



HAL
open science

Régulation du contrôle de qualité de NKCC2 par les interactions protéine-protéine

Elie Seaayfan

► **To cite this version:**

Elie Seaayfan. Régulation du contrôle de qualité de NKCC2 par les interactions protéine-protéine. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017US-PCB026 . tel-03917549

HAL Id: tel-03917549

<https://theses.hal.science/tel-03917549v1>

Submitted on 2 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Paris Descartes

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

*Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe Métabolisme et physiologie rénale,
UMRS 1138, ERL 8228*

Régulation du contrôle de qualité de NKCC2 par les interactions protéine-protéine

Par Elie SEAYFAN

Thèse de doctorat de Physiologie

Dirigée par M. le docteur Kamel LAGHMANI

Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2017

Devant un jury composé de :

| | |
|---|-------------|
| Madame le docteur Fabienne FOUFELLE | Rapportrice |
| Monsieur le docteur Dmitri FIRSOV | Rapporteur |
| Monsieur le professeur Pascal HOUILLIER | Examineur |
| Monsieur le docteur Frederic JAISSER | Examineur |
| Monsieur le docteur Kamel LAGHMANI | Directeur |

Remerciements

Je tiens à remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse de doctorat.

Je remercie tout d'abord Mme le Docteur Fabienne FOUFELLE et Mr le docteur Dmitri FIRSOV de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon tapuscrit de doctorat. J'associe à ces remerciements Mr le professeur Pascal HOUILLE et Mr le docteur Frédéric JAISSE pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir consacré une partie de votre temps à lire et juger ce travail.

Je remercie aussi le docteur Aurélie EDWARDS et le professeur Pascal HOUILLE pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude infinie à mon directeur de thèse Docteur Kamel LAGHMANI. Kamel, je suis encore aujourd'hui impressionné par ta patience à toute épreuve et ton calme, qui m'ont permis de pouvoir réaliser cette thèse. Ta disponibilité et ton implication dans le suivi de mon travail ont été déterminants. Enfin, j'espère avoir acquis une certaine rigueur à tes côtés, ce qui est indispensable pour continuer dans la recherche.

Merci à mes confrères Oucèma, Ali et Georges pour leurs relectures de mon tapuscrit.

Je tiens aussi à remercier le docteur Nancy ZAAROUR de m'avoir donné la chance de connaître Kamel.

Merci à l'établissement Saïd Saïfan, représentée par Mr Sami SAIFAN, pour le financement de ma thèse. Merci également à Mr Khaldoun TALEB pour son support pour l'obtention de visa pour venir en France.

Je souhaite aussi remercier les membres de l'équipe :

Sylvie DEMARETZ, je te remercie pour tes conseils techniques indispensables pour la qualité des résultats que je n'oublierai jamais et pour la confiance que tu m'as donnée.

Nadia DEFONTAINE, je te remercie pour tes aides techniques et pour les discussions agréables.

Dalila HAKER, notre gestionnaire fort aimée, qui me manquera tant. Elle savait (et le saura toujours) tellement bien s'occuper de nous. Désolé pour toutes les commandes de dernières minutes !

Merci également à Gabrielle, Alain, Jacques, Gilles, Marc, Stéphane, Nicolas, Lydie, Gaëlle, Christine, Luciana, Olga, Nazih, Sara, Natsuko, Ali, Khalil, Marie Lucile, Yohan, David, Laurent, Caroline, Surech, Michel, Anthony et Imène d'avoir partagé des moments mémorables avec vous au labo.

Je vous remercie toutes et tous de m'avoir supporté durant ces années, dans le privé comme dans le travail.

Merci pour tout !

Résumé

Le co-transporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ spécifique du rein et sensible au bumétanide, NKCC2, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie hydro-électrolytique et acido-basique de l'organisme. Les mutations inactivatrices de NKCC2 induisent le syndrome de Bartter anténatal de type 1, une grave maladie rénale caractérisée par une hypotension artérielle associée à des anomalies électrolytiques. À l'opposé, une activité accrue de NKCC2 est associée à une hypertension artérielle sensible au sel. Pourtant, peu est connu sur la régulation moléculaire de NKCC2. Le but de ces travaux de thèse a donc été l'identification des déterminants moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression et du trafic intracellulaire de NKCC2, plus spécifiquement dans le contrôle de qualité de ce co-transporteur. Suite au criblage par la technique de double hybride chez la levure d'une banque d'ADNc de rein humain, nous avons identifié OS-9 en tant que partenaire de NKCC2. La lectine OS-9 est un facteur clé de régulation du contrôle de qualité des protéines au niveau du RE. Les analyses de co-immunoprécipitation dans les cellules rénales ont montré qu'OS-9 interagit principalement avec la forme immature de NKCC2. De plus, les expériences d'immunofluorescence ont révélé que cette interaction aurait lieu au niveau du RE. La surexpression d'OS-9 diminue l'abondance totale de NKCC2. Cet effet est aboli suite à l'inhibition de la voie de dégradation protéique par le protéasome par le MG132. De plus, les expériences pulse-chase et cycloheximide-chase ont montré que cette diminution est secondaire à l'augmentation de la dégradation de la forme immature de NKCC2. A l'inverse, le knock-down d'OS-9 endogène augmente l'expression du co-transporteur en augmentant la stabilité de sa forme immature. Enfin, la mutation du domaine MRH (Mannose 6-phosphate Receptor Homology) d'OS-9 n'altère pas son effet sur NKCC2, alors que la mutation des deux sites de N-glycosylation de NKCC2 abolie l'effet d'OS-9. L'ensemble de nos résultats démontre l'implication de la lectine OS-9 dans le système ERAD de NKCC2.

Le deuxième volet de ce travail a porté sur l'identification de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans le Syndrome de Bartter. Nous avons découvert des mutations dans le gène MAGE-D2, situé sur la chromosome X, responsables d'une nouvelle et très sévère forme du syndrome de Bartter anténatal, caractérisé par un polyhydramnios très précoce avec un risque élevé d'accouchement prématuré et de mortalité. Nous avons montré que les anomalies de MAGE-D2 entraînent un défaut de maturation et d'expression membranaire de NKCC2 ainsi que celle du co-transporteur Na-Cl, NCC, du tubule distal. La comparaison *in vitro* de l'interactome de MAGE-D2 sauvage et mutée a révélé que la protéine MAGE-D2 sauvage interagit spécifiquement avec DNAJB1 (HSP40) et/ou GNAS, suggérant l'implication de ces deux partenaires protéiques dans la régulation de NKCC2 et NCC par MAGE-D2 pendant la grossesse.

Le troisième volet de ce travail a porté sur l'étude de l'effet de DNAJB1/HSP40, partenaire de MAGE-D2, sur l'expression de NKCC2. HSP40 a été identifiée aussi comme partenaire de NKCC2 par la technique de double hybride réalisée par notre équipe. Nous avons montré que HSP40 et son co-chaperon HSPA1A (HSP70) interagissent avec la forme immature de NKCC2 au niveau du RE. La co-expression de HSP40 et HSP70 augmente l'expression de NKCC2 en augmentant sa stabilité et sa maturation. De plus, ces deux co-chaperons régulent l'expression de NCC de la même manière. Ces observations suggèrent que MAGE-D2 coopère avec DNAJB1/HSP40 et HSPA1A/HSP70 pour protéger NKCC2 et NCC contre la rétention et la dégradation de NKCC2 au niveau du RE durant la grossesse, révélant ainsi une nouvelle voie de régulation du trafic intracellulaire de NKCC2 et NCC. Une meilleure compréhension des voies de régulation de NKCC2 et NCC, aiderait à mieux comprendre la physiopathologie de la rétention de sodium et, in fine, offrirait une nouvelle cible pour une approche pharmaceutique visant à prévenir et/ou traiter les troubles rénaux liés au bilan du sodium.

Sommaire

| | |
|--|----------|
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 1 |
| GENERALITES | 2 |
| 1. CONTRIBUTION DE LA BRANCHE LARGE ASCENDANTE A L'HOMEOSTASIE HYDRO-ELECTROLYTIQUE ET ACIDO-BASIQUE | 4 |
| 1.1. DESCRIPTION DE LA BRANCHE LARGE ASCENDANTE | 4 |
| 1.2. REABSORPTION D'ELECTROLYTES PAR LA BRANCHE LARGE ASCENDANTE | 5 |
| 1.2.1. Rôle de la BLA dans le maintien de l'équilibre acido-basique | 5 |
| a) Réabsorption de NH_4^+ | 5 |
| b) Réabsorption de bicarbonates (HCO_3^-) | 7 |
| 1.2.2. Rôle de la BLA dans la réabsorption de NaCl | 8 |
| 1.2.3. Transport des autres ions | 9 |
| 2. LE CO-TRANSPORTEUR $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ | 10 |
| 2.1. HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DU CO-TRANSPORT $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ DANS LA BLA | 11 |
| 2.1.1. Description d'une activité de co-transport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ | 11 |
| 2.1.2. Localisation apicale du co-transporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ | 11 |
| 2.1.3. Mécanisme du co-transport de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ dans les cellules épithéliales de la BLA | 12 |
| 2.1.4. Transport de NH_4^+ par le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ | 12 |
| 2.2. CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DE $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ | 13 |
| 2.2.1. Clonage du gène | 13 |
| 2.2.2. La protéine NKCC2 | 14 |
| a) Structure primaire et secondaire de la protéine NKCC2 | 14 |
| 2.2.3. Les isoformes de NKCC2 | 15 |
| a) Les mécanismes d'épissage | 15 |
| b) Localisation des différentes isoformes dans la BLA : | 17 |
| 2.3. FONCTIONS DE NKCC2 DANS LA PHYSIOLOGIE RENALE | 19 |
| 2.3.1. Propriétés fonctionnelles des différentes isoformes de NKCC2 | 19 |
| a) Les isoformes longues A, B et F | 19 |
| • Les études d'expression : | 19 |
| • Études de délétion | 20 |
| i) Délétion complète de NKCC2 | 20 |
| ii) Délétion spécifique des isoformes : | 20 |
| b) L'isoforme courte S-NKCC2 | 22 |
| 3. BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DE LA PROTEINE NKCC2 | 24 |
| 3.1. BIOSYNTHESE DE LA PROTEINE | 24 |
| 3.2. CONTROLE QUALITE DE NKCC2 | 24 |
| 3.3. MATURATION DE LA PROTEINE | 25 |
| 3.3.1. Glycosylation de NKCC2 | 25 |
| 3.3.2. Les déterminants de l'adressage apicale | 26 |
| 3.3.3. Le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi | 27 |
| 3.3.4. Transport de la protéine entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique | 28 |
| a) Rôle des VAMP2 et 3 dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique | 28 |
| b) Rôle de l'aldolase B dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique | 29 |
| c) Rôle de SCAMP2 dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique | 29 |
| d) Rôle de MAL-VIP17 dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique | 30 |
| e) Rôle de la moésine dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique | 30 |
| f) La régulation de la phosphorylation de NKCC2 | 30 |
| 4. NKCC2 DANS LE SYNDROME DE BARTTER | 32 |
| 4.1. TABLEAU CLINIQUE | 32 |
| 4.2. PHYSIOPATHOLOGIE | 32 |
| 4.3. TRAITEMENT | 33 |

| | | |
|---|--|------------|
| 4.4. | HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DU SYNDROME DE BARTTER TYPE I | 34 |
| 4.4.1. | <i>Mutations dans NKCC2</i> | 35 |
| POSITION DU PROBLEME..... | | 38 |
| MATERIELS ET METHODES..... | | 39 |
| 1. | CONSTRUCTIONS UTILISEES | 40 |
| 1.1. | DESCRIPTION DES CONSTRUCTIONS | 40 |
| 1.2. | MUTAGENESE DIRIGEE..... | 40 |
| 1.3. | AMPLIFICATION DES CONSTRUCTIONS..... | 40 |
| 1.3.1. | <i>Transformation bactérienne</i> | 40 |
| 1.3.2. | <i>Extraction de l'ADN plasmidique de bactéries</i> | 41 |
| 2. | CULTURE CELLULAIRE | 41 |
| 2.1. | LIGNEES CELLULAIRES..... | 41 |
| 2.1.1. | <i>Cellules OKP</i> | 41 |
| 2.1.2. | <i>Cellules HEK293</i> | 41 |
| 2.2. | CONDITIONS DE CULTURE | 42 |
| 2.2.1. | <i>Repiquage</i> | 42 |
| 2.2.2. | <i>Congélation</i> | 42 |
| 2.3. | EXPRESSION DES PROTEINES | 42 |
| 2.3.1. | <i>Transfection avec la lipofectamine plus</i> | 42 |
| 2.4. | KNOCKDOWN DES PROTEINES ENDOGENES | 43 |
| 3. | EXTRACTION PROTEIQUE..... | 44 |
| 4. | ELECTROPHORESE ET IMMUNODETECTION | 44 |
| 5. | IMMUNOPRECIPITATION | 45 |
| 6. | BIOTINYLATION..... | 45 |
| 7. | IMMUNOLocalISATION CELLULAIRE..... | 46 |
| 7.1. | PRINCIPE GENERAL..... | 46 |
| 7.2. | PROTOCOLE D'IMMUNOMARQUAGE..... | 46 |
| 7.3. | MICROSCOPIE CONFOCALE | 48 |
| 8. | MESURE DE STABILITE DES PROTEINES | 48 |
| 8.1. | PULSE 'CHASE' | 48 |
| 8.2. | CYCLOHEXIMIDE 'CHASE' | 49 |
| 9. | MESURE DE pH INTRACELLULAIRE ET DE L'ACTIVITE DE CO-TRANSPORT NA-K-2CL | 49 |
| 10. | ANALYSE STATISTIQUE | 50 |
| RESULTATS | | 51 |
| PREMIERE PARTIE | | |
| IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PROTEIQUES IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DE QUALITE DE NKCC2..... | | 52 |
| INTRODUCTION..... | | 53 |
| DEUXIEME PARTIE | | |
| IDENTIFICATION DE NOUVEAUX MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LE SYNDROME DE BARTTER | | 70 |
| INTRODUCTION..... | | 71 |
| TROISIEME PARTIE | | |
| ROLE DES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE (HSP) DANS LA DEGRADATION ET LA MATURATION DE NKCC2 | | 104 |
| 1. | INTRODUCTION | 105 |
| 2. | RESULTATS | 107 |
| 2.1. | CO-IMMUNOPRECIPITATION ENTRE NKCC2 ET LA PROTEINE DNAJB1 | 107 |
| 2.2. | LOCALISATION CELLULAIRE DE DNAJB1 ET NKCC2..... | 108 |

| | | |
|--|---|------------|
| 2.3. | ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'INTERACTION ENTRE DNAJB1 ET NKCC2..... | 109 |
| 2.4. | EFFET DE DNAJB1 SUR LA STABILITE DE NKCC2..... | 111 |
| 2.5. | L'INTERACTION ENTRE LES CO-TRANSPORTEURS $\text{Na}^+(\text{K}^+)\text{-Cl}^-$ ET HSP70 | 112 |
| 2.6. | L'EFFET DES DEUX HSP70 SUR L'EXPRESSION DES CO-TRANSPORTEURS $\text{Na}^+(\text{K}^+)\text{-Cl}^-$.. | 113 |
| 2.7. | ROLE DE HSPA1A ENDOGENE DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE NKCC2 | 115 |
| 2.8. | L'ETAT DE STRESS REGULE L'EFFET DE HSPA1A | 117 |
| 3. | DISCUSSION | 118 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | | 121 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 125 |

Liste des publications et communications

Publications

1. Kamel Laghmani, Bodo B. Beck, Sung-Sen Yang, **Elie Seaayfan**, Andrea Wenzel, Björn Reusch, Helga Vitzthum, Dario Priem, Sylvie Demaretz, Klasien Bergmann, Leonie K. Duin, Heike Göbel, Christoph Mache, Holger Thiele, Malte P. Bartram, Carlos Dombret, Janine Altmüller, Peter Nürnberg, Thomas Benzing, Elena Levtchenko, Hannsjörg W. Seyberth, Günter Klaus, Gökhan Yigit, Shih-Hua, Lin, Albert Timmer, Tom J. de Koning, Sicco A. Scherjon, Karl P. Schlingmann, Mathieu J.M. Bertrand, Markus M. Rinschen, Olivier de Backer, Martin Konrad, and Martin Kömhoff. (2016). *Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter Syndrome and MAGED2 Mutations*. *The New England Journal of Medicine (NEJM)*. doi: 10.1056/NEJMoa1507629
2. **Elie Seaayfan**, Nadia Defontaine, Sylvie Demaretz, Nancy Zaarour and Kamel Laghmani (2015). *OS9 interacts with NKCC2 and targets its immature form for the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway*. *Journal of Biological Chemistry (JBC)*. doi:10.1074/jbc.M115.702514

Communications

1. **Elie Seaayfan**, Sylvie Demaretz, Bodo B. Beck, Martin Kömhoff, Kamel Laghmani (2016). *Roles of Cytoplasmic Hsp40 and Hsp70 Molecular Chaperones in NKCC2 Stability and Maturation*. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Chicago, USA. SA-OR044
2. Sylvie Demaretz, Nadia Defontaine, **Elie Seaayfan**, Kamel Laghmani (2015). *Golgi Alpha1,2-Mannosidase IA Promotes the Efficient Degradation of NKCC2 and Its Disease Causing Mutants*. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Diego, USA. TH-OR076
3. **Elie Seaayfan**, Sylvie Demaretz, Nadia Defontaine, Kamel Laghmani (2014). *Rare Mutations in NKCC2 Gene Associated with Protection From Hypertension Differentially Regulate NKCC2 Isoforms A and F*. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, USA. SA-PO117
4. **Elie Seaayfan**, Sylvie Demaretz, Nadia Defontaine, Kamel Laghmani (2013). *AUP1 Promotes Polyubiquitination and ER-Associated Degradation of NKCC2*. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Atlanta, USA. FR-PO727

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

Généralités

Chez un sujet sain, la quantité et la concentration des ions circulants dans l'organisme peuvent être soumises à des modifications d'origine extérieure. Le corps humain doit être capable de maintenir son homéostasie hydrique, électrolytique et l'équilibre acido-basique pour assurer le fonctionnement normal de la machinerie cellulaire. Le maintien de cette homéostasie est assuré par l'intégration de plusieurs mécanismes physiologiques. Ainsi, la pression artérielle est régulée par le volume de liquide extracellulaire (LEC) formé par le plasma sanguin et le liquide interstitiel. Le volume du LEC dépend de l'ion sodium qui constitue 90 à 95% de la totalité des solutés. L'ion sodium Na^+ est donc le facteur majeur de la régulation de l'osmolarité (280 des 300 mOsm/L). Les mécanismes de la soif et de la sécrétion de l'hormone antidiurétique (ADH ou vasopressine) maintiennent la concentration plasmatique en Na^+ dans un intervalle étroit (135 à 145 mM). Le volume du LEC est déterminé par l'équilibre entre les entrées et sorties d'eau et de Na^+ (couplé au chlorure Cl^-). Le rein joue un rôle majeur dans la régulation du volume intravasculaire et de sa constitution ionique en ajustant l'excrétion urinaire de sel et d'eau en fonction des apports. Ainsi, une variation de la natrémie s'accompagne d'une variation proportionnelle au volume plasmatique. Par exemple, une hypernatrémie par déséquilibre en bilan sodé augmente la rétention rénale d'eau. Il en résulte une hypervolémie et, par conséquent, une hypertension artérielle. Le maintien de l'équilibre acido-basique représente une autre tâche principale du rein, qui permet à cet équilibre de résister en permanence à des agressions d'origines métaboliques et respiratoires, ainsi qu'aux sources alimentaires riches en protéines qui constituent une source importante d'ions hydronium H_3O^+ (résultant des oxydations des acides aminés sulfurés). Le pouvoir tampon de l'organisme est ainsi maintenu par le rein qui assure l'excrétion quotidienne de la charge acide produite par le métabolisme cellulaire et la régénération de bicarbonate HCO_3^- qui forment le système tampon majeur stabilisant le pH.

