilancio di sodio anche con un apporto moderato-basso. Diversa è la situazione dei bambini piccoli, fino a quando i loro reni non hanno raggiunto la massima capacità di riassorbimento, necessitano un'adeguata integrazione di liquidi ed elettroliti. I pazienti adulti con livelli serici di $K > 3$ mmol/L non necessitano alcuna supplementazione, cosa che invece è auspicabile in soggetti con valori di K inferiori; in alcuni soggetti sono efficaci anche diuretici risparmiatori di potassio. Altri farmaci comunemente impiegati sono gli anti-infiammatori non steroidei, per il loro effetto anti-prostaglandine; sono i farmaci di prima scelta nei soggetti con sintomi precoci (*Bartter* antenatale). Gli effetti collaterali di questi farmaci sono comuni, tanto da determinare una scarsa compliance nel lungo periodo (64).

Sindrome di Gitelman

Anche nella sindrome di Gitelman l'obiettivo terapeutico principale è quello di mantenere un'adeguata idratazione. Nei bambini piccoli in genere si mantiene un apporto di soluti basso ed elevato di liquidi. L'aggiunta di un diuretico tiazidico riduce la diuresi inibendo il riassorbimento di sodio a livello del tubulo contorto distale. Riducendo la produzione di acqua libera e causando una contrazione del volume extracellulare, si aumenta il riassorbimento prossimale di sale e acqua, per potenziare l'effetto del tiazidico spesso si usano l'amiloride o l'indometacina.

Test di verifica

1) La regolazione dell'omeostasi del sodio avviene prevalentemente:

- A livello dell'ansa di Henle
- A livello del tubulo contorto prossimale
- A livello del tubulo contorto distale
- Nel dotto collettore
- A livello della capsula di Bowman.

2) La sindrome di Gitelman:

- È un disordine ereditario a carattere autosomico dominante
- È caratterizzata da ipercalcemia
- Il gene responsabile è quello codificante per il cotrasportatore Na-Cl sensibile ai diuretici tiazidici
- Non è caratterizzata da alcalosi
- Il gene responsabile mappa sul cromosoma 15.

3) La sindrome di Bartter tipo I:

- È anche definita *Bartter* antenatale
- Il tipo di disordine elettrolitico è simile a quello descritto nei soggetti che assumono tiazidici
- Il gene responsabile mappa sul cromosoma 16
- Non si osserva ritardo di crescita
- Può essere diagnosticata per i bassi livelli di aldosterone nel fluido amniotico.

4) La sindrome di Bartter tipo II:

- Può essere diagnosticata per i bassi livelli di aldosterone nel fluido amniotico
- È caratterizzata da ipocalciuria
- Sono descritti casi di nefrocalcinosi
- È dovuta a mutazioni di NKCC2
- I canali coinvolti non regolano l'omeostasi del potassio.

5) La sindrome di Bartter tipo III:

- CLCNKA e CLCNKB mediano il riassorbimento del cloro
- Non si osserva ritardo di crescita
- Non si osserva ipotonia muscolare
- È caratterizzata da ipernatremia
- CICK1 e CICK2 sono espressi nel dotto collettore.

6) La sindrome di Bartter tipo IV:

- Non si associa a sordità neurosensoriale
- È una forma fortemente responsiva all'indometacina
- La subunità Barttin non è coinvolta
- Si associa a progressiva insufficienza renale
- È caratterizzata da ipercloremia.

7) Il calcium sensing-receptor:

- Sue mutazioni attivanti causano ipercalcemia
- È coinvolto nella sindrome di Gitelman
- È altamente espresso a livello del tubulo contorto distale
- Appartiene alla superfamiglia delle proteine recettoriali G
- È inattivato dall'incremento della concentrazione extracellulare di ione calcio.