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Il comporte un filtre, le glomérule de Malpighi, poursuivi par 12 segments tubulaires successifs qui se distinguent morphologiquement et fonctionnellement. Le sang est filtré à travers la paroi des capillaires du glomérule, et le liquide filtré est l'urine primitive. L'activité de transport d'eau et de solutés effectuée par les différents segments du néphron aboutit, en modifiant l'urine primitive, à l'urine définitive, un liquide ajusté au maintien de la composition du milieu intérieur. Parmi ces segments, la branche large ascendante de l'anse de Henle joue un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre acido-basique, en assurant, d'une part, la réabsorption d'une fraction

importante de bicarbonate filtré par le glomérule et, d'autre part, en réabsorbant les ions ammonium NH_4^+ délivrés par le tubule proximal. Elle contribue aussi aux mécanismes de concentration/dilution de l'urine en réabsorbant une partie remarquable du NaCl filtré. L'acteur principal qui réabsorbe la quasi-totalité de NaCl transportée par ce segment et réabsorbe les ions NH_4^+ produits par le tubule proximal est le co-transporteur des ions $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$, NKCC2, qui fait l'objet de notre étude.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires responsables de la régulation de l'expression et du trafic intracellulaire de NKCC2. Dans cette introduction, nous allons évoquer les différents rôles de la branche large ascendante et surtout ceux qui sont effectués par le co-transporteur NKCC2 dans la fonction rénale. Nous discuterons également les différentes caractéristiques cellulaires et moléculaires de la protéine NKCC2 établies jusqu'à ce jour, ainsi qu'aux effets de son dysfonctionnement physiopathologique.

1. Contribution de la branche large ascendante à l'homéostasie hydro-électrolytique et acido-basique

1.1. Description de la branche large ascendante

La branche large ascendante (BLA) se situe au bout de l'anse de Henle localisée entre la fin du tubule proximal et le début de tubule distal. L'anse de Henle comprend quatre parties différentes : la branche large descendante suivie par la branche fine descendante s'enfonçant dans la profondeur de la médullaire en forme d'une épingle à cheveux, poursuivie par la branche fine ascendante qui se transforme brutalement en BLA. La BLA se subdivise en un segment médullaire (BLA_m) et un segment cortical (BLA_c) plus ou moins long selon le type du néphron (cortical ou juxtamédullaire) (**Figure 1**).

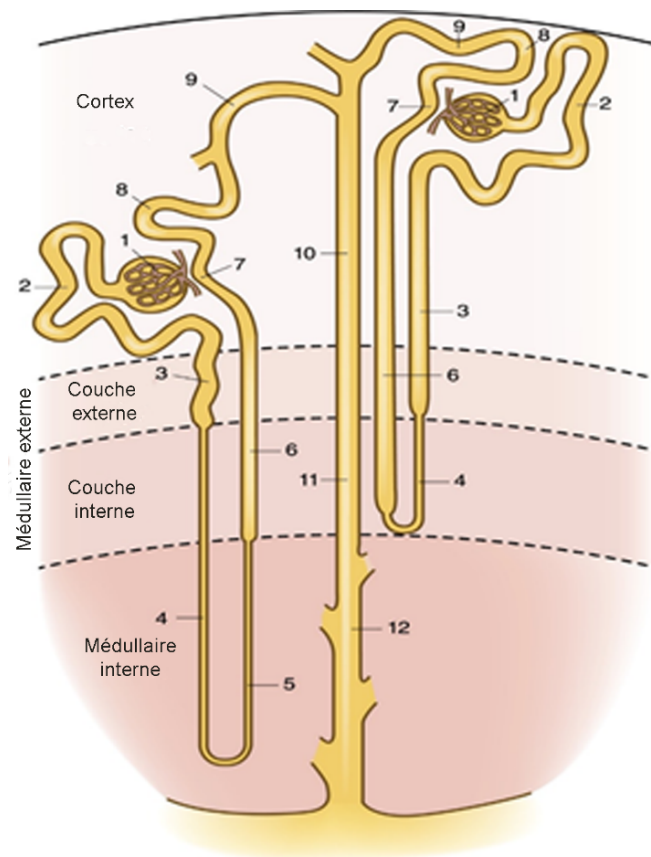


Figure 1 Représentation schématique de la structure du néphron, montrant les deux types de néphron : juxtamédullaire (à gauche) et cortical (à droite). Les différents segments tubulaires sont notés de la manière suivante : 1, Glomérule ; 2, tubule contourné proximal ; 3, branche large descendante ; 4, branche fine descendante ; 5, branche fine ascendante ; 6, branche large ascendante ; 7, macula densa ; 8, tubule contourné distal ; 9, tubule connecteur ; 10, canal collecteur cortical ; 11, canal collecteur médullaire externe ; 12, canal collecteur médullaire interne. Modifié à partir de Mount 2014 (2).

Les cellules hautes de l'épithélium de la BLA diminuent en taille régulièrement de la médulla vers le cortex. La microscopie électronique à balayage a révélé la présence de deux

populations de cellules formant l'épithélium de la branche large ascendante : des cellules rugueuses dont la membrane apicale présente des microvillosités longues en contact avec la lumière tubulaire, et des cellules lisse où les microvillosités sont très petites. Les cellules lisses caractérisent le segment médullaire, qui présente de nombreuses et profondes invaginations à la membrane basolatérale, dont les secteurs intracellulaires sont riches en mitochondries orientées parallèlement à la membrane. Quant aux cellules rugueuses, elles caractérisent le segment cortical de la BLA avec une membrane basolatérale moins développée (2, 7). En revanche dans les deux segments (cortical et médullaire), des jonctions serrées scellent les cellules (2).

1.2. Réabsorption d'électrolytes par la branche large ascendante

L'épithélium de la BLA assure un transport actif des ions. Il est à peine perméable à l'eau (< 1% de la perméabilité à l'eau au tubule proximal) et imperméable à l'urée, une propriété des jonctions serrées intercellulaires, conférant à la BLA sa spécificité de diluer l'urine. Pourtant, ces jonctions présentent une très grande perméabilité aux ions, particulièrement, aux cations (8, 9).

La BLA joue un rôle crucial dans l'homéostasie électrolytique. Elle contribue aussi à l'équilibre acido-basique en réabsorbant une grande quantité de HCO_3^- et de NH_4^+ . Ainsi, La BLA est le siège de réabsorption d'importantes quantités de Na^+ filtré et de Cl^- , participant par conséquent à l'homéostasie hydrique (en contrôlant les mécanismes de concentration/dilution urinaire). Elle réabsorbe également une quantité importante des cations bivalents (calcium Ca^{2+} et magnésium Mg^{2+}).

1.2.1. Rôle de la BLA dans le maintien de l'équilibre acido-basique

La BLA contrôle la régulation du statut acido-basique, d'une part en réabsorbant la majorité de NH_4^+ délivré par le tubule proximal, d'autre part en réabsorbant la majorité de HCO_3^- qui n'a pas été réabsorbé par le tubule proximal.

a) Réabsorption de NH_4^+

La concentration urinaire en H_3O^+ libre est minime. En conséquence, l'excrétion de la charge acide se fait majoritairement sous la forme de NH_4^+ (10). La faible concentration plasmatique de NH_4^+ résulte en une filtration négligeable de NH_4^+ par le glomérule (11, 12). En effet, la quasi-totalité de NH_4^+ présent dans l'urine définitive résulte plutôt du métabolisme de la glutamine dans les cellules du tubule proximal (10).

Buerkert *et al* ont évalué la contribution *in vivo* de l'anse de Henle dans l'excrétion de NH_4^+ en utilisant essentiellement la microponction tubulaire (11). Ces études ont montré que la quantité de NH_4^+ collectée à l'entrée du tubule distal ne correspond pas à celle qui est retrouvée à la sortie du tubule proximal bien que présente dans l'urine définitive. La présence d'une réabsorption de NH_4^+ dans l'anse Henle a été suggérée suite à ces observations, en lui permettant de court-circuiter le tubule distal et de s'infiltrer directement dans le canal collecteur. D'autres travaux ont montré que le tubule proximal contribue à la synthèse et à la sécrétion et non à la réabsorption de NH_4^+ (13). Des expériences de microperfusion du tubule isolé *in vitro* ont montré que cette réabsorption s'accomplissait principalement dans la BLA corticale et médullaire (14). En effet, le taux de réabsorption de NH_4^+ par la BLA microperfusée est suffisant pour justifier la totalité de NH_4^+ réabsorbé dans l'anse de Henle *in vivo* (15). La réabsorption nette de NH_4^+ dans les cellules de la BLA a été localisée suite à ces observations. Plus récemment, des études ont prouvé que ce transport de NH_4^+ s'effectue selon un mode transcellulaire actif responsable de 65 à 80% de la réabsorption totale dans la BLA_m (16-18). NH_4^+ possède un rayon ionique semblable à celui de l'ion potassium K^+ . Par conséquent, les ions NH_4^+ peuvent être transportés d'une manière active par les transporteurs de K^+ dans la BLA (coté apical, NKCC2 et ROMK, coté basolatéral, NHE4, KCC4 et la pompe Na^+/K^+ ATPase)(17, 19). Le transport de NH_4^+ par NKCC2 sera discuté et développé plus tard. Outre cette voie transcellulaire, une voie paracellulaire passive est aussi présente et responsable de la réabsorption d'environ 35% de NH_4^+ (14) (Figure 2). Cette réabsorption passive est gérée par le potentiel transépithélial, lumière positive de la BLA, et générée par le transport électrogénique de NaCl dépendant du cotransport $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (16).

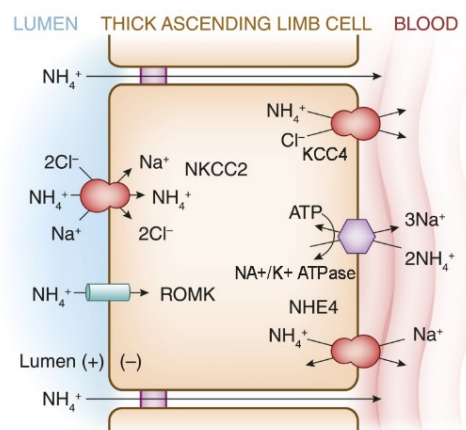


Figure 2 Représentation schématique de la voie de transport de NH_4^+ dans la BLA (2).

Le gradient cortico-médullaire, créé par les transports actif et passif de NH_4^+ au niveau de la BLA, permet l'excrétion de la charge nette d'acide dans l'urine définitive. Suite à cette réabsorption, $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ s'accumule dans le tissu interstitiel médullaire externe. De plus, la branche fine ascendante reçoit une partie du NH_4^+ réabsorbé par la BLA en s'accumulant aussi sous forme d'ammoniac NH_3 dans le liquide interstitiel. Par conséquent, la concentration de NH_3 dans le liquide interstitiel médullaire devient plus élevée que celle du canal collecteur, autorisant son passage direct dans le canal collecteur. La combinaison de NH_3 aux ions H_3O^+ , sécrétés essentiellement par la pompe H^+/ATPase du canal collecteur, forme les ions NH_4^+ retrouvés dans l'urine ($\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}$). De cette manière, la conversion de NH_3 en NH_4^+ favorise le passage de NH_3 du liquide interstitiel vers le canal collecteur. Donc, la BLA contribue à la régulation de l'état acide-base de l'organisme en régulant la quantité de NH_4^+ excrété.

b) Réabsorption de bicarbonates (HCO_3^-)

La réabsorption de HCO_3^- dans l'anse de Henle a été le sujet de plusieurs études réalisées chez le rat (14, 20) et la souris (21) en utilisant la microponction. Les auteurs de ces travaux avaient trouvé que le pH et la concentration de HCO_3^- étaient semblables à la fin du tubule proximal et au début du tubule distal malgré la réabsorption de NH_4^+ . Ces résultats ont favorisé l'hypothèse de l'existence d'une réabsorption de HCO_3^- dans l'anse de Henle. Cette hypothèse a été confirmée en utilisant des manipes de microperfusion des BLA du rat *in vitro* (20). Il a été démontré aussi que la réabsorption de HCO_3^- dans la BLA nécessite une activité de l'anhydrase carbonique et d'un transport sodé couplé à la sortie d'un ion H^+ du côté apical ; elle est pourtant indépendante du voltage transépithélial (20). Ainsi, la présence d'un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, d'un cotransporteur $\text{K}^+-\text{HCO}_3^-$ (probablement effectué par le cotransporteur KCC4) et d'un échangeur Na^+/H^+ du côté basolatéral de la BLA est importante pour la sortie des ions HCO_3^- (22). D'autres études ont montré que la BLA assure la réabsorption de 15% de bicarbonates filtrés par le glomérule (23).

L'ensemble de ces données illustrant le rôle de la BLA d'une part dans la réabsorption de HCO_3^- et, d'autre part, dans le transport de NH_4^+ vers l'interstitium médullaire participant à l'excrétion de la charge acide dans l'urine définitive, démontre le rôle crucial que ce segment assure dans le maintien de l'équilibre acido-basique.

1.2.2. Rôle de la BLA dans la réabsorption de NaCl

La BLA joue un rôle primordial dans le mécanisme de concentration/dilution de l'urine, en assurant un transport actif et passif de NaCl. En effet, la BLA est le segment qui réabsorbe ~ 25% de NaCl filtré, en diluant le fluide tubulaire. Cette dilution du fluide tubulaire se doit aux cellules de la BLA qui sont hautement imperméables à l'eau.

Plusieurs observations ont démontré la présence d'un processus de transport de NaCl, qui s'effectue au niveau de la BLA. D'une part, les expériences de microponction des tubules proximaux et distaux ont révélé que la concentration en NaCl était plus faible dans le fluide sortant de la BLA et que le plasma était hypertonique par rapport à ce fluide (24). D'autre part, l'usage de la technique de microperfusion *in vitro* des différents segments isolés a permis d'examiner directement les caractéristiques de transport de la BLA. Grâce à cette méthode, Burg *et al* (25) et Rocha *et al* (26) ont révélé que la BLA est hautement perméable vis-à-vis du NaCl, malgré une très faible perméabilité à l'eau (27). L'inhibition du transport de NaCl dans la BLA, lorsque Na^+ (28, 29) ou Cl^- (25, 26, 28, 29) est éliminé du liquide perfusé, prouve que le transport de Cl^- est couplé à celui du Na^+ . Cette réabsorption de NaCl est un transport secondairement actif. En effet, l'absorption de Cl^- dans la BLA s'effectue contre son gradient électrochimique transépithélial ; en outre, l'inhibition de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, par son inhibiteur spécifique l'ouabaïne, abolit l'absorption de NaCl (25, 30). Dans la partie médullaire et corticale de la BLA, le mécanisme global de réabsorption de NaCl est semblable, et il se réalise de la façon suivante : l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase basolatérale, qui pompe le sodium intracellulaire vers l'interstitium, maintient le gradient électrochimique de Na^+ au niveau de la membrane apicale. Suite à ce transport, la concentration de Na^+ intracellulaire diminue, entraînant une différence de concentration en Na^+ intracellulaire et luminale, permettant par suite d'engendrer une réabsorption apicale de NaCl secondairement active à partir de la lumière tubulaire vers la cellule ; la réabsorption de NaCl par BLA est donc un transport active. Cependant, il existe un transport paracellulaire passif de Na^+ , parallèle à cette voie active dans la BLA. Les études réalisées dans les BLA_m de souris ont montré que l'inhibition du transport actif de NaCl, en bloquant spécifiquement les mécanismes impliqués dans la voie transcellulaire, n'a pas complètement aboli la réabsorption de Na^+ au niveau de la BLA. Ainsi, la contribution de la voie paracellulaire passive dans le transport de Na^+ a-t-elle été estimée grâce à ces études. Cette voie participe à 50% de la réabsorption nette de cet ion (31, 32).

L'accumulation de NaCl, réabsorbé par ces deux voies de transport dans la BLA, dans l'interstitium médullaire crée un gradient osmotique progressif vers l'interstitium. Cette réabsorption effectuée sans eau résulte en un fluide qui, émergeant de la BLA, est hypo-osmotique. Dans le cas de diurèse, en absence de la sécrétion d'ADH, le canal collecteur est faiblement perméable à l'eau, menant à l'excrétion d'une urine diluée. Néanmoins, dans des conditions d'antidiurèse, la sécrétion d'ADH augmente la réabsorption de NaCl au niveau de la BLA_m, induisant un gradient de concentration cortico-médullaire et augmentant la perméabilité à l'eau (mais pas à l'urée) au niveau des canaux collecteurs corticaux et médullaires externes (33-35). La différence osmotique entre la lumière tubulaire et l'interstitium permet donc la réabsorption de l'eau. Il en résulte une excrétion d'urine concentrée.

1.2.3. Transport des autres ions

En plus des fonctions mentionnées plus haut, la BLA joue un rôle fondamental dans la régulation de la balance des cations bivalents (Ca^{++} et Mg^{++}) (36). En effet, ce segment réabsorbe 40% de Ca^{++} et 60% de Mg^{++} filtrés (37). Il est vraisemblable que ce transport se réalise exclusivement par voie paracellulaire, ainsi qu'il dépend fortement de la réabsorption de NaCl. En effet, la réabsorption de NaCl effectuée par le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ de la lumière tubulaire vers la cellule est déterminée par l'activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ située à la membrane basolatérale qui pompe le Na^+ dans le milieu interstitiel. En parallèle, Cl^- traverse la membrane basolatérale vers l'interstitium par un mode K^+-Cl^- (KCC4) et/ou par conductance de Cl^- (CLC-NKB). Ce mécanisme aboutit par conséquent à une différence de potentiel transépithéliale (lumière tubulaire positive), constituant l'énergie électrique qui va permettre aux ions Ca^{++} et Mg^{++} de diffuser passivement par l'intermédiaire des jonctions intercellulaires serrées hautement perméables aux cations.

Nous avons présenté dans cette partie le rôle fondamental assuré par la BLA dans le maintien de l'équilibre acido-basique ainsi que dans le maintien de l'homéostasie hydrique de l'organisme. Le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$, NKCC2, situé à la membrane apicale des cellules de la BLA, est l'élément primordial pour accomplir toutes ces fonctions rénales.

2. Le co-transporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$

Le co-transporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ fait partie de la famille des co-transporteurs cations-chlorure électroneutres (Cations-Chloride-Cotransporters CCC), formée de transporteurs ioniques transmembranaires où le transport des ions Na^+ et/ou K^+ est toujours couplé aux ions Cl^- . Cette famille comporte neuf membres codés par une famille génétique nommée SLC12 (Solute Carriers). La famille SLC12 est divisée en deux branches principales définies, non seulement par leurs propriétés de transports, mais aussi par leur homologie de séquence. La première branche est Na^+ -dépendant, composée de trois membres dont deux co-transporteurs $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (SLC12A1/NKCC2, spécifique du rein exprimé à la membrane apicale et SLC12A2/NKCC1, ubiquitaire exprimé à la membrane basolatérale) sensibles au furosémide, et un troisième transporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ sensible aux thiazides (SLC12A3/NCC spécifique du rein exprimé à la membrane apicale). La deuxième branche est Na^+ -indépendant, constituée de quatre transporteurs $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ sensibles aux acides alcanoniques dihydroindenyloxyques (SLC12A4-A7/KCC1-4). Ainsi, la famille de SLC12 comporte-t-elle deux membres (SLC12A8/CCC9 et SLC12A9/CIP) dont la fonction et le substrat sont méconnus (3, 38) (Figure 3).

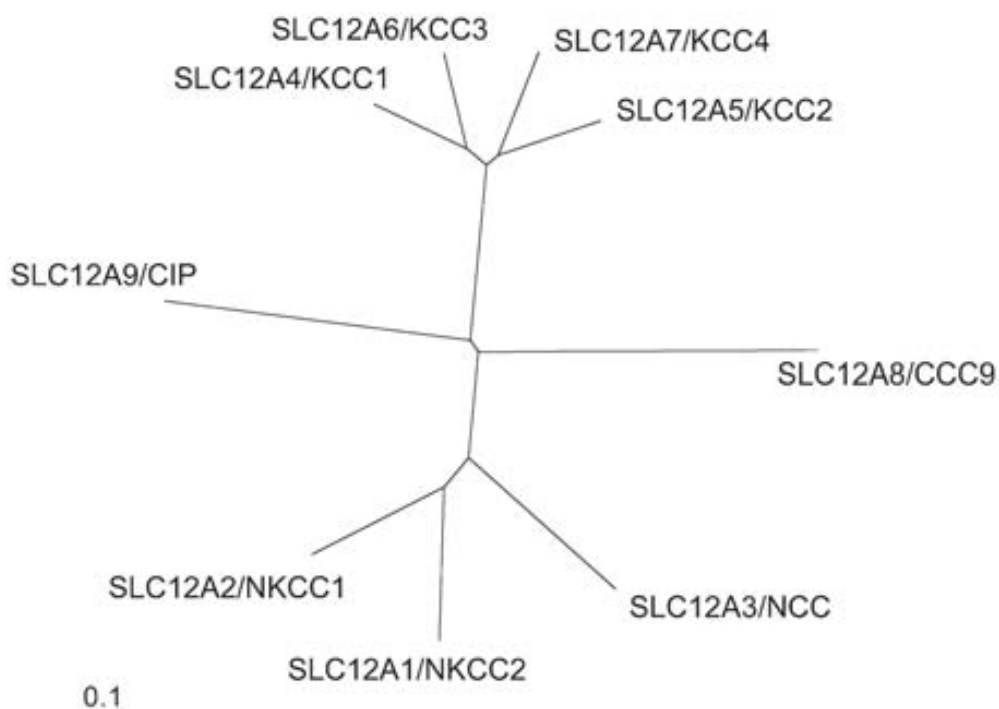


Figure 3 Arbre phylogénétique de la famille SLC12 (3).

2.1. Historique de la découverte du co-transport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ dans la BLA

2.1.1. Description d'une activité de co-transport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$

Au début des années 1960s, la découverte du furosémide et de son effet sur le gradient de sodium rénal médullaire a permis l'identification de la réabsorption de Na^+ au niveau de la BLA (39-41). De plus, Rocha et Kokko (26) ont montré en 1973 que ce transport de sodium dans la BLA du lapin est couplé au chlorure. Quelques années plus tard, en 1981, Greger (28) et Schlatter (42), ont démontré l'importance de la présence de K^+ pour le transport actif de NaCl dans la BLA, et que ce transport était sensible au furosémide. En même temps, Geek *et al* (43) ont révélé pour la première fois, dans les cellules tumorales non-polarisées (cellules d'Ehrlich), l'existence du même type de co-transport actif de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ sensible au furosémide. Ainsi, les propriétés fonctionnelles qui caractérisent ces co-transporteurs ont-elles été déterminées : 1) le co-transport est électroneutre ; 2) la stœchiométrie de ce co-transport est $1\text{Na}^+ 1\text{K}^+ 2\text{Cl}^-$; 3) ce système de co-transport est sensible aux diurétiques de l'anse (furosémide et bumétanide) (44, 45).

2.1.2. Localisation apicale du co-transporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$

Compte tenu de toutes ces observations sus-décrites, des études de perfusion *in vitro* ont été effectuées sur des segments de la BLA isolée (46). L'ensemble de ces études a donc permis d'y localiser un système de co-transport des ions Na^+ , K^+ , Cl^- similaire à celui observé dans les hématies (47). De plus, Eveloff et Kinne (48) ont localisé un système de co-transport de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ du côté apical de la BLA de lapin, en utilisant des préparations de vésicules membranaires de segments isolés de BLA ; ils ont noté que la présence luminale de Na^+ est essentielle pour cette réabsorption. Ces auteurs et d'autres se sont basés sur le fait que le retrait du Na^+ ou du K^+ du liquide de perfusion diminue le taux de transport de NaCl (73, 74, 102).

L'ensemble de ces données a donc permis de définir le modèle actuel de co-transport de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ actif et apical au niveau de l'épithélium de la BLA.

2.1.3. Mécanisme du co-transport de Na^+ - K^+ - 2Cl^- dans les cellules épithéliales de la BLA

La réabsorption transépithéliale des ions Na^+ , K^+ et Cl^- est engendrée par l'activité de la pompe basolatérale Na^+/K^+ ATPase qui maintient la concentration de Na^+ intracellulaire faible pendant le transportant vers l'interstitium, et la concentration de K^+ élevée pendant le transportant vers la cellule. Le potassium réabsorbé par NKCC2 est recyclé dans la lumière tubulaire par le canal potassique apical (ROMK [Renal Outer Medullary Kalium channel]), et le chlore est transporté par les canaux chlorure basolatéraux (CLC-Kb) vers l'interstitium. La sensibilité de ces transporteurs aux inhibiteurs a mis en évidence leur implication dans ce système de transport. L'inhibition des canaux potassiques apicaux par l'ajout du Baryum dans la lumière tubulaire abolit le transport de Na^+ , K^+ et Cl^- , ainsi qu'une faible concentration luminaire de K^+ diminue aussi ce transport. Parallèlement, l'adjonction d'un inhibiteur des canaux Cl^- ou un faible taux de Cl^- luminal réduit le transport de Na^+ , K^+ et Cl^- . Ainsi, une activité continue de co-transporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ dans la BLA nécessite le recyclage de K^+ accompagné de la baisse de la concentration de NaCl intracellulaire (Figure 4).

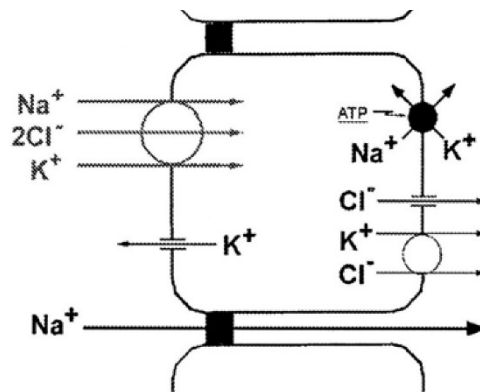


Figure 4 Mécanisme du transport de $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ dans les cellules épithéliales de la BLA.

2.1.4. Transport de NH_4^+ par le cotransporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$

En 1984, Good et al (14), ont étudié la contribution de la BLA à la régulation de l'ammonium rénal, en effectuant des expériences de microperfusion sur des segments de la BLA de rat isolés, ils ont constaté une réabsorption active des ions NH_4^+ par le co-transporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$. Cette observation a été soutenue par des études supplémentaires, parmi lesquelles les suivantes :

- 1) L'ajout du furosémide, un inhibiteur du co-transport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, inhibe l'absorption propre nette de NH_4^+ dans la BLA corticale et médullaire de rat et aussi dans la BLAm de lapin et de souris (18, 49) ;
- 2) Des études sur des vésicules membranaires apicales préparées à partir de cellules de La BLAm de lapin montrent une compétition directe entre NH_4^+ et K^+ vis-à-vis d'un site commun du co-transport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (50) ;
- 3) L'inhibition spécifique du transport actif de NH_4^+ dans la BLAm de rat par augmentation de la concentration luminale de K^+ (16, 51) ;
- 4) L'absorption de $^{22}\text{Na}^+$, sensible au bumétanide, en présence d'un gradient de NH_4Cl est presque identique lors de la présence d'un gradient de KCl (50) ;
- 5) L'absorption active de chlorure a été maintenue lorsque le NH_4^+ a entièrement remplacé le K^+ dans la solution de perfusion sur des BLAm de lapin, indiquant que le NH_4^+ se substitue au K^+ dans le système de co-transport apical de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ et la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ basolatérale (18).

2.2. Caractéristiques moléculaires de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$

2.2.1. Clonage du gène

Après la découverte des mécanismes du co-transport électroneutre, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ dans des cellules et des tissus de mammifères, plusieurs laboratoires ont entrepris des tentatives non récompensées pour identifier les gènes qui codent pour ces co-transporteurs. Ce n'est qu'en 1994 que Forbush *et al* (52) ont réussi à isoler le gène SLC12A2 codant pour BSC2 (Bumetanide Sensitive Cotransporter), le co-transporteur ubiquitaire basolatéral de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, nommé aussi NKCC1, à partir d'une banque d'ADNc de la glande rectale du requin (un modèle des épithéliums sécrétoires connus par leur richesse en protéines de cotransport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$), en utilisant des anticorps monoclonaux préparés pour ce but. Ce clone a été ensuite utilisé afin d'identifier les orthologues chez les mammifères. Dans la même année, Payne et Forbush (53), ont identifié les trois isoformes (A, B et F) de l'autre co-transporteur apical spécifique du rein à partir d'une banque médullaire et corticale chez le lapin. La sonde utilisée était conçue à partir d'ADNc de NKCC1 extraite de la lignée cellulaire T84 du colon humain.

Simultanément, Gamba *et al* (54), en se basant sur l'homologie de séquences, ont criblé en 1994 une banque d'ADNc du rat (médullaire externe et cortex) en utilisant des sondes

d'ADNc de la région codante de co-transporteur NCC de la vessie d'un poisson, la plie rouge (fITSC, flounder thiazide-sensitive cotransporter) ; ils ont identifié le co-transporteur BSC1 (Bumétanide Sensitive Cotransporter 1) ou NKCC2. Le groupe de Gamba a par la suite confirmé, en effectuant des études dans les ovocytes de Xénope, que l'activité de transport de NKCC2 est dépendante des ions Na^+ , Cl^- et du $^{86}\text{Rb}^+$ (un traceur radioactif de K^+), et sensible au Bumétanide. Le gène codant pour NKCC2 a été ensuite identifié dans d'autres espèces comme le requin (55), la souris (56) et l'homme (57).

Il faut savoir que NKCC1 et NKCC2 sont codés par deux gènes localisés dans des régions dissemblables du génome (58). Le gène codant pour NKCC2 est situé au niveau du chromosome 15 au locus q15-q21 (57), alors que celui codant pour NKCC1 est localisé sur le chromosome 5 au locus q31-q33 chez l'homme (59, 60).

2.2.2. La protéine NKCC2

a) Structure primaire et secondaire de la protéine NKCC2

Selon l'étude réalisée chez le rat par Gamba *et al* en 1994 (54), la taille totale du transcrite de NKCC2 est d'environ 4,6 kb, dont la région codante est de 3,3kb, ce qui prédit une protéine de 1095 a.a.. Les caractéristiques des transcrits de NKCC2 chez d'autres espèces y compris l'homme (57), le lapin (53), le souris (56, 61) et le requin (55), sont présentés dans le Tableau 1.

La topologie de NKCC2 a été prédite en se basant sur l'homologie de séquences qu'elle partage avec les autres co-transporteurs de la même famille CCC (NKCC1 et NCC). D'après Gamba *et al* (54), en 1994, des analyses du profil d'hydrophobicité et de traduction *in vitro* ont suggéré que les co-transporteurs électroneutres Na^+ - (K^+) - Cl^- disposent de trois domaines distincts. Chez le rat, la protéine NKCC2 comporte une extrémité NH_2 terminale hydrophile d'environ 174 a.a. poursuivie par une région centrale hydrophobe constituée de douze domaines transmembranaires d'environ 467 a.a., et une région hydrophile COOH terminale d'environ 454 a.a. (**Figure 7**).

Tableau 1 les caractéristiques des transcrits de NKCC2 chez les différentes espèces

| Espèce | Isoformes | Transcrit, kb | Région codante, kb | Nombre des a.a. | Référence |
|--------|-----------|---------------|--------------------|-----------------|-----------|
| Homme | hNKCC2 | 3,362 | 3,297 | 1099 | (57) |
| Lapin | A, B, F | 4,750 | 3,300 | 1099 | (53) |
| Rat | rBSC1 | 4,546 | 3,285 | 1095 | (54) |
| Souris | A, B, F | 4,655 | 3,285 | 1095 | (56) |
| | mBSC1-L | 4,605 | 3,285 | 1095 | (61) |
| | mBSC1-S | 2,968 | 2,310 | 770 | (61) |
| Requin | A,F | 4,376 | 3,285 | 1095 | (55) |

En 1995, Igarashi *et al* (56), ont établi une structure similaire pour NKCC2 chez la souris. À noter que la séquence protéique de NKCC2 est hautement conservée avec les deux autres co-transporteurs Na^+ - (K^+) - Cl^- (NKCC1 et NCC) à l'exception du domaine NH_2 terminal qui est identique seulement à 60% à celui de NKCC1, ainsi qu'entre les différentes espèces. Deux sites putatifs de N-glycosylation (N442 et N452) se situent dans la boucle hydrophile extracellulaire entre les deux segments transmembranaires 7 et 8. Plusieurs sites de phosphorylation prédits sont conservés entre les différentes espèces, dont certains ont été le sujet de plusieurs études (Figure 5) (62). À savoir qu'à ce jour, la structure secondaire de NKCC2 est prédite et alors que la topologie de NKCC1 est basée sur des données expérimentales (4).

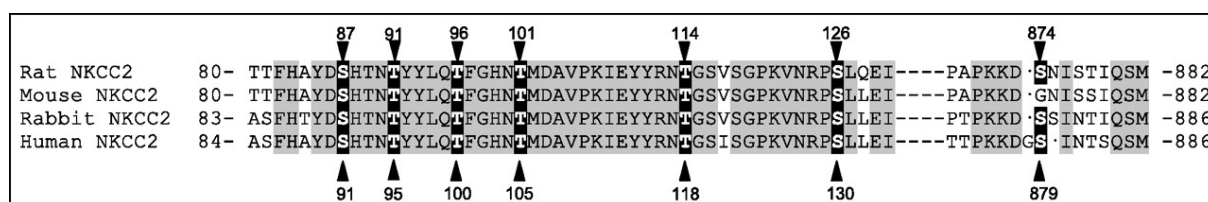


Figure 5 Alignement de séquences indiquant plusieurs sites de phosphorylation de NKCC2 chez les différentes espèces (62).

2.2.3. Les isoformes de NKCC2

a) Les mécanismes d'épissage

L'ARNm de NKCC2 subit deux phénomènes indépendants d'épissage, menant au moins à six isoformes :

En 1994, Payne et Forbush (53), ont observé le premier événement d'épissage lorsqu'ils ont cloné NKCC2 à partir du rein du lapin. D'autres ont montré que le même mécanisme existait chez la souris (56), le rat (63) et l'homme (64). Ce mécanisme d'épissage se produit à l'exon 4, une région constituée de 3 cassettes désignées par les lettres A, B et F comprenant chacune 96 paires de bases. Chaque cassette code pour 32 acides aminés qui correspondent à la deuxième moitié du domaine transmembranaire prédit, et à la première boucle hydrophile intracellulaire reliant les deux domaines transmembranaire TM2 et TM3 (**Figure 7**). Durant cet événement d'épissage, un seul exon 4A, 4B ou 4F est gardé dans la séquence de l'ARNm. Ce variant de l'exon 4 relie donc l'exon 3 à l'exon 5. Suite à ce phénomène, trois protéines différentes sont produites et sont nommées NKCC2-A, B et F, en fonction de l'exon gardé. Outre ces 3 isoformes, trois autres transcrits ont été détectés chez l'homme avec une combinaison des exons 4A et 4B, 4A et 4F ou 4B, 4A et 4F (**Figure 6,7**) (5).

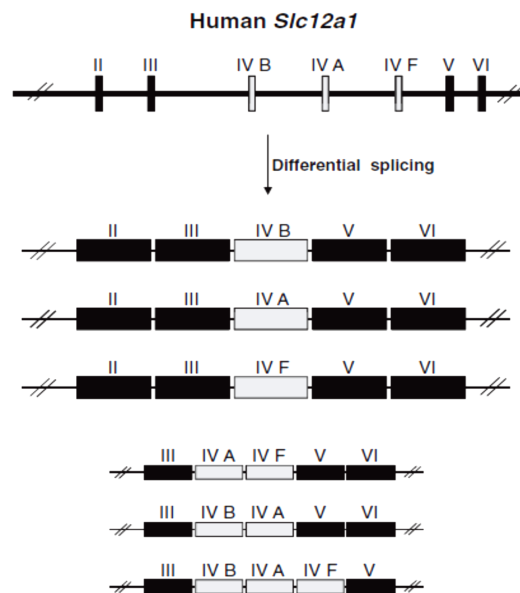


Figure 6 L'épissage alternatif de l'exon 4 de préARNm NKCC2 chez l'homme (5).

Le second événement d'épissage a été observé chez la souris par Mount *et al* en 1999 (61). Il a été produit par la présence d'une séquence de polyA dans l'intron situé entre les exons 16 et 17, en plus de la séquence poly-A que l'on trouve à l'extrémité 3' de l'ARNm, prédisant une protéine avec un domaine C-terminal plus court. Deux protéines de NKCC2, qui diffèrent par la longueur et la séquence de l'extrémité C-terminale, sont donc produites par ce mécanisme d'épissage indépendant de l'épissage de l'exon 4. Le domaine C-terminal de l'isoforme longue de NKCC2 (L- NKCC2, L : long), prédit être cytoplasmique, a une longueur de 457 résidus d'acides aminés dont les 383 derniers sont absents dans l'isoforme courte de NKCC2 (S-NKCC2, S : short). En revanche, l'extrémité C-terminale de l'isoforme S-NKCC2 est composée de 129 résidus d'acides aminés dont les 55 derniers sont absents dans l'isoforme

L- NKCC2. Les 74 premiers présentent la région commune conservée entre les deux isoformes (Figure 7).

Mount *et al* ont prouvé que ces deux phénomènes d'épissage sont indépendants l'un de l'autre dans le rein de souris. Ainsi, la combinaison de ces deux mécanismes produit au moins six isoformes : trois isoformes longues (L-NKCC2 A, B et F) et trois autres courtes (S-NKCC2 A, B et F).

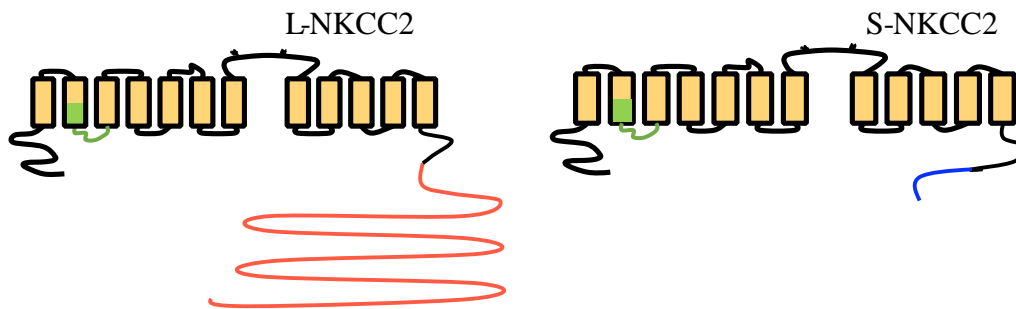


Figure 7 Topologie proposée pour les variants d'épissage de NKCC2. En vert, la région codée par l'exon 4, en rouge, le domaine carboxy-terminal absent dans S-NKCC2 et en bleu le domaine absent dans L-NKCC2.

Comme susmentionné, les trois isoformes de la protéine NKCC2 A, B et F diffèrent seulement par la deuxième moitié du second domaine transmembranaire et la boucle intracellulaire reliant les deux domaines transmembranaires TM2 et TM3. En effet, on distingue trois a.a. qui ne sont pas conservés entre les isoformes : trois résidus sont spécifiques de l'isoforme A, un résidu est spécifique de l'isoforme B, et quatre résidus sont propres à l'isoforme F (Figure 8). Ces résidus sont hautement conservés entre les espèces.



Figure 8 Les trois isoformes de NKCC2 : A, B et F (1). Séquences en acides aminés des exons 4 A, B et F de NKCC2 de souris. En rouge, les acides aminés différents entre les trois isoformes. En orange, les acides aminés exclusivement présents dans l'isoforme A. En bleu, ceux uniquement présents dans B. En vert, ceux propres à l'isoforme F.

b) Localisation des différentes isoformes dans la BLA :

La localisation restreinte de NKCC2 dans le rein a été déterminée suite à de nombreuses études. Initialement, des analyses par immunomarquage et liaison de l'analogue photosensible de bumétanide [³H]BSTBA effectuées par Haas *et al* en 1991 (65) dans le rein de souris ont isolé deux protéines de 75kDa et 150kDa, qui correspondent à la taille des isoformes de S-NKCC2 et L-NKCC2 découvertes plus tard (61). Plus récemment, des expériences de Northern Blot,

d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, ont montré l'expression de NKCC2 à la membrane apicale des cellules épithéliales de la BLA (médullaire externe et corticale) du rein des rats (54, 66).

Quant à la distribution des différentes isoformes dans la BLA, des études de Northern Blot et de RT-PCR ont révélé une hétérogénéité d'expression de ces protéines dans la BLA de souris. Ces études ont montré que l'isoforme L-NKCC2 est exprimée d'une manière plus ou moins homogène dans la partie médullaire et corticale, tandis que l'isoforme S-NKCC2 est essentiellement exprimée dans la partie médullaire de la BLA (61, 66). Aussi des expériences d'immunofluorescence ont montré que les deux isoformes s'expriment à la membrane apicale des cellules épithéliales de la BLA (61) (**Figure 9**).

En ce qui concerne les isoformes A, B et F, des analyses par immunolocalisation et hybridation *in situ* montrent une distribution hétérogène le long de la BLA : A présente une localisation à la fois dans la partie médullaire et corticale, F n'est exprimée que dans la région médullaire, alors que l'isoforme B est limitée au *macula densa* (cortex) (56) (**Figure 9**).

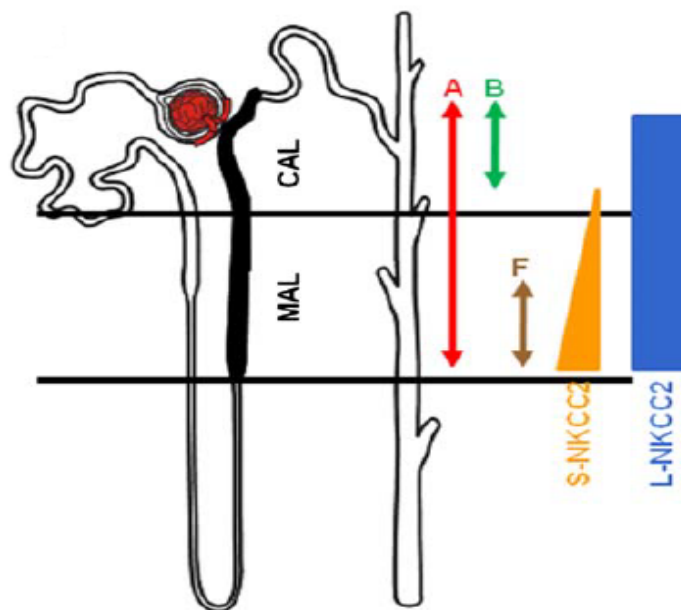


Figure 9 La distribution des différentes isoformes de NKCC2 dans la BLA (4).

2.3. Fonctions de NKCC2 dans la Physiologie Rénale

2.3.1. Propriétés fonctionnelles des différentes isoformes de NKCC2

a) Les isoformes longues A, B et F

- **Les études d'expression :**

La majorité des données portant sur les caractéristiques du transport des différentes isoformes de NKCC2, exprimées dans la BLA, s'appuie sur des études d'expression hétérologue effectuées dans les ovocytes de xénope. De nombreuses analyses fonctionnelles des isoformes A, B et F de NKCC2 montrent que le second domaine transmembranaire TM2 est impliqué dans la liaison et la translocation des ions. En 1983, Forbush *et al* (67) et Haas *et al* (68) ont révélé que le bumétanide entrait en compétition avec le Cl^- et se liait aux sites de dernier. D'autres études effectuées chez la souris (69) et chez le lapin (70), ont montré que les différentes isoformes de NKCC2 présentaient des affinités variables (NKCC2 B > A > F) vis-à-vis des ions Na^+ , K^+ et Cl^- . Ainsi, l'affinité de B pour la bumétanide est plus élevée que celle de A et F (69). Ces résultats ont suggéré que les résidus variant entre les trois isoformes, qui se situent dans la seconde moitié de TM2 et/ou dans la boucle intracellulaire reliant TM2 et TM3, contribuent au processus de transport. Gagnon *et al* (71) ont déterminé les résidus impliqués dans la différence d'affinité ionique entre A et F en mutants certains résidus variants entre les deux isoformes. De la même manière, Giménez et Forbush (72) ont observé que la mutation des résidus variables de l'isoforme B par ceux de A ou F altère les propriétés du transport de B vers celles de A ou F respectivement. Ces expériences ont montré que la seconde moitié de TM2 avait une affinité élevée pour les cations et le bumétanide, tandis que la boucle reliant TM2 à TM3 présentait un rôle important dans l'affinité pour le Cl^- . Par ailleurs, Tovar-palacio *et al* (73) ont prouvé la responsabilité du domaine central hydrophobe dans le processus de transport des ions et la sensibilité aux diurétiques en utilisant les ovocytes de xénope pour étudier les propriétés fonctionnelles des protéines chimères de NCC et de NKCC2, en interchangeant les domaines de NH2 et COOH terminaux entre ces deux co-transporteurs. Ces analyses montrent que la chimère formée du domaine central de NKCC2 et des extrémités NH2 et COOH terminales de NCC conserve les propriétés du transport ionique de NKCC2. Ainsi, les terminaux de ce dernier n'ont-ils aucune importance dans le transport ionique et la sensibilité aux diurétiques.

D'autres études antérieures à la découverte des différentes isoformes de NKCC2 ont montré que l'affinité aux ions Cl^- du transporteur du sel sensible aux diurétiques de l'anse diffère entre les segments médullaires et corticaux de la BLA (45, 74). Les données relatives

aux caractéristiques du transport des différentes isoformes de NKCC2, combinées à leur localisation le long de la BLA, sont en accord avec les études fonctionnelles récentes utilisant la technique de microperfusion de tubules isolés. Selon ces études, la BLA médullaire transporte le sel plus rapidement que la BLA corticale, ce qui est cohérent avec le niveau d'expression élevé de l'isoforme F, caractérisé par une affinité ionique faible, dans la BLA médullaire. La BLA médullaire, à l'inverse, a un pouvoir de dilution plus important, ce qui est cohérent avec l'expression de l'isoforme B caractérisée par une affinité ionique élevée (26, 36).

- **Études de délétion**

- i) **Délétion complète de NKCC2**

Takahashi *et al* (75) ont développé un modèle de souris invalidé pour le gène SLC12A1, afin de confirmer le rôle fondamental de NKCC2 dans la réabsorption de sel dans la BLA. Ces souris homozygotes NKCC2^{-/-} naissent normales, mais au bout du premier jour postnatal, elles présentent déjà un état de déshydratation sévère. Sept jours plus tard, ces souris développent une insuffisance rénale, une concentration élevée de potassium et de rénine plasmatique, une acidose métabolique et une hydronéphrose. Au bout de deux semaines, toutes ces souris homozygotes sont mortes. À l'opposé des souris homozygotes, les souris hétérozygotes NKCC2^{+/-} ne développent pas un phénotype rénal sévère, bien que le niveau d'expression d'ARNm soit réduit à 50% (76). L'analyse du niveau d'expression des protéines NKCC2 a démontré que les mécanismes post-traductionnels ont totalement compensé la réduction à moitié du niveau d'expression des ARNm, et ont donc rétabli le niveau d'expression des NKCC2.

- ii) **Délétion spécifique des isoformes :**

Le rôle spécifique des isoformes A et B de NKCC2 dans la physiologie rénale a été déterminé par l'invalidation isoforme spécifique de NKCC2 A ou B, en introduisant un codon stop dans l'exon 4A ou 4B (77, 78). Comme les souris hétérozygotes NKCC2^{+/-} ne présentaient pas un phénotype rénal sévère (76), il n'est pas surprenant que l'invalidation isoforme spécifique de NKCC2, A ou B, n'a pas eu d'effets considérables sur le bilan salin et hydrique. Ces souris n'ont pas un taux de survie réduit comme les souris homozygotes NKCC2^{-/-}. Une légère diminution de l'osmolarité ambiante et de la capacité à concentrer l'urine a été observée chez les souris déficientes en NKCC2A ou B. Ces données révèlent que la contribution des deux isoformes A et B à la réabsorption globale de sel dans le rein est mineure, ou que des processus de compensation se produisent dans les parties distales du néphron en augmentant la

réabsorption de sel lors de l'absence d'activité de ces protéines. Ainsi, les résultats des expériences de protection à la RNase isoforme-spécifique montrent que le pourcentage des transcrits de NKCC2 B, A et F de souris est respectivement 10%, 20% et 70% des transcrits totaux de NKCC2 (79). De ce fait, l'expression dominante de l'isoforme F dans la partie médullaire associée à l'expression de l'isoforme A ou de B semble être suffisante pour éviter tout dysfonctionnement électrolytique au niveau de la BLA.

D'autre part, ces souris déficientes de NKCC2 A et B ont été utilisées pour estimer la contribution de ces isoformes à la réabsorption nette de Cl^- le long de l'anse de Henle. Pour déterminer la réabsorption de Cl^- dans l'anse *in vivo*, les anses de Henle ont été perfusées à l'aval du tubule proximal ; la concentration de Cl^- a été examinée dans le fluide tubulaire collecté à l'entrée du tubule distal par microponction. Les auteurs ont observé que dans des conditions de perfusion de flux faible, les souris NKCC2B^{-/-} réabsorbent significativement moins de Cl^- par rapport aux souris sauvages (77), alors qu'aucune différence n'a été observée chez les souris NKCC2A^{-/-}. Par contre, la délétion spécifique de NKCC2A entraîne une diminution de réabsorption de Cl^- dans les conditions de perfusion de flux élevé (78). Ces résultats obtenus à partir des études effectuées *in vivo*, sont en accord avec les études réalisées *in vitro*, montrant que l'isoforme NKCC2B présente une affinité élevée aux ions, alors que NKCC2A est l'isoforme caractérisée par une affinité plus faible et une capacité de réabsorption plus élevée.

L'ensemble de ces données suggèrent que, sous des conditions de faibles concentrations de Cl^- , la réabsorption dans la BLA dépend de l'activité de l'isoforme caractérisée par l'affinité élevée au Cl^- . Par contre, les concentrations élevées de cet ion engagent l'isoforme A, ce qui suggère que la capacité de transport de NKCC2A dépasse celle de NKCC2B.

Compte tenu de toutes les différences remarquables susmentionnées, dans les propriétés de transport des différentes isoformes de NKCC2, il est raisonnable de penser que le pourcentage de niveau d'expression des isoformes peut ne pas être stable, et que l'épissage alternatif peut être modulé afin de répondre aux changements de besoins de réabsorption ionique.

Ce concept a été soutenu par les travaux effectués par Brunet *et al* (80) et Schießl *et al* (81). Les auteurs de la première étude ont révélé chez le rat qu'une charge chronique en eau induit une diminution du niveau d'expression des isoformes F et A/F, tout en épargnant celui de l'isoforme A. Cependant, l'administration de furosémide entraîne une augmentation du niveau d'expression de l'isoforme A, et une diminution de ceux des isoformes F et A/F. Les

mécanismes exacts de cette régulation n'ont pas été abordés expérimentalement, mais les auteurs ont spéculé que les concentrations intracellulaires de Cl^- peuvent réguler le mécanisme d'épissage. Dans ce contexte, il a été prouvé que la concentration en Cl^- intracellulaire régule négativement l'activité de transport des NKCC (79, 82, 83). D'autre part, Schiebl *et al* (81) ont observé que l'épissage alternatif de NKCC2 chez la souris est modulé par l'apport alimentaire de sel. Un régime pauvre en sel provoque un décalage de l'épissage de NKCC2 A vers NKCC2 B dans la BLA corticale et la *macula densa*. L'impact fonctionnel de cette modulation de l'épissage alternatif de NKCC2 sous un régime pauvre en sel a également été évalué dans une étude de modélisation récente (84). Les résultats de cette analyse ont suggéré que la modulation de l'épissage alternatif par le régime pauvre en sel augmente la réabsorption du sel dans la BLA et par conséquent réduit la quantité de NaCl délivrée à la *macula densa*.

En plus, ces études réalisées chez les souris NKCC2A^{-/-} et NKCC2B^{-/-} ont permis de préciser le rôle fonctionnel de ces deux isoformes dans la régulation de la sécrétion de rénine. Pour étudier ce rôle, les auteurs ont examiné l'effet de la perfusion intraveineuse d'une solution saline d'une manière aiguë chez ces souris. La sécrétion de la rénine n'a été pas réduite chez les souris NKCC2A^{-/-} comme attendu, alors que les souris NKCC2B^{-/-} ont répondu par une diminution de la sécrétion de la rénine d'une manière similaire que les souris sauvages. Ce qui suggère que l'expression de l'isoforme A (présentant une capacité élevée de transport Cl^-) permet l'induction de la réduction de la sécrétion de la rénine *macula densa* dépendante sous les conditions de concentration de NaCl élevée.

Donc, l'expression des différentes isoformes de NKCC2 présentant des affinités ioniques différentes semble importante pour une activité du transport efficace dans une région où les concentrations ioniques varient selon une large gamme.

Néanmoins, les souris invalidées pour l'isoforme F de NKCC2 n'ont pas été générées, ce qui ne permet pas de caractériser son rôle spécifique dans la physiologie rénale.

b) L'isoforme courte S-NKCC2

L'étude fonctionnelle de la forme courte de NKCC2 a été effectuée seulement dans les ovocytes de xénope. Ces études révèlent que le S-NKCC2 transporte les ions Na^+ et Cl^- est indépendant de K^+ , et que ce transport sensible au furosémide nécessite un milieu hypotonique (85). De plus, la co-expression de L-NKCC2 et S-NKCC2 dans les ovocytes de xénope réduit l'activité de L-NKCC2, et cette activité est restaurée totalement par l'ajout d'AMPc (86). Des expériences d'immunolocalisation ont montré que le S-NKCC2 diminue l'activité de L-NKCC2 par rétention de ce dernier dans le compartiment subapical (86). Pourtant, ces études

n'ont pas montré une interaction entre ces deux formes de NKCC2. Ces observations ont ainsi suggéré l'implication de ce mécanisme dans la régulation de NKCC2 par les différentes hormones comme la vasopressine et la PTH, dont la voie de signalisation intracellulaire régule le niveau de l'AMPc.

3. Biologie cellulaire et moléculaire de la protéine NKCC2

3.1. Biosynthèse de la protéine

La biosynthèse de NKCC2 semble être le schéma usuel de synthèse des protéines membranaires qui s'effectue en trois étapes : la transcription du gène SLC12A1 en ARNm, l'épissage du messenger, puis la traduction de l'ARNm en protéines. En effet, comme toutes les protéines membranaires ou de sécrétion, la chaîne polypeptidique récemment synthétisée au ribosome sera transportée à la lumière du RE. Les ribosomes continuent la traduction de l'ARNm dans le RE et à l'aide d'un complexe de translocation les douze domaines transmembranaires sont insérés dans la bicouche lipidique du RE. Cette insertion se fait en fonction de séquence d'ancrage qui précisent la sens de l'insertion (87).

Durant sa biosynthèse, la protéine NKCC2 se trouve sous des formes glycosylées révélées par immunoempreintes. Cette glycosylation est inhibée par l'addition de tunicamycine, un inhibiteur de N-glycosylation, qui entraîne une diminution de la masse moléculaire. Ce qui suggère que le noyau protéique de NKCC2 est glycosylé au cours de sa synthèse dans le RE, et qu'une chaîne oligosaccharidique est ajoutée très riche en mannose, ce qui explique sa sensibilité à l'endoglycosidase H (endo H) (88). Quant au repliement de NKCC2, aucune information n'a encore été établie. Pourtant, en se basant sur des protéines de transport membranaire comme la protéine CFTR, ce phénomène pourrait se faire d'une façon co-traductionnelle ou post-traductionnelle.

3.2. Contrôle qualité de NKCC2

Le RE est un déterminant principal de la quantité de protéine exprimée à la membrane plasmique (89, 90). En effet, le RE présente un important système de contrôle qualité pour les protéines nouvellement synthétisées, étant donné que c'est le site de repliement des protéines membranaires et de sécrétions (91). En principe, seules les protéines correctement repliées, ayant passées avec succès ce système de contrôle qualité, seront acheminées vers l'appareil de Golgi pour être exprimées à la membrane. Pourtant, les protéines mal repliées seront retenues au niveau du RE, et si le repliement de la protéine ne peut pas être corrigé, elles seront dirigées vers la voie de dégradation appelée ERAD (ER-Associated-Degradation). La voie ERAD est un processus qui nécessite plusieurs étapes : la reconnaissance, la rétrotranslocation, l'ubiquitinylation et la dégradation des protéines mal repliées. La reconnaissance de ces protéines mal repliées se fait par des interactions substrat-spécifique avec des protéines chaperonnes (92, 93). La voie ERAD de la protéine CFTR, la première protéine membranaire identifiée comme substrat de la voie ERAD (94, 95), est un processus complexe qui nécessite

plusieurs molécules chaperonnes, y compris HSP40 (Heat Shock Protein 40), HSP70, CHIP (Partenaire de la protéine HSP70) et derlin 1 (96). En outre, des études menées dans notre laboratoire ont montré que la majorité de NKCC2 nouvellement synthétisés est retenue au niveau du RE et est dégradée par le protéasome (97, 98). Malgré cela, aucune chaperonne du RE n'a pas encore été décrite comme partenaire de la protéine NKCC2.

3.3.Maturation de la protéine

Après modification de la protéine NKCC2 au niveau du réticulum endoplasmique, la protéine est alors adressée à la membrane apicale des cellules épithéliales de la BLA. Pour que NKCC2 atteigne cette membrane, les protéines bien repliées doivent finir leur glycosylation débutée au RE et avoir des motifs de sortie du RE et d'adressage à la membrane apicale intacts (88, 97-99).

3.3.1. Glycosylation de NKCC2

La séquence protéique de NKCC2 prédit un poids moléculaire d'environ 120kDa (56). Néanmoins, le poids moléculaire de NKCC2 détecté par immunoempreinte est d'environ 160kDa (61, 88). La présence de deux sites de N-glycosylation, deux asparagines N⁴⁴² et N⁴⁵² situées au niveau de la quatrième boucle extracellulaire (entre le 7^{ème} et 8^{ème} domaine transmembranaire), peut expliquer cette différence de poids moléculaire, puisque leur mutation en glutamine semble suffire pour empêcher la glycosylation de NKCC2 et expliquer cette différence (88).

Durant la biosynthèse de NKCC2, La glycosylation commence au RE par l'addition co-traductionnelle d'un oligosaccharide précurseur et s'achève à l'appareil de Golgi. Cet oligosaccharide est une unité de 14 résidus glucidiques (2 N-acétylglucosamines (GlcNAc), 9 mannoses et 3 glucoses), qui est ajoutée à la chaîne peptidique naissante par l'oligosaccharyltransférase. Puis, l' α 1,3-glucosidase II et l' α 1,2-glucosidase I éliminent immédiatement les deux glucoses terminaux. Une fois la protéine atteint certain degré de repliement, l' α 1,3-glucosidase II enlève le troisième glucose restant. Cette protéine riche en mannoses est la forme immature de NKCC2 (ou core-glycosylated) sensible à l'endo H, et apte à être transportée vers l'appareil de Golgi.

Dans les compartiments de Golgi, des modifications enzymatiques sont réalisées en aboutissant à la maturation N-glycane de NKCC2, qui devient hautement glycosylée. Cette maturation se traduit par une augmentation de son poids moléculaires d'environ 40kDa. La protéine hautement glycosylée est appelée forme mature (ou complex-glycosylated). Cette

protéine mature devient résistante à l'endo H mais sensible à la PNGase F (Peptide:N-Glycosidase F), puis des vésicules adressent cette protéine à la membrane plasmique.

3.3.2. Les déterminants de l'adressage apicale

Bien que la N-glycosylation soit importante pour la maturation de NKCC2, une séquence responsable de l'adressage de la protéine à la membrane apicale dans des cellules épithéliales polarisées a été identifiée dans la partie C-terminale. En 2008, Carmosino *et al* (99) ont identifié la séquence d'adressage apicale de NKCC2 en exprimant des structures chimères de NKCC1 et NKCC2 dans des cellules polarisées rénales de chien (Madin Darby Canine Kidney, MDCK). Les auteurs ont révélé que la présence de 77 acides aminés localisés dans l'extrémité C-terminale (les acides aminés 708–884) de NKCC2 est suffisante pour son adressage à la membrane apicale. Ainsi, l'analyse des séquences a montré que ces 77 acides aminés, constituant la séquence responsable de l'adressage apicale de NKCC2, ne sont pas présents par l'extrémité C-terminale de NKCC1 (99).

En outre, deux études effectuées dans notre laboratoire ont montré que le domaine COOH-terminal NKCC2 contient des motifs nécessaires pour la sortie de RE (97, 98). En exprimant la mutation Y998X dans les cellules rénales OKP (Opossum Kidney clone-P) et HEK293 (Human Embryonic Kidney), Zaarour *et al* (97) ont identifié en 2009 le motif tri-hydrophobique $^{1081}\text{LLV}^{1083}$ dans la partie distale de l'extrémité C-terminale de NKCC2, indispensable pour la maturation de NKCC2. Ce motif a été identifié par la délétion linéaire de la partie C-terminale en aval de cette mutation. La substitution de ce motif en trois alanines empêche la sortie de RE et la maturation de NKCC2 (97). De plus, Nezu *et al* (100) ont montré que ce motif est indispensable pour la sortie de NKCC1 du RE.

Néanmoins, des autres motifs dans la partie C-terminale de NKCC2 peuvent contribuer au repliement et le trafic intracellulaire de cette protéine. L'analyse de séquence a révélé cinq motifs de di-leucine, mais deux motifs de ces cinq sont importants dans la sortie du RE et l'expression membranaire de co-transporteur. À l'image de $^{1081}\text{LLV}^{1083}$, la mutation en alanine de deux motifs ($^{1038}\text{LL}^{1039}$, $^{1048}\text{LI}^{1049}$) entraîne la rétention de NKCC2 au niveau de RE. Ces résultats montrent que le motif $^{1081}\text{LLV}^{1083}$ est nécessaire pour la sortie de RE de NKCC2 mais n'est pas suffisant (98).

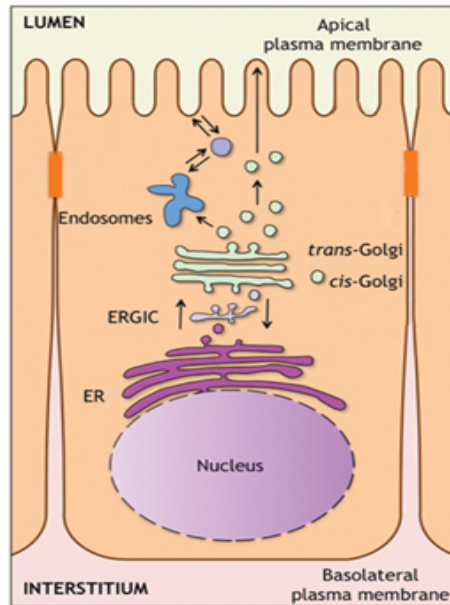


Figure 10 Illustration schématique de la voie de biosynthèse des protéines membranaires : les protéines membranaires sont synthétisées dans le RE, modifiées (core-glycosylé, riche en mannose), repliées ; seule les protéines bien repliées sont transportées vers l'appareil de Golgi en passant par le compartiment intermédiaire (ERGIC), si une protéine malrepliée s'échappe au contrôle qualité du RE, elle est retenue au cis-Golgi et retournée au RE. Dans l'appareil de Golgi, la protéine devient mature (complexe-glycosylé). Ces protéines glycosylées sont transportées dans des vésicules et l'équilibre entre l'exocytose, l'endocytose et le recyclage va réguler la quantité de la protéine exprimée à la membrane plasmique. Modifié à partir de Schaeffer 2014 (6).

3.3.3. Le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi

La première destination de la majorité des protéines membranaires nouvellement synthétisées est le RE. Ces protéines sont exportées hors du RE, après avoir atteint leur conformation native, essentiellement dans des vésicules COPII (pour Coat Protein complex II) qui bourgeonnent à partir de certains sites du RE (101). Les vésicules COPII sont des complexes de protéines recouvrantes incluant Sec23p/Sec24p, Sec13p/Sec31p et la GTPase (102). Ces vésicules, débarrassées de leur manteau protéique, fusionnent avec un complexe tubulo-vésiculaire appelé VTC (Vesicular Tubular Cluster) ou ERGIC (ER/Golgi Intermediate Compartment), situé du côté cis du Golgi (103). Ce complexe est caractérisé par l'expression d'une protéine transmembranaire non-glycosylée de 53kDa, ERGIC53. Cette protéine joue un rôle dans le transport de la majorité des protéines transmembranaires du RE vers l'appareil de Golgi. Les protéines des vésicules COPII exportent les protéines du RE par la reconnaissance d'une séquence signal d'export (104, 105). Parfois, des protéines mal repliées pourraient sortir du RE et atteindre le côté cis du Golgi, et elles seront retournées au RE via les vésicules COPI (106). Cependant, aucune interaction entre ces protéines et la protéine NKCC2 n'a encore été décrite.

3.3.4. Transport de la protéine entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique

Plusieurs études ont étudié le trafic intracellulaire de NKCC2 entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Ce mécanisme régule la quantité de NKCC2 exprimée à la membrane par régulation de trois phénomènes : exocytose, endocytose et recyclage de la protéine. Ces phénomènes impliquent des interactions protéines-protéines comme les protéines VAMP 2 et 3 (Vesicle-Associated Membrane Protein) (107-109), l'adolase B (110), SCAMP2 (secretory carrier membrane protein 2) (111), SPAK /OSR1 (Ste20-related proline-alanine-rich kinase, oxidative stress response kinase) (112), AMPK (AMP-activated protein kinase) (113), MAL-VIP17 (Myelin and lymphocyte-associated protein-vesicle integral protein of 17 kDa) (114), la moésine (115) et la calcineurine A β (116). Malgré toutes ces interactions décrites, le trafic intracellulaire de NKCC2 entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique reste incomplètement élucidé.

a) Rôle des VAMP2 et 3 dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique

Des études ont montré que la stimulation de la production de l'AMPc, par la vasopressine ou un récepteur β -adrénergique, augmente l'adressage membranaire des vésicules subapicales et par conséquent elle augmente la réabsorption de NaCl dans la BLA en augmentant son expression à la membrane apicale (117, 118). De plus, Ortiz a montré en 2006 que la stimulation de l'expression apicale de NKCC2 implique des protéines VAMP, qui augmentent la fusion des vésicules subapicales à la membrane plasmique (107). Ainsi, l'administration de la toxine tétanique, inhibiteur des VAMP 2 et 3 en induisant leur clivage, bloque l'effet stimulateur de l'expression induite par l'AMPc de NKCC2 à la membrane dans la BLA, suggérant un rôle attribué à VAMP 2 et 3 dans cette translocation (107). Récemment, des études de knockdown spécifique *in vivo* de VAMP 2 ou 3, par l'utilisation de l'adénovirus pour délivrer le shRNA (short hairpin RNA) à la médullaire externe de la BLA, ont montré que VAMP 2, et non VAMP 3, est impliqué dans l'exocytose de NKCC2 stimulée par l'AMPc (108). Plus récemment, le même groupe a révélé que VAMP 3 est important pour l'expression membranaire de NKCC2 à l'état basal. En effet, les souris invalidées pour VAMP 3 ont moins de NKCC2 dans la BLA et une pression artérielle plus basse que les souris sauvages (109). Enfin, ces deux études récentes ont montré une interaction entre NKCC2 et VAMP 2 et 3 par des expériences de co-immunoprécipitation et de co-immunolocalisation (108, 109).

b) Rôle de l'aldolase B dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique

Notre laboratoire a utilisé la technique de double hybride chez la levure pour détecter les interactions possibles entre l'extrémité C-terminale de NKCC2 et les protéines exprimées dans le rein. L'aldolase B est l'une des protéines pêchées par cette technique. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation, de co-immunolocalisation et de biotinylation montrent que l'aldolase B interagit avec NKCC2 dans les cellules rénales OKP et que sa surexpression entraîne une diminution de l'expression membranaire du co-transporteur sans que la quantité totale de la protéine ne soit modifiée. Cette diminution a été abolie en présence du fructose 1,6-biphosphate, un substrat de l'aldolase B ; ce qui suggère que ce dernier retient NKCC2 soit en diminuant son exocytose soit en augmentant son endocytose (110). Des observations récentes par Ares et Ortiz ont montré que l'apport aigu de fructose aux rats augmente la réabsorption de NaCl dans la BLA (119). En effet, l'alimentation riche en fructose augmente la concentration de fructose 1,6-biphosphate dans la BLA qui est un substrat de l'aldolase B (120), et la liaison de ce substrat à l'aldolase pourrait augmenter l'expression de NKCC2 à la membrane plasmique. Ces données sont en faveur de l'hypothèse que l'aldolase B régule *in vivo* la translocation de NKCC2 vers la membrane plasmique. Reste à étudier le mécanisme précis de cette régulation.

c) Rôle de SCAMP2 dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique

La technique de double hybride utilisée par notre laboratoire a révélé une interaction possible entre le domaine C-terminal de NKCC2 et la protéine SCAMP2. Cette interaction a été validée dans les cellules rénales OKP et HEK par des expériences de co-immunoprécipitation. Ainsi, des études de co-immunolocalisation ont montré que cette interaction se fait dans les endosomes de recyclage. La surexpression de SCAMP2 diminue l'expression à la membrane et l'activité de NKCC2. Cet effet est dû à une diminution de l'exocytose et non pas l'endocytose. De plus, la mutation C201A, un peptide qui joue un rôle important dans la régulation de l'exocytose, abolie la diminution de NKCC2 membranaire due à la protéine SCAMP2. D'autres études ont montré que SCAMP2 interagit avec SNAP-23, un partenaire des VAMP2/3 dans le complexe SNARE, et l'effet de cette interaction est la diminution de l'exocytose de plusieurs protéines (121). L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle important de SCAMP2 dans l'inhibition de l'expression membranaire de NKCC2.

d) Rôle de MAL–VIP17 dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique

Carmosino *et al* ont montré que MAL/VIP17 est impliqué dans la régulation de l'expression membranaire de NKCC2 (114). MAL/VIP17 est exprimée exclusivement à la membrane apicale des cellules épithéliales rénales (122, 123). Cette interaction implique 150 acides aminés de la partie C-terminale de NKCC2, incluant les 77 acides aminés nécessaires à l'adressage apical de NKCC2. La surexpression de MAL/VIP17 chez les souris transgéniques augmente l'expression de NKCC2 à la membrane, en stabilisant son expression membranaire et en augmentant sa phosphorylation. Ainsi, des analyses d'endocytose dans des cellules épithéliales (MDCK et LLC-PK1) ont démontré que cette stabilisation est accompagnée par une diminution de l'internalisation de NKCC2 (114).

e) Rôle de la moésine dans le transport de NKCC2 Golgi-membrane plasmique

L'utilisation de la technique de décalage de l'anticorps, associée à la migration bleue native/SDS-PAGE et la spectrométrie de masse, permet d'identifier la moésine comme partenaire de NKCC2 (115). La transfection de la moésine dominante négative taguée par la GFP entraîne l'accumulation de NKCC2 dans les vésicules subapicales. Ainsi, le knockdown de la moésine diminue l'expression membranaire de NKCC2. Enfin, des analyses d'endocytose et d'exocytose expliquent cette diminution par une réduction de l'exocytose de co-transporteur (115).

f) La régulation de la phosphorylation de NKCC2

Piechotta *et al* ont montré une interaction probable entre SPAK/OSR1 et la protéine NKCC2 en utilisant la technique de double hybride (124). Cette interaction s'établit avec le motif RFQV de l'extrémité N-terminale de NKCC2 (112). La co-expression de l'un ou l'autre de ces deux kinases avec NKCC2 dans les cellules rénales HEK dans un milieu hypotonique (faible concentration en Cl⁻) montre que SPAK et OSR1 augmentent la phosphorylation de quatre sites (Thr⁹⁵, Thr¹⁰⁰, Thr¹⁰⁵ et Ser⁹¹) de l'extrémité N-terminale de NKCC2, et par conséquent augmentent l'activité du co-transporteur (112). Par contre, Ser¹³⁰ du domaine N-terminal de NKCC2 est phosphorylé par l'AMPK (112, 113), un autre partenaire de NKCC2 (113).

Il est bien à noter que trois membres de la famille WNK (no lysine kinase) régulant la voie SPAK et OSR1 en amont, sont exprimés dans la BLA : WNK1 (les deux formes ks-WNK1,

spécifique du rein, et L-WNK1, forme long), WNK3 et WNK4 (125-127). Les WNK1s régulent d'une manière opposée : le ks-WNK1 inhibe l'activité de NKCC2, par contre le L-WNK1 stimule son activité. Les souris ks-WNK1 transgéniques confirment l'effet observé *in vitro* de ks-WNK1 sur NKCC2 (128, 129). Les études fonctionnelles de WNK3 dans l'ovocyte de xénope montrent que WNK3 augmente la phosphorylation de NKCC2 via la voie SPAK/OSR1 (125, 130). Deux lignées de souris invalidées pour le gène codant pour WNK3 ont révélé que l'effet *in vivo* de WNK3 semble être limité (131). Ce désaccord avec les résultats *in vitro* pourrait être dû à un effet compensateur de WNK1 chez les souris invalidées pour WNK3 (132). Enfin, WNK4 stimule la phosphorylation de NCC via la voie SPAK/OSR1, alors qu'aucune information concernant l'effet de WNK4 sur NKCC2 n'a encore été établie (133).

En plus des WNKS, une autre protéine interagissant avec SPAK a été décrite. Cette protéine est appelée SORLA (Sorting protein-related receptor containing LDLR class A repeats). L'invalidation de ce dernier chez la souris du gène codant pour SORLA entraîne une forte baisse de la co-localisation entre SPAK et NKCC2, et une diminution dramatique de la phosphorylation de NKCC2 (-75%) (134). Cette diminution est abolie par l'administration de la cyclosporine, un agent immunosuppresseur qui inhibe la calcineurine phosphatase. La calcineurine exprimée dans la BLA est la calcineurine A β , qui est surexprimée chez les souris SORLA invalidées (116). Ces données suggèrent que SORLA joue un rôle stimulateur de SPAK, qui stimule à son rôle la phosphorylation de NKCC2 et joue un rôle inhibiteur de la calcineurine A β , qui déphosphoryle NKCC2 (116).

Récemment, des études ont montré que l'uromoduline (UMOD, protéine spécifique de la BLA) augmente la phosphorylation et l'activité de NKCC2. En effet, un polymorphisme dans le promoteur du gène UMOD a été lié au risque de l'insuffisance rénale chronique et de l'hypertension artérielle (135). En revanche, aucune interaction physique n'a été montrée entre NKCC2 et UMOD.

4. NKCC2 dans le Syndrome de Bartter

Le syndrome de Bartter (BS) est une tubulopathie héréditaire rare, de type autosomique récessif (BS type 1, 2, 3 et 4) ou dominant (BS type 5). Cette maladie est caractérisée par le défaut de réabsorption de NaCl au niveau de la BLA, et par conséquent, une fonction rénale anormale qui se traduit par une incapacité de régulation de volume et de composition ionique des fluides de l'organisme. Une variabilité phénotypique observée chez les patients du syndrome de Bartter est due à la mutation qui affecte les différentes protéines impliquées dans la réabsorption de la BLA.

4.1. Tableau clinique

Les signes cliniques du syndrome de Bartter se caractérisent par une alcalose métabolique hypokaliémique, une pression normale basse, une rénine plasmatique élevée avec hyperaldostéronisme et des troubles digestifs (anorexie, vomissements, constipation, diarrhée). Une forme anténatale a été décrite, associant en plus des signes cliniques plus sévères : un polyhydramnios, une prématurité, une polyuropolydipsie avec risque de déshydratation et un retard de croissance. Ainsi, plusieurs formes de BS se caractérisent par une hypercalciurie associée dans la majorité des cas à la néphrocalcinose, qui peut provoquer secondairement une insuffisance rénale néonatale.

4.2. Physiopathologie

Le syndrome de Bartter est un ensemble de tubulopathies génétiques affectant le transport du sel au niveau de la BLA. Comme mentionné dans la partie précédente, la BLA joue un rôle crucial dans la régulation de la concentration de l'urine, une fonction accomplie par un mécanisme de transport transépithélial du sel intégrant différents transporteurs, dont NKCC2 constitue l'élément clé. Le syndrome de Bartter est dû à l'inactivation du système de transport de sel dans la BLA par des mutations affectant au moins quatre gènes différents codant pour des protéines impliquées dans ce système : les gènes SLC12A1, KCNJ1, CLCNKB et BSND, codant pour les protéines NKCC2, ROMK, CLC-Kb et la barttine (la sous unité régulatrice des canaux chlorures basolatéraux CLC-Ka et CLC-Kb), caractérisant le syndrome de Bartter type I, II, III et IV respectivement. La mutation de ces différentes protéines entraîne des phénotypes presque similaires avec un syndrome de Bartter néonatal sévère dans la majorité des cas. La perte du sel dans l'urine accompagnée par une polyurie, due à l'inactivation de l'une ou l'autre de ces protéines, provoque un rétrécissement du volume extracellulaire et une diminution de la volémie. Cette hypovolémie entraîne une hyperplasie de l'appareil juxtaglomérulaire associée

à une activation du système rénine-angiotensine et une augmentation de la sécrétion d'aldostérone. Le système rénine-angiotensine et l'aldostérone agissent en aval de la BLA de telle sorte que la baisse dangereuse de la pression artérielle et de la volémie est évitée, en augmentant la réabsorption de sodium et la résistance vasculaire. En plus de la stimulation du système rénine-angiotensine, la sécrétion rénale excessive de prostaglandine E2 (PGE2) est aussi stimulée. Cette hypersécrétion inhibe la réabsorption de NaCl dans la BLA. Ainsi, des symptômes extra-rénaux observés chez les patients de BS, telles les fièvres, vomissements, diarrhées, ostéopénie et retard de croissance, sont associés en partie à l'hypersécrétion de la PGE2.

En outre, l'augmentation de l'aldostérone due au défaut de réabsorption de NaCl dans la BLA entraîne une hypokaliémie qui est expliquée au moins en partie par les mécanismes compensatoires activés en aval de ce site, dans les tubules collecteurs. En effet, l'aldostérone provoque une réabsorption accrue de Na^+ dans les tubules collecteurs en activant le canal sodique ENAC (Epithelial sodium Channel), et par conséquent une augmentation de la réabsorption de HCO_3^- (accroissant aussi leur taux dans le sang), et une sécrétion élevée des ions K^+ et H_3O^+ dans l'urine, aboutissant tous à l'alcalose métabolique hypokaliémique.

Les complications les plus fréquentes liées à l'hypokaliémie peuvent être prononcées chez les patients de BS, vu que le K^+ est essentiel pour l'activité musculaire et la fonction cellulaire, incluant une fatigue chronique, des crampes musculaires, et une faiblesse musculaire qui pourrait causer une paralysie complète et une rupture de fibres musculaires corrélée au degré de sévérité de l'hypokaliémie.

D'autre part, une perte du calcium dans les urines (hypercalciurie) a été observée chez les patients atteints de BS. Cette perte de Ca^{2+} entraîne une calcification du tissu rénal (néphrocalcinose) qui deviendrait une insuffisance rénale. En plus de néphrocalcinose, trois études récentes (136-138) ont suggéré que cette hypercalciurie peut être responsable de l'hyperparathyroïdie (sécrétion élevée de la parathormone, PTH) observée chez ces patients.

Parmi les différents types de BS, le syndrome de Bartter type I est l'une des formes les plus sévères.

4.3. Traitement

Actuellement, les traitements du syndrome de Bartter consistent à rétablir le bilan ionique et la volémie. Pour cette fin, les patients atteints de BS reçoivent une combinaison de suppléments de K^+ et Na^+ ou des diurétiques inhibant les canaux potassiques apicaux, pour

éviter la perte de K^+ , comme l'amiloride, avec des inhibiteurs de synthèse de PGE2 comme l'indométacine, ou des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (139).

4.4.Historique de la découverte du Syndrome de Bartter type I

En 1962, Bartter *et al* ont décrit chez deux patients pour la première fois un nouveau syndrome caractérisé par une alcalose métabolique hypokaliémique, une hyponatrémie, une hypochlorémie, un hyperréninisme avec un hyperaldostéronisme et une pression artérielle normale. Les études histologiques des reins de deux patients ont révélé une hyperplasie de l'appareil juxtaglomérulaire (140). Dans les années suivantes, plusieurs études ont décrit des anomalies supplémentaires cliniques et biochimiques qui s'associent à une alcalose métabolique hypokaliémique (141-143). Ces observations ont permis de classer les patients en fonction de leur phénotype en trois groupes distincts : 1- le syndrome de Gitelman caractérisé par une hypocalciurie, 2- le syndrome de Bartter anténatal qui se distingue du premier par une hypercalciurie avec néphrocalcinose et insuffisance rénale, 3- le syndrome de Bartter classique (144-146). Des études plus récentes ont précisé que les différentes tubulopathies hypokaliémiques peuvent être dues à des mutations génétiques autosomales récessives (147).

Néanmoins, la base moléculaire qui cause le syndrome de Bartter type I est restée longtemps non identifiée. C'est en 1996 que Simon *et al* ont cloné pour la première fois le gène codant pour NKCC2 humain, et ont démontré le lien entre le syndrome de Bartter et le co-transporteur $Na^+-K^+-2Cl^-$ rénal, NKCC2 (57). Ces auteurs se sont référés à plusieurs études : 1- Gill et Bartter en 1978 ont montré qu'un défaut de réabsorption de Cl^- dans la BLA peut être la cause du syndrome de Bartter (148). 2- le médiateur principal de la réabsorption de NaCl dans ce segment du rein est NKCC2 (8), et les signes cliniques observés chez les patients (149) pourrait être expliqués par la perte de sa fonction. De plus, l'inhibition spécifique de ce co-transporteur engendre des changements électrolytiques comparable à ceux observés chez les patients de Bartter (150). 3- leur étude antérieure, où ils ont démontré le lien direct entre le syndrome de Gitelman et la mutation du gène codant pour le co-transporteur Na^+-Cl^- , NCC, exprimé à la membrane apicale des cellules du tubule distal (151). Ces observations chez les patients de Gitelman ont laissé la question ouverte : si le syndrome de Bartter était une variante de ce syndrome ou s'il était dû à des mutations affectant le gène SLC12A1 codant pour le co-transporteur $Na^+-K^+-2Cl^-$, NKCC2, de la BLA.

En premier lieu, ces auteurs ont séquencé le chromosome 16 (porteur de gène codant pour NCC) chez des patients de syndrome de Bartter. Les résultats de ce séquençage ont confirmé l'absence de lien entre la mutation de NCC et le syndrome de Bartter. Ainsi, ils ont

déterminé le locus génomique de NKCC2 à partir d'une librairie de plasmide artificiel de chromosome (PAC, Plasmid Artificial Chromosome) par hybridation, ce qui a permis de déterminer la structure du gène en introns-exons. Enfin, ils ont établi une relation causale entre NKCC2 et le syndrome de Bartter, en identifiant cinq différentes mutations chez ces patients.

4.4.1. Mutations dans NKCC2

À l'heure actuelle, près de 79 mutations ont été reportés par dix-sept études différentes sur le gène codant pour NKCC2 (57, 64, 138, 152-165). Ces mutations sont réparties comme suit : quarante-huit mutations faux-sens (incluant, F177Y, G193R, L196P, R199G, G224D, T235M, G243E, P254A, G257S, A267S, V272F, R302Q, R302W, G319R, P348L, N399S, C436Y, C461R, G478A, L505V, S507P, A508T, A510D, A555T, P569H, Y1070C, P1083A, D648N), six mutations non-sens (R471X, W625X, Q656X, R761X, W936X, Y998X), quatorze mutations de microdélétions, cinq mutations de microinsertions, cinq mutations d'épissage et une mutation de grande délétion. Elles affectent tous les domaines de NKCC2, avec un nombre considérable des délétions graves au niveau de l'extrémité C-terminale due soit à l'insertion prématurée de codons stop (mutations non-sens) soit à un décalage de la phase de lecture (mutations d'insertion et de délétion).

45% des sujets porteurs des mutations de NKCC2 sont homozygotes, 35% sont hétérozygotes pour des mutations combinées et 20% sont hétérozygotes incluant les sujets porteurs de neuf mutations protectrices contre l'hypertension artérielle (T235M, P254A, R302W, P348L, N399S, L505V, P569H, Y1070C, P1083A) (**Figure 11**).

Comme mentionné dans la partie précédente, les souris invalidées pour le gène SLC12A1 développent un phénotype similaire au syndrome de Bartter type I. En plus, des études fonctionnelles de certaines mutations (F177Y, G193R, A267S, G319R, A508T, Δ 526N, Y998X et D918fs) causant ce syndrome dans le système d'expression hétérologue, les ovocytes de xénope, ont montré que ces mutations ne sont pas fonctionnelles, à l'exception de la mutation F177Y qui est à moitié active (153, 166).

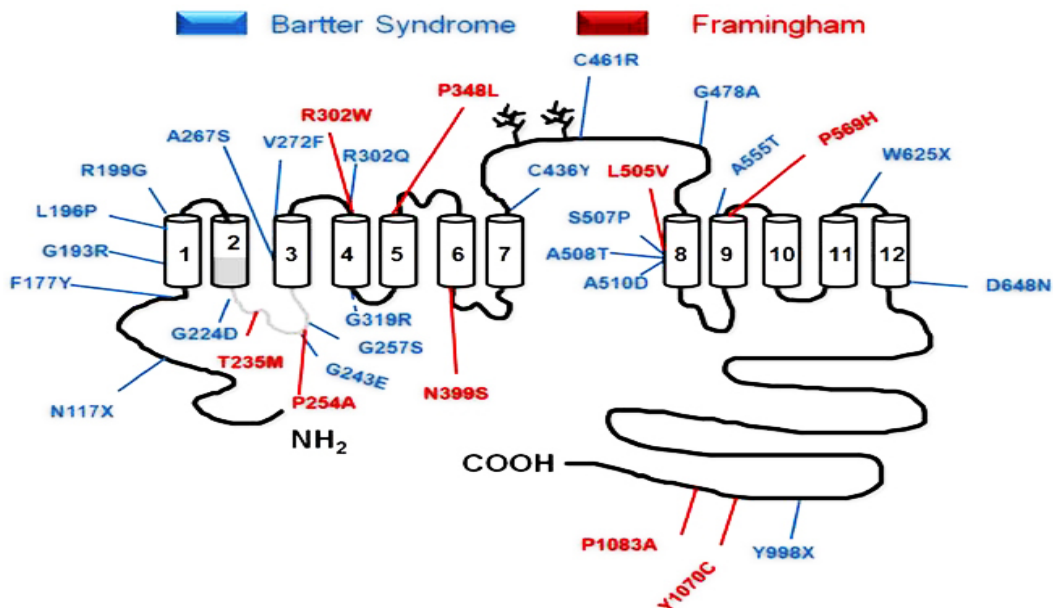


Figure 11 Représentation schématique de structure de la protéine NKCC2 avec une sélection des mutations connues induisant le syndrome de Bartter type 1 (en bleu), et des mutations hétérozygotes protectrices contre l’hypertension artérielle. (4)

Plus récemment, une étude menée dans notre laboratoire dans laquelle pour la première fois NKCC2 est exprimé dans les cellules mammifères donne une nouvelle matière pour l’étude fonctionnelle de cette protéine (110). Suite à cette étude, la mutation Y998X a été la première mutation de NKCC2 étudiée dans les cellules épithéliales en culture. L’étude fonctionnelle de cette mutation dans les cellules a montré que la protéine mutée reste bloquée au niveau du réticulum endoplasmique (RE), tandis qu’elle s’exprime à la membrane cytoplasmique de l’ovocyte de xénope, faute de trois motifs ¹⁰³⁸LL¹⁰³⁹, ¹⁰⁴⁸LI¹⁰⁴⁹ et ¹⁰⁸¹LLV¹⁰⁸³, nécessaires pour la sortie de NKCC2 du RE (97, 98).

En effet, plusieurs études ont montré que de nombreuses maladies héréditaires, outre la maladie de Bartter, sont induites par des mutations affectant l’adressage des protéines membranaires (comme les canaux et les transporteurs) à la membrane cytoplasmique, soit par mutation directe de la protéine soit par mutation d’une protéine intracellulaire de la machinerie d’adressage(6). L’exemple le mieux connue est la mutation ΔF508 du canal CFTR (responsable de la majorité des cas de la maladie de mucoviscidose), qui est active lorsqu’elle est exprimée dans l’ovocyte de xénope alors qu’elle retenue au niveau de RE. De plus, le traitement des souris affectées par cette mutation par le chaperon chimique TMAO (triméthylamine N-oxide) corrige partiellement son expression à la membrane et son activité (167).

En se basant sur ces études de la mutation $\Delta F508$ du canal CFTR, on peut suggérer que NKCC2 peut avoir des mutations qui n'affectent pas son activité mais son adressage à la membrane ; d'où l'importance d'étudier les modifications post-traductionnelles de NKCC2.

Position du problème

Malgré l'importance de NKCC2 dans la fonction rénale sus-décrite, nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qui régulent son trafic intracellulaire ne sont actuellement que partiellement connus. À présent, aucune information concernant le mécanisme de contrôle de qualité de NKCC2 n'a été établie. Le but de notre travail a donc été l'identification des partenaires protéiques de NKCC2 impliqués dans la régulation de l'expression et le contrôle qualité du co-transporteur.

Les résultats obtenus dans ce travail seront présentés en trois parties : la première sera consacrée à l'identification des partenaires protéiques interagissant avec NKCC2 et impliqués dans sa dégradation (cette partie sera présentée sous forme d'article publié). La deuxième partie sera réservée à l'identification d'un nouveau gène dont sa mutation cause un syndrome de Bartter anténatal et sévère en régulant l'expression de NKCC2 (cette partie sera présentée sous forme d'article publié). La troisième sera dédiée à l'identification des protéines de choc thermique (HSP) interagissant avec NKCC2 et impliquées dans sa dégradation et sa maturation.

Matériels et méthodes

1. Constructions utilisées

1.1. Description des constructions

L'ADNc de NKCC2 et NCC ont été fusionnés à l'extrémité N-terminale par l'étiquette Myc (Myc-NKCC2 et Myc-NCC) ou EGFP (EGFP-NKCC2) en utilisant les vecteurs pCMV-Myc (Clontech) et pEGFP-C2 (Clontech), respectivement. Ainsi, la séquence codante d'OS-9 a été clonée dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen). D'autres constructions ont été généreusement fournies par des différents Professeurs : le plasmide codant pour Myc-MAGED2 par le Professeur B. BECK, les constructions codantes pour la HSP40/DNAJB1-V5 sauvage et muté (H32Q) par le Professeur H. KAMPINGA (168), le vecteur codant pour la HSP70/HSPA1A-Myc par le Professeur J. BRODSKY (169), et le plasmide codant pour la HSP70 'like', HSPA13/STCH-GFP, par le Professeur K. PARK (170).

1.2. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été utilisée pour réaliser la mutation d'intérêt sans obtention préalable d'ADN simple brin, qui peut être une étape critique. Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation de deux amorces d'ADN complémentaires contenant la mutation désirée, qui vont s'hybrider à chacun des deux brins du plasmide d'intérêt. Cette technique a été réalisée sur des sites particuliers afin d'obtenir les différentes mutations du domaine MRH de la protéine OS-9 (Y120A, Q130E, R188A, E212N et Y218A). La mutagenèse dirigée a été effectuée selon le protocole du kit '*QuickChangeTMXL Site-Directed Mutagenesis*' vendu chez Stratagene®. L'ensemble des mutations a été vérifié et validé par séquençage.

1.3. Amplification des constructions

L'amplification du matériel génétique à étudier s'effectue en deux étapes : la transformation bactérienne et l'extraction de l'ADN plasmidique.

1.3.1. Transformation bactérienne

La transformation bactérienne artificielle est une technique bien maîtrisée et utilisée couramment dans notre laboratoire pour amplifier l'ADN plasmidique. Le protocole utilisé est décrit ci-dessous :

Un microlitre d'ADN d'intérêt (dilué à 10 ng/μL) était prélevé et mis en présence de 50 μL de bactéries E. coli compétentes DH5α (Invitrogen) pré-incubées dans la glace. Après incubation de 30 minutes dans la glace, les bactéries sont transformées par choc thermique à 42°C pendant une minute, puis placées deux minutes dans la glace. Ensuite, les bactéries sont diluées dans 450 μL de milieu SOC (Super Optimized Culture, Invitrogen) préchauffé à 42°C

et incubées 1 h à 37°C sous agitation à 225 rpm pour permettre l'expression du gène de résistance à l'antibiotique présent dans le vecteur. Cent microlitres de ces pré-cultures bactériennes étaient ultérieurement étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB-Agar (Luria Bertani Agar) supplémenté par l'antibiotique adéquate. Les plasmides utilisés, portent soit un gène de résistance à l'ampicilline soit un gène de résistance à la kanamycine. Ces deux antibiotiques ont été utilisés à une concentration de 100 µg/mL pour l'ampicilline et 50 µg/mL pour la kanamycine. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant une nuit.

1.3.2. Extraction de l'ADN plasmidique de bactéries

Pour extraire l'ADN plasmidique, une colonie des bactéries transformées étaitensemencée dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté par l'antibiotique adéquate. Les bactéries étaient ensuite incubées sur la nuit à 37°C sous agitation à 225 rpm. L'extraction des plasmides était réalisée en utilisant le kit de minipréparation plasmidique Thermo Scientific GeneJET. Enfin, les plasmides amplifiés étaient vérifiés par la digestion enzymatique en utilisant des enzymes de restriction coupant dans l'insert et dans le plasmide. Le produit de digestion était ensuite déposé sur un gel d'agarose de 0,8% contenant de BET (Bromure d'éthidium).

2. Culture cellulaire

2.1. Lignées cellulaires

Au cours de ce travail, deux lignées cellulaires rénales ont été utilisées, **OKP (Opossum Kidney clone P)** et **HEK293 (Human Embryonic Kidney)**.

2.1.1. Cellules OKP

La lignée OKP, originaire de tubule proximal, est couramment utilisée pour la caractérisation biochimique de protéines recombinantes qui y sont exprimées de manière transitoire. Ces cellules sont connues par leur production accrue de protéines recombinantes transfectées de façon transitoire. Elles sont aussi utilisées pour la mesure de l'activité de transport ionique.

2.1.2. Cellules HEK293

La lignée HEK293, d'origine rénale facile à cultiver, est utilisée pour produire des protéines recombinantes, notamment celles qui nécessitent des modifications post-traductionnelles complexes pour être actives. Ces cellules sont hautement et facilement transfectable et permettent la réplication de nombreux plasmides ainsi que la maturation complète des protéines désirées.

2.2. Conditions de culture

Les cellules OKP et HEK293 sont maintenues en culture dans une boîte contenant un milieu spécifique de chaque lignée. Les cellules sont incubées dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. La composition des milieux utilisés est présentée au tableau 2.

Tableau 2 Composition de milieu de culture pour les lignées OKP et HEK293.

| OKP | HEK293 |
|--|--|
| DMEM*, high glucose, HEPES (lifetechnologies, ref : 42430-025) | DMEM*, high glucose, GlutaMAX (lifetechnologies, ref : 61965-026) |
| 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio) | |
| 1% de la pénicilline et de la Streptomycine (lifetechnologies, ref : 15140122) | |
| 1% de Pyruvate de Sodium (Sigma, ref : S8636) | |

*DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

2.2.1. Repiquage

Les cellules sont repiquées une fois par semaine, à confluence. Pour ce faire, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées avec 2 mL de trypsine-EDTA (lifetechnologies, 0,05% pour les HEK293 et 0,25% pour les OKP, ref : 25300-054 et 25200-056, respectivement), puis décollées par ajout de 2 ml de trypsine pendant 3-5 min à 37°C. La trypsine est inhibée par l'addition de Ca²⁺, présent dans le milieu de culture. Les cellules sont alors resuspendues avec le milieu complet OKP ou HEK (**Tableau 2**), puis selon le cas, une dilution est effectuée avec le milieu complet de culture approprié pour obtenir une quantité de 1 million de cellules OKP ou HEK par boîte de réserves de 75 cm² de surface, 0,8 million par boîte de pétri de 40mm de diamètre (B40), 1,5 millions par boîte de pétri de 60mm de diamètre (B60). Les cellules sont ensuite remises dans l'incubateur à 37°C sous 5% de CO₂.

2.2.2. Congélation

À la suite de la trypsinisation des cellules, le culot cellulaire, obtenu après centrifugation à 1000 x g pendant 5 min à 4°C, est resuspendu dans le milieu de congélation (SVF + 10% DMSO (Diméthylsulfoxyde)). Les cellules sont par la suite aliquotées dans des tubes de congélation puis transférées dans la boîte spéciale congélation (contenant de l'isopropanol). Elles sont stockées à -80°C pendant ~ 4 mois et, finalement, stockées dans de l'azote liquide (-195°C). La décongélation peut se faire à n'importe quel moment du processus.

2.3. Expression des protéines

2.3.1. Transfection avec la lipofectamine plus

Afin de transférer dans les cellules OKP ou HEK293 de manière transitoire les plasmides d'intérêt, deux solutions A et B sont préparées dans un milieu de culture à réduction de sérum, Opti-MEM (Invitrogen, ref : 31985-070). La solution A comprend les Plasmides d'intérêt et le réactif plus (Invitrogen, ref : 11514-015), alors que la solution B comprend la lipofectamine (Invitrogen, ref : 18324-012). Les expériences de transfection ont été réalisées avec les différentes quantités de réactifs et de plasmides comme indiquées dans le tableau 3. Après une incubation de 20 min à température ambiante (TA), les solutions A et B sont ensuite mises ensemble dans un mélange qui est déposé, après 20 min d'incubation à TA, sur les cellules confluentes à 60-70%, préalablement lavées deux fois avec de l'Opti-MEM. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 5 h. Après ce temps d'incubation, la transfection est arrêtée en remplaçant le milieu de transfection par du milieu complet adéquat.

Tableau 3 Volume de plasmides, de réactif plus, de lipofectamine utilisés pour transférer une boîte de 60mm/40mm de diamètre.

| Mélange A | | | | Mélange B | | Diamètre de la boîte (mm) |
|-----------|------------|----------------|--------------------|----------------|---------------------|---------------------------|
| Plasmide | V(μL) ADN* | V(μL) Optim-EM | V(μL) réactif plus | V(μL) Optim-EM | V(μL) lipofectamine | |
| C | X** | 250-X-8 | 8 | 238 | 12 | 60mm |
| C | Y*** | 100-Y-6 | 6 | 96 | 4 | 40mm |

*Volume suffisant pour 2μg/B60 et 1μg/B40 en μl de plasmide C

**X= 2000/(concentration de C en ng/μL)

***Y= 1000/(concentration de C en ng/μL)

2.4. Knockdown des protéines endogènes

Afin de d'invalider les gènes codant pour différents partenaires de NKCC2, nous avons utilisé la technique de *small interfering RNA* (siRNA) par reverse transfection dans les cellules HEK. Le siRNA d'OS-9 utilisé a été commandé de chez Dharmacon (ref : L-010811-01-0005) et Santa Cruz Biotechnology (ref : sc-96230). Pour le Knockdown de MAGED2, un mélange de 4 siRNA (1 : GGACGAAGCUGAUUUCGGA, 2 : GCUAAAGACCAGACGAAGA, 3 : AGGCGAUGGAAGCGGAUUU, 4 : GAAAAGGACAGUAGCUCGA) a été acheté chez Dharmacon. Nous avons utilisé le siRNA dont la séquence UUUCUCUUGAACUCCUCCAUU spécifique de HSPA1A, utilisée dans une étude antérieure (171). Dans une boîte de diamètre 40 mm, 30 pmol de siRNA étaient dilués dans 500 μL de

l'Opti-MEM et 10 μ l de lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, ref : 13778-075) était additionné. 1.5 millions des cellules diluées dans un milieu de culture HEK sans antibiotique étaient ensuite ajoutées au mélange étalé dans la boîte. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 16 h, ensuite le milieu est changé par un autre milieu qui contient de l'antibiotique. Après 4 h de changement de milieu, les cellules étaient transfectées par le plasmide codant pour NKCC2.

3. Extraction protéique

Les cellules transfectées sont placées sur un plateau 4°C, lavées trois fois avec du PBS (Invitrogen, ref : 14190-094) froid puis 250 μ L/B40 ou 500 μ L/B60 d'un tampon de lyse est ajouté. L'extraction protéique est réalisée avec le tampon de solubilisation pH 7.4 (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, et 1% Triton X-100) contenant des inhibiteurs de protéases (Thermo Scientific, ref : 88666). Ensuite les cellules contenant le tampon de lyse sont récupérées dans un tube 1,5 mL à l'aide d'un récolteur et incubées pendant 1 h à 4°C sous agitation. Les noyaux et les cellules non solubilisées sont ensuite culottés par centrifugation (16000 rpm, 15 min à 4°C). Le surnageant est prélevé et dénaturé par ajout du tampon de dénaturation (2 % SDS, 40 mM dithiothreitol (DTT), EDTA 5 mM, 10% Glycérol, 0,01% bleu de bromophénol). Ensuite les échantillons sont chauffés 10 min à 95°C, avant d'être déposés sur un gel SDS-PAGE 7,5%.

4. Electrophorèse et immunodétection

La séparation des protéines en condition dénaturante (SDS-PAGE) est réalisée sur un gel d'acrylamide à 7,5%. Ainsi, 10 μ g de l'échantillon sont déposés sur le gel en présence d'un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) (Invitrogen, ref : 26616). Les protéines sont séparées pendant ~ 2h à 125V, en présence de tampon de migration (Tris base 25mM, 192mM de glycine et 0,1% SDS). Ces protéines sont, par la suite, transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 mm de porosité ; Thermo Scientific, ref : 88018) durant 1h30min à 40V et à 4°C dans le tampon de transfert (80% de tampon de migration et 20% d'éthanol). L'immunodétection est réalisée après saturation des sites non spécifiques au niveau de la membrane de nitrocellulose par le tampon de blocage (PBS, 5% de lait écrémé, 0,05% Tween 20) pendant 1 h à TA sous agitation. L'incubation avec les anticorps est réalisée à TA pendant 1 h 30 min ou à 4°C pendant la nuit sous agitation (les dilutions sont indiquées dans le tableau 4). La membrane est ensuite lavée 5 fois pendant 10 min dans du PBS-Tween 0,05%. La détection du complexe anticorps-antigène se fait grâce à un anticorps secondaire

marqué à la peroxydase. Cet anticorps secondaire est dilué dans le lait 5% (dans du PBS-Tween 0,05%), est déposé sur la membrane pendant 1h à TA sous agitation. La membrane est lavée 5 fois pendant 5 min, dans du PBS-Tween 0,05%.

Une réaction de chimiluminescence est effectuée en déposant sur la membrane une solution préparée de ECL (*Pierce ECL Western Blotting Substrate* ; Thermo Scientific, ref : 32106) pour une durée de 1 min à TA.

5. Immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation permet de mettre en évidence des interactions entre des protéines dans un système cellulaire. Après 48h de transfection, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS froid. Les protéines ont été solubilisées avec le tampon de lyse (10 mM Hépès pH 7,9 ; 0,4 M NaCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,5 mM EGTA ; 5% glycérol ; 0,5% NP40) contenant les inhibiteurs de protéases. La co-immunoprécipitation s'effectue à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'une des protéines du complexe. Cet anticorps est incubé avec des protéines G couplées avec des billes d'agarose magnétique (Dynabeads Protein G ; Invitrogen, ref : 10004D) pendant 40 min à TA. Les protéines G ont une grande affinité pour les anticorps formant ainsi un complexe, nommé immunocomplexe. Cet immunocomplexe est lavé 3 fois avec 0,5 ml de tampon sodium phosphate 0,1 M pH 7 tween 0,01%. Puis à cet immunocomplexe est ajouté le lysat cellulaire contenant le complexe protéique d'intérêt. Le tout est incubé pendant 1h à température ambiante sous agitation lente. Ensuite, cet immunocomplexe est lavé 3 fois avec 1 mL de PBS. Enfin, l'élution est effectuée en diluant l'immunocomplexe dans le tampon d'élution (3 volumes de solution de lyse + 2 volumes de tampon de dénaturation), le tout est chauffé 10 min à 95°C, puis le surnageant contenant le complexe protéique immunoprécipité est récupéré après la fixation des billes magnétiques sur l'aimant. Les échantillons ont été ensuite analysés par immunoempreinte. Cette dernière analyse est réalisée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la seconde protéine d'intérêt.

6. Biotinylation

La biotinylation permet de mettre évidence la régulation de l'expression membranaire des protéines. Après 48 h de transfection, les cellules ont été placées sur glace et rincées 4 fois avec une solution du PBS-Ca-Mg froide contenant : PBS, 0,1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, pH 8. Les cellules ont été incubées à 4°C pendant 1h dans la même solution du PBS-Ca-Mg contenant 1 mg/mL Sulfo-NHS-LC-Biotine (Thermo Scientific, ref : 21335). Les cellules ont ensuite été rincées 3 fois avec une solution de 'quenshing' (100mM glycine ajouté à la solution du rinçage) et incubées à 4°C dans la même solution 'quenshing' pendant 10min. Puis, les cellules ont été

de nouveau lavées 3 fois avec du PBS-Ca-Mg. L'extraction protéique est ensuite réalisée avec le tampon de lyse (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM KCl, 120 mM Tris/Hépès, pH 7.4, 1% Triton X-100) contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons ont été récoltés à l'aide d'un récolteur et incubés pendant 1 h à 4°C sous agitation. Les noyaux et les cellules non solubilisées sont ensuite culottés par centrifugation (16000 rpm, 15 min à 4°C). Des aliquotes du lysat cellulaire ont été prélevés afin de révéler la fraction protéique totale. Les protéines ont été quantifiées et normalisées par la méthode de Bradford. Ensuite, les protéines biotinylées ont été immunoprécipitées par des billes d'avidine pendant la nuit à 4°C sous agitation lente. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 16000 rpm pendant 5 min à 4°C, et le surnageant (les protéines non biotinylées) a été retiré. Les billes d'avidine ont été lavées 7 fois avec le tampon de solubilisation et centrifugées pendant 7 min à 16000 rpm à 4°C. Les culots ont été incubés dans un tampon d'éluion (3 volumes de tampon de solubilisation + 2 volumes de tampon de dénaturation) pendant 10 min à 95°C, et stockés à -20°C. Dix microgrammes de chaque fraction ont été utilisés pour une analyse par immunoempreinte.

7. Immunolocalisation cellulaire

7.1. Principe général

Dans la technique d'immunofluorescence indirecte, l'immunomarquage permet de localiser une protéine dans un tissu ou dans une cellule à l'aide d'un anticorps spécifique puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Dans la technique de fluorescence directe, la protéine d'intérêt est fusionnée à une protéine auto-fluorescente (à titre d'exemple : la GFP). La fluorescence dans les deux cas, est ensuite détectée à l'aide de microscopie classique ou de microscopie confocale.

7.2. Protocole d'immunomarquage

Pour les expériences d'immunolocalisation, les cellules transfectées avec la construction Myc-NKCC2 et/ou avec la construction contenant la protéine interagissant avec NKCC2 fusionnée avec une étiquette, sont cultivées sur des lamelles rectangulaires en verre. Après 48 h de culture, la localisation cellulaire des protéines étudiées est obtenue après fixation des cellules pendant 20 min à TA sans agitation par le paraformaldéhyde à 2% dans du DMEM. Les cellules sont ensuite fixées avec 50 mM NH₄Cl pendant 5 min pour saturer les sites oxydés générés par le paraformaldéhyde. Après fixation, les cellules sont perméabilisées avec de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 pendant 1 min et la lamelle est saturée avec du DAKO (*Antibody Diluent, Background Reducing* ; Agilent, ref : S302283-2) pendant 30 min à TA sans

agitation pour bloquer les sites de liaison non spécifiques. L'immunofluorescence indirecte a été effectuée en utilisant un anticorps primaire selon le cas. Les cellules ont été incubées pendant 1 h à TA avec un anticorps primaire dilué dans le DAKO (les dilutions sont indiquées dans le tableau 4). Cette incubation avec l'anticorps primaire a été suivie par une autre incubation avec un anticorps secondaire conjugué à FITC ou au texas red, selon le cas, dilué à 1/200 dans le DAKO. L'immunofluorescence directe a été effectuée en transfectant les constructions de NKCC2 fusionnés avec le fluorochrome EGFP.

Tableau 4 dilution des anticorps utilisés

| Anticorps (espèce) | Immunoempreinte | Immunofluorescence |
|--|------------------------|---------------------------|
| Anticorps primaires | | |
| Anti-Myc (souris) (clontech, ref : 631206) | 1/2500 | 1/100 |
| Anti-Myc (lapin) (Invitrogen) | | 1/50 |
| Anti-V5 (souris) (Invitrogen) | 1/100000 | 1/500 |
| Anti-OS-9 (lapin) (Invitrogen) | 1/1000 | |
| Anti-MAGED2 (lapin) | 1/2500 | |
| Anti-HA (rat) (Sigma) | 1/2500 | |
| Anti- β -actine (souris) (Sigma) | 1/100000 | |
| Anti-clanexine (lapin) (Abcam, ref : 22595) | | 1/100 |
| Anticorps secondaires | | |
| Anti-souris (Bio-rad, ref : 1706516) | 1/10000 | |
| Anti-lapin (Bio-rad, ref : 1706515) | 1/10000 | |
| Anti-rat (Sigma) | 1/10000 | |
| Anti-souris (Texas Red) | | 1/200 |
| Anti-lapin (FITC) | | 1/200 |

7.3. Microscopie confocale

Le microscope confocal, utilisant le laser pour balayer la surface d'intérêt, permet de visualiser, à l'aide de fluorochromes, des protéines au niveau cellulaire et tissulaire. La technique d'imagerie confocale à fluorescence permet d'obtenir des images de grande résolution grâce à des coupes « optiques » de l'échantillon obtenues par une projection sur l'axe Z. Basée sur l'élimination des signaux de fluorescence provenant des régions situées en dehors du plan focal, cette technique permet d'étudier la co-localisation de protéines à l'échelle subcellulaire. Le système disponible au sein de l'institut est un microscope confocal LSM 710. Il est équipé de quatre lasers : deux diodes lasers (CW/pulsed et DPSS), un Hélium-Néon et un Argon permettant d'obtenir 8 raies d'excitation (405, 457, 488, 514, 561 et 633 nm), couvrant ainsi tout le spectre d'excitation. L'objectif utilisé est un 63X à immersion. L'acquisition de la fluorescence, la reconstitution des images et les échelles sont données par le logiciel contrôlant le système : LSM Zen (ZEISS).

8. Mesure de stabilité des protéines

Afin de mesurer la stabilité de la forme immature de NKCC2, deux techniques différentes ont été utilisées : pulse 'chase' et cycloheximide 'chase'.

8.1. Pulse 'chase'

La technique pulse 'chase' a pour intérêt de suivre *in vivo* le devenir d'une protéine au cours du temps. Cette technique consiste en un marquage des protéines néosynthétisées par incorporation de méthionine et de cystéine marquées au ^{35}S pendant une période déterminée (pulse ou poussée), puis en un suivi de ces protéines marquées au cours du temps dans un environnement contenant ces mêmes acides aminés froids (chase ou chasse).

À environ 90% de confluence, les cellules OKP transfectées de manière transitoire étaient rincées trois fois avec du PBS contenant 0,1 mM de Ca^{2+} et 2 mM Mg^{2+} , puis incubées 1 h dans un milieu DMEM ne contenant ni méthionine ni cystéine (Invitrogen) à 37°C. Celles-ci étaient ensuite incubées à 37°C dans le même milieu supplémenté par 200 μCi de méthionine et cystéine marquées au ^{35}S (PRO-MIXTM L- ^{35}S) *in vitro* cell labelling mix, Amersham Biosciences) pendant 1h à 37°C (**Figure 12**). Les protéines radiomarquées nouvellement synthétisées durant la période de pulse pouvaient ainsi être suivies au cours du temps. Après deux rinçages au PBS contenant 0,1 mM de Ca^{2+} et 2 mM Mg^{2+} , les cellules étaient alors incubées pendant une durée variable (de 0, 1, 2, 4h) dans le milieu de culture habituel. À la fin de la période de chasse, l'extraction des protéines a été réalisée selon la technique sus-décrite.

Les protéines ont été ensuite dosées et immunoprécipitées avec l'anticorps anti-Myc (l'étiquette de NKCC2)

Les protéines immunoprécipitées étaient ensuite séparées en condition dénaturante (SDS- PAGE) sur des gels d'acrylamide à 7,5%. Après un rinçage de 5 min dans de l'eau, les gels étaient séchés sous vide pendant 75 min à 70°C. Les gels secs étaient par la suite exposés dans une cassette Kodak BioMax (Kodak, France) contenant un film Kodak (Kodak BioMax MS film, Kodak, France) pendant 7 à 10 jours à -80°C. Les films sont enfin révélés par autoradiographie. Les mesures d'intensité de radioactivité ont été réalisées à l'aide du logiciel NIH Image J.

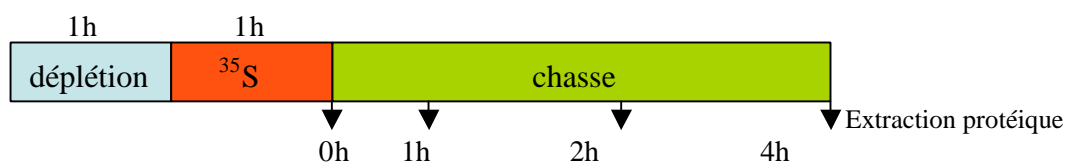


Figure 12 schéma représentant le protocole utilisé pour étudier la stabilité.

8.2. Cycloheximide 'chase'

La technique de cycloheximide 'chase' a pour intérêt de suivre *in vivo* la stabilité d'une protéine au cours du temps. La cycloheximide est un antifongique qui bloque la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes. C'est un inhibiteur à la fois de la phase d'initiation et d'élongation dans la synthèse protéique. Après 12-16 h de transfection des cellules rénales, les cellules ont été traitées avec la cycloheximide à une concentration de 20 µg/ml dans le milieu de culture. Les protéines nouvellement synthétisées après la transfection pouvaient être suivies au cours du temps (période de chasse). À la fin de la période de chasse, l'extraction des protéines a été réalisée selon les procédures sus-décrites.

9. Mesure de pH intracellulaire et de l'activité de co-transport Na-K-2Cl

Le pH est mesuré grâce aux variations d'intensité de fluorescence du 2',7'-bis(carboxyéthyl)5(6)-carboxyfluorescéine (BCECF). Cette sonde est introduite dans le milieu où les cellules confluentes sont cultivées sur des lamelles rectangulaires en verre de 12 mm de largeur, sous sa forme estérifiée (BCECF-AM ; Invitrogen, ref : B1150), non fluorescente et diffusible à travers les membranes cellulaires. Dans la cellule, elle est destérifiée par les estérases cellulaires, elle devient fluorescente et imperméante.

Les cellules sont chargées en BCECF-AM (dans le bain) pendant 20 min à 37°C dans un milieu tampon de HEPES/Tris contenant 135 mM NaCl ; 10 mM HEPES pH 7,4 ; 5mM KCl ; 1mM MgCl₂ ; 0,8mM KH₂PO₄ ; 0,2mM K₂HOP₄ ; 1mM CaCl₂ et 10m MBaCl₂. Afin de

mesurer l'activité de NKCC2, la vitesse de récupération du pH intracellulaire a été mesurée suite à l'ajout de 20mM de NH₄Cl au milieu iso-osmotique (remplaçant le NaCl).

La fluorescence du BCECF étant dépendante des variations de pH à la longueur d'onde d'excitation 490 nm et non sensible à 440 nm (témoin d'intégrité des cellules et de la sonde fluorescente), le rapport 490 nm sur 440 nm est donc proportionnel aux variations de pHi. Ainsi, l'activité du transport de NKCC2 est exprimée par le rapport dpHi/dt.

10. Analyse statistique

Les différentes données proviennent d'expériences indépendantes en utilisant des préparations cellulaires différentes. Chacune des expériences présentées dans cette étude a été répétée au minimum trois fois. Pour chacune de ces expériences, les barres d'erreurs correspondent aux écarts type de la moyenne. Les données ont été analysées en utilisant le test t de Student pour des données non appariées. La significativité statistique a été définie comme $p < 0,05$.

Résultats

Première partie :

**Identification des partenaires
protéiques impliqués dans le contrôle
de qualité de NKCC2**

Introduction

Comme décrit dans l'introduction bibliographique, NKCC2 est une protéine clé de la fonction rénale, surtout dans l'homéostasie hydro-électrolytique et acido-basique de l'organisme. Malgré cette importance, les informations concernant la régulation intracellulaire du co-transporteur restent très pauvres. De plus, aucune étude n'a décrit le mécanisme de contrôle de qualité au niveau du RE de NKCC2. Grâce au criblage par le système de double hybride chez la levure, d'une librairie d'ADNc de rein humain, notre laboratoire a identifié plusieurs partenaires de NKCC2 qui peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression de ce co-transporteur. Pour cette partie de travail, nous avons choisi la protéine OS-9 pour étudier son effet sur l'expression de NKCC2. La protéine OS-9 fait partie des molécules chaperonnes réticulaires dont la fonction est d'empêcher les agrégats protéiques dans la cellule. Pour accomplir ce rôle, ces protéines peuvent faciliter l'acquisition d'une conformation fonctionnelle des protéines nouvellement synthétisées ou les diriger vers la voie de dégradation par le protéasome. Toutefois, le rôle précis d'OS-9 peut varier, allant d'un rôle dans la maturation à un rôle dans la dégradation des protéines, ceci en fonction du substrat protéique (172-175).

Le but de cette partie est de déterminer le rôle d'OS-9 dans la régulation du contrôle de qualité de NKCC2. Les résultats obtenus seront présentés sous forme d'un article publié dans JBC (The Journal of Biological Chemistry).

OS9 Protein Interacts with Na-K-2Cl Co-transporter (NKCC2) and Targets Its Immature Form for the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Pathway*

Received for publication, November 8, 2015, and in revised form, December 23, 2015. Published, JBC Papers in Press, December 31, 2015, DOI 10.1074/jbc.M115.702514

Elie Seaayfan, Nadia Defontaine, Sylvie Demaretz, Nancy Zaarour¹, and Kamel Laghmani²

From INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, U1138, Paris 75006, France, CNRS, ERL8228, Paris 75006, France, Université Pierre et Marie Curie, Paris 75006, France, and Université Paris-Descartes, Paris 75005, France

Mutations in the renal specific Na-K-2Cl co-transporter (NKCC2) lead to type I Bartter syndrome, a life-threatening kidney disease featuring arterial hypotension along with electrolyte abnormalities. We have previously shown that NKCC2 and its disease-causing mutants are subject to regulation by endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). The aim of the present study was to identify the protein partners specifically involved in ERAD of NKCC2. To this end, we screened a kidney cDNA library through a yeast two-hybrid assay using NKCC2 C terminus as bait. We identified OS9 (amplified in osteosarcomas) as a novel and specific binding partner of NKCC2. Co-immunoprecipitation assays in renal cells revealed that OS9 association involves mainly the immature form of NKCC2. Accordingly, immunocytochemistry analysis showed that NKCC2 and OS9 co-localize at the endoplasmic reticulum. In cells overexpressing OS9, total cellular NKCC2 protein levels were markedly decreased, an effect blocked by the proteasome inhibitor MG132. Pulse-chase and cycloheximide-chase assays demonstrated that the marked reduction in the co-transporter protein levels was essentially due to increased protein degradation of the immature form of NKCC2. Conversely, knockdown of OS9 by small interfering RNA increased NKCC2 expression by increasing the co-transporter stability. Inactivation of the mannose 6-phosphate receptor homology domain of OS9 had no effect on its action on NKCC2. In contrast, mutations of NKCC2 *N*-glycosylation sites abolished the effects of OS9, indicating that OS9-induced protein degradation is *N*-glycan-dependent. In summary, our results demonstrate the presence of an OS9-mediated ERAD pathway in renal cells that degrades immature NKCC2 proteins. The identification and selective modulation of ERAD components specific to NKCC2 and its disease-causing mutants might provide novel therapeutic strategies for the treatment of type I Bartter syndrome.

The thick ascending limb of loop of Henle (TAL)³ of the kidney is responsible for absorbing 20–30% of the filtered load of NaCl (1, 2). Given that the reabsorptive capacity of downstream portions of the nephron is limited, inhibition of TAL transport capacity results in marked natriuresis and diuresis, making specific inhibitors of NaCl transport in TAL cells such as furosemide or bumetanide the most potent class of all diuretics (3). The apically located Na-K-2Cl co-transporter (NKCC2) is the pacemaker of TAL sodium chloride reabsorption (2). Hence, the activity of NKCC2 is a key determinant of final urinary salt excretion, consequently influencing long term blood pressure levels (2). This is of particular interest because changes in NKCC2 expression can be caused by several conditions such as high salt intake (4), diabetes mellitus (5), obesity (6), and aging (7). Inherited variation in the activity of NKCC2 or its regulators alters blood pressure in humans (8). Indeed, loss-of-function mutations in the NKCC2 gene, *SLC12A1*, cause type I Bartter syndrome (BS1), a life-threatening disease featuring arterial hypotension along with electrolyte abnormalities (2). Conversely, enhanced activity of NKCC2 has been linked to salt-sensitive hypertension (2, 8, 9). More recently, it was shown that carriers of rare NKCC2 mutations are protected against the development of arterial hypertension, further supporting the notion that factors governing the activity of NKCC2 are key determinants of essential hypertension in the general population (10–12). Intriguingly, despite the importance of NKCC2 in the regulation of blood pressure and the pathogenesis of Bartter syndrome, the molecular mechanisms underlying the trafficking, targeting, and turnover of NKCC2 remain largely unknown.

NKCC2 belongs to the superfamily of electroneutral cation-coupled chloride co-transporters, which also contains the Na-Cl and K-Cl co-transporters (13). Similar to nearly all membrane proteins, the preparation for appropriate trafficking starts as the co-transporter protein is inserted into the endoplasmic reticulum (ER) (14–16). The ER acts therefore as an

* This work was supported in part by grants from INSERM, Paris, France. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ Recipient of a thesis fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale and la Société de Néphrologie.

² To whom correspondence should be addressed: INSERM/UPMC/CNRS-U1138, ERL8228, Team 3, 15 Rue de l'école de médecine, 75270 Paris Cedex 06, France. Tel.: 33-1-44-27-50-68; Fax: 33-1-44-27-51-19; E-mail: Kamel.Laghmani@crc.jussieu.fr.

³ The abbreviations used are: TAL, thick ascending limb; OKP, opossum kidney; NCC, Na-Cl co-transporter; ER, endoplasmic reticulum; BS1, type I Bartter syndrome; p*H*_i, cytoplasmic pH; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; MRH, mannose 6-phosphate receptor homology; ERAD, endoplasmic reticulum-associated degradation; NKCC2, Na-K-2Cl co-transporter; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ENaC, epithelial sodium channel; Hsp, heat shock protein; CHIP, Hsp70-interacting protein; EGFP, enhanced GFP; ETB, endothelin B; dp*H*/dt, initial rate of intracellular pH recovery; TRP, transient receptor potential; DC-STAMP, dendritic cell-specific transmembrane protein.

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

important determinant of the amount of protein that reaches the plasma membrane (14, 15). The ER represents an important quality control mechanism for newly synthesized proteins given that it is the site where membrane and secretory proteins fold, and only properly folded proteins usually exit the ER (17). Incompletely folded proteins may be retained in the ER, and if folding cannot be achieved, they may form aggregates or be targeted for ER-associated protein degradation (ERAD) (18, 19). Based on their size and complex topologies, even the wild-type forms of integral membrane proteins such as cation-coupled chloride co-transporters are expected to encounter a significant number of hurdles during synthesis (19). The first integral membrane mammalian protein to be characterized as an ERAD substrate was the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (20, 21). CFTR folding and maturation in the ER is an inefficient, temperature-sensitive process as illustrated by the fact that 80% of wild-type CFTR is degraded via ERAD (20, 21). Likewise, the epithelial sodium channel (ENaC) assembles inefficiently after its insertion into the ER; a substantial portion of its subunits is targeted for ERAD (22, 23). The ERAD pathway is a multistep process that requires substrate recognition, retrotranslocation, ubiquitination, and proteolysis of aberrant proteins (18, 19). Generally, the selection of misfolded proteins requires substrate-specific interactions with molecular chaperones (18, 19). For instance, the ERAD of CFTR is a complex process requiring several chaperones such as members of the heat shock protein 70 (Hsp70) and 40 (Hsp40) protein family, Hsp70-interacting protein (CHIP), and derlin 1 (24). Similar to ENaC (22, 23) and CFTR (20, 21), we previously demonstrated that NKCC2 is a substrate for the ERAD quality control system (25, 26). Most importantly, we found evidence that the maturation of NKCC2 is also a relatively slow and inefficient process and suggested that export from the ER constitutes the limiting step in the maturation and cell surface expression of the co-transporter (26). Accordingly, the majority of newly synthesized NKCC2 proteins is trapped in the ER and destined for ERAD (25, 26). Despite this, our knowledge of the molecular mechanisms underlying the ER quality control of NKCC2 proteins is nil. More specifically, the identities of the protein partners of NKCC2 that are involved in the ERAD of the co-transporter are unknown. Accordingly, identifying proteins that specifically interact with NKCC2 at the ER should help to begin to define the pathway by which NKCC2 is subject to quality control. In this report, we describe a novel protein-protein interaction between the C-terminal tail of NKCC2 and OS9, a ubiquitous protein originally identified as being amplified in certain osteosarcomas (27). Previous studies have implicated a role for OS9 in ER quality control (28–31) and ER-to-Golgi transport (32–35). Here, we show that OS