8) La terapia di queste patologie:

- Nella sindrome di *Bartter* non sono efficaci i diuretici risparmiatori di potassio
- I FANS non trovano alcuna utilità

- c. L'obiettivo principale è quello di mantenere un'adeguata idratazione
- d. Nella sindrome di Gitelman non vengono usati i tiazidici
- e. Nella forma neonatale di *Barter* i FANS non vengono usati a causa della loro azione anti-prostaglandine.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Conclusioni

Con il nome di patologie sodio-disperdenti si comprende un gruppo di patologie differenti tra loro accumulate da un difetto a carico di uno dei meccanismi che regolano l'omeostasi del sodio. Il miglioramento delle tecniche di analisi genetica ci ha permesso di identificare i meccanismi responsabili dei differenti quadri patologici e di meglio comprendere i fenomeni che sono alla base della regolazione della pressione arteriosa.

Bibliografia

1. Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In Laragh JH and Brenner BM. Eds Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 1990 Raven Press New York pp 81-100.
2. Rosenbaum P, Hughes M. Persistent, probably congenital, hypokalemic metabolic alkalosis with hyaline degeneration of renal tubules and normal urinary aldosterone. *Am J Dis Child* 1957; 94: 560.
3. *Barter* Fc, Pronove P, Gill JR jr, MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: a new syndrome. *Am J Med* 1962; 33: 811-28.
4. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1966; 79: 221-3.
5. Fanconi A, Schachenmann G, Nussli R, Prader A. Chronic hypokalemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism (*Barter's* syndrome) and hypercalciuria. Report of two cases with emphasis on natural history and on catch-up growth during treatment. *Helv Paediat Acta* 1971; 2: 144-63.
6. McCredie DA, Balir-west JR, Scoggins BA and Shipman R. Potassium-losing nephropathy of childhood. *Med J Aust* 1971; 1: 129-35.
7. Ohlsson A, Sieck U, Cumming W, Akhtar M, Serenius F. A variant of *Barter's* syndrome. *Barter's* syndrome associated with hydramnios, prematurity, hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73: 868-74.
8. Seyberth HW, Koniger SJ, Rascher W, Kuhl PG, Schweer H. Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders. *Pediatr Nephrol* 1987; 1: 491-497.
9. Proesmans W, Massa G, Vanderberghe K, Van Assche A. Prenatal diagnosis of *Barter* syndrome. *Lancet* 1987; 394.
10. Stein JH. The pathogenetic spectrum of *Barter's* syndrome. *Kidney Int* 1985; 28: 85-93.
11. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. *Barter's* syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 1996; 13: 183-8.
12. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro

Riassunto

Il progressivo miglioramento delle tecnologie di indagine genetica ha permesso l'identificazione dei geni coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa. Un ruolo rilevante è giocato dai sistemi di regolazione dell'omeostasi del sodio a livello renale. Mutazioni determinanti un aumento o una diminuzione della funzionalità delle proteine trasportatrici è in grado di determinare, non solo un'ipo o un'ipertensione, ma anche sintomi ed alterazioni metaboliche ad esse correlate e l'eventuale risposta a trattamenti farmacologici.

Le forme monogeniche di iper o ipotensione sono rare, ma evidenziano l'importanza del trasporto tubulare del sodio nella regolazione della pressione arteriosa.

Indirizzo degli Autori:

Prof. Daniele Cusi

IRCCS Multimedica

Via Milanese, 300

20099 Sesto San Giovanni (MI)

e-mail: daniele.cusi@unimi.it

- A, Trachtman H, Sanjad SA, and Lifton RP. Genetic heterogeneity of *Barter's* syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet* 1996; 14: 152-6.
13. Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause *Barter's* syndrome type III. *Nat Genet* 1997; 17: 171-8.
14. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, et al. Gitelman's variant of *Barter's* syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 1996; 12: 24-30.
15. International Study Group for *Barter*-like syndromes, Károlyi L, Konrad M, Kockerling A, Ziegler A, Zimmermann DK, Roth B, Wieg C, Grzeschik KH, Koch MC, Seyberth HW, Vargas R, Forestier L, Jean G, Deschaux M, Rizzoni GF, Niaudet P, Antignac C, Feldmann D, Lorrison F, Cougoureux E, Laroze F, Alessandri JL, David L, Saunier P, Deschenes G, Hildebrandt F, Vollmer M, Proesmans W, Brandis M, Van Den Heuvel LP, Lemmink HH, Nillesen W, Monnens LAH, Knoers NV, Guay-Woodford LM, Wright CJ, Madrigal G, and Hebert SC. Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of *Barter* syndrome: evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 17-26.
16. Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, et al. Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic *Barter* syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1449-59.
17. Lemmink HH, Knoers NV, Károlyi L, et al. Novel mutations in the thiazide-sensitive NaCl cotransporter gene in patients with Gitelman syndrome with predominant localization to the C-terminal domain. *Kidney Int* 1998; 54: 720-30.
18. Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, et al. Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human NaCl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 1996; 35: 486-93.
19. Vargas-Poussou R, Feldmann D, Vollmer M, et al. Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for antenatal *Barter* syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1332-40.
20. Lemmink HH, Van Den Heuvel LPWJ, Van Dijk HA, et al. *linkage* of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 403-7.

21. Mastroianni N, Bettinelli A, Bianchetti M, et al. Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1019-26.
22. Velasquez H, Ellison DH, Wright FS. Luminal influences on potassium secretion: Chloride, sodium and thiazide diuretics. *Am J Physiol* 1992; 262: F1076-F1082.
23. Gesek FA, Friedman PA. Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 429-38.
24. Tsukamoto T, Kobayashi T, Kawamoto K, Fukase M, Chahara K. Possible discrimination of Gitelman's syndrome from *Barter's* syndrome by renal clearance study: Report of two cases. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 637-41.
25. Sutton RAL, Marichak V, Halabe A, Wilkins GE. *Barter's* syndrome: Evidence suggesting a distal tubular defect in a hypocalciuric variant of the syndrome. *Miner Electrol Metab* 1992; 18: 43-51.
26. Gamba G, Miyanoshta A, Lombardi M, et al. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in the kidney. *J Biol Chem* 1994; 269: 17713-22.
27. Gamba G, Saltzberg SN, Lombard M, et al. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 2749-53.
28. Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JW, et al. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC, in the rat kidney. *Kidney Int* 1996; 50: 174-83.
29. Chang H, Tashiro K, Hirai M, Ikeda K, Kurokawa K, Fujita T. Identification of a cDNA encoding a thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter from the human and its mRNA expression in various tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 324-8.
30. Melander O, Orho-Melander M, Bengtsson K, et al. Genetic variants of thiazide-sensitive NaCl-Cotransporter in Gitelman's syndrome and primary hypertension. *Hypertension* 2000; 36: 389-94.
31. Deschenes G, Burguet A, Guyot C, et al. Forme antenatale de syndrome de *Barter*. *Ann Pediatr* 1993; 40: 95-101.
32. Proesmans W, Devlieger H, Van Assche A, et al. *Barter* syndrome in two siblings: antenatal and neonatal observations. *Int. J Pediatr Nephrol* 1985; 6: 63-70.
33. Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kuhl PG, Mehls O, Scharer K. Congenital hypokalemia and hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from *Barter* syndrome. *J Pediatr* 1985; 107: 694-701.
34. Quaggin SE, Payne JA, Forbush B, Igarashi P. Localization of the renal Na-K-Cl cotransporter gene (Slc12a1) on mouse chromosome 2. *Mamm. Genome* 1995; 6: 557-61.
35. Sutton RAR, Dirks J J. Renal handling of calcium, phosphate and magnesium. In *The Kidney*, 2nd edition. Brenner BM, Rector FC editors. Philadelphia: Saunders 1981; 551-618.
36. Kurtz eL, Karolyi L, Seyberth HW, et al. A common NKCC2 mutation in Costa Rican *Barter's* syndrome patients: evidence for a founder effect. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1706-11.
37. Takahashi N, Chernavvsky DR, Gomez RA, Igarashi P, Gitelman HJ, Smithies O. Uncompensated polyuria in a mouse model of *Barter's* syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 5434-9.
38. Wang W, Sackin H, Giebisch G. Renal potassium channels and their regulation. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 81-96.
39. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; 362: 31-8.
40. Yano H, Philipson LH, Kugler JL, et al. Alternative *splicing* of human inwardly rectifying K + channel ROMK1 mRNA. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 854-60.
41. Shuck ME, Book JH, Benjamin CW, et al. Cloning and characterization of multiple isoforms of the human kidney ROM-K potassium channel. *J Biol Chem* 1994; 269: 24261-70.
42. Xu Z-C, Yang Y, Hebert SC. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K + channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 9313-9.
43. Karolyi L, Konrad M, Kockerling A, et al. Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of *Barter* syndrome: evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 17-26.
44. Schwalbe RA, Bianchi L, Accili EA, Brown AM. Functional consequences of ROMK mutants linked to antenatal *Barter's* syndrome and implications for treatment. *Hum. Molec. Genet* 1998; 7: 975-80.
45. Jeck N, Derst C, Wischmeyer E, et al. Functional heterogeneity of ROMK mutations linked to hyperprostaglandin E syndrome. *Kidney Int* 2001; 59: 1803-11.
46. Lopes CMB, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP(2) interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002; 34: 933-44.
47. Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. Two highly-homologous members of the CIC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6943-7.
48. Saito-Ohara F, Uchida S, Takeuchi Y, et al. Assignment of the genes encoding the human chloride channels, CLCNKA and CLCNKB, to 1p36 and of CLCN3 to 4q32-q33 by in situ hybridization. *Genomics* 1996; 36: 372-4.
49. Reeves WB, Winters C J, Zimniak L, Andreoli TE. Epithelial chloride channels, from kidney to airway cells. *Adv Nephrol* 1994; 23: 177-90.
50. Waldegger S, Jeck N, Barth P, et al. Barttin increases surface expression and changes current properties of CIC-K channels. *Pfluegers Arch* 2002; 444: 411-8.
51. Estevez R, Boettger T, Stein V, et al. Barttin is a Cl channel (beta)-subunit crucial for renal Cl reabsorption and inner ear K+ secretion. *Nature* 2001; 414: 558-61.
52. Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, et al. Mutation of BSND causes *Barter* syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001; 29: 310-4.
53. Jeck N, Reinalter SC, Henne T, et al. Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics* 2001; 108: E5.
54. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebek AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 503-68.
55. Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1: 21-30.
56. Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, et al. Mutation of BSND causes *Barter* syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001; 29: 310-4.
57. Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Atkinson DL and Keating MT. Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N Eng J Med* 1997; 336: 1562-7.
58. Brown EM, Chattopadhyay N, Vassilev PM, Hebert SC. The calcium-sensing receptor (CaR) permits Ca²⁺ to function as a versatile extracellular first messenger. *Recent Progr Horm Res* 1998; 53: 257-80.
59. Riccardi D, Lee WS, Lee K, et al. Localization of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am J Physiol* 1996; 271: F951-F956.
60. Riccardi D, Hall AE, Xu J, et al. Localization of the extracellular Ca²⁺(polyvalent) cation-sensing receptor in kidney. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 1998; 274: F611-F622.
61. Hebert SC. Extracellular calcium-sensing receptor: Implications for calcium and magnesium handling in the kidney. *Kidney Int* 1996; 50: 2129-39.
62. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, et al. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a *Barter*-like syndrome. *JASN* 2002; 13: 2259-66.
63. Watanabe S, Fukumoto S, Chang H, et al. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and *Barter's* syndrome. *Lancet* 2002; 360: 692-4.
64. Colussi G. *Barter* syndrome. *Orphanet encyclopedia*, 2005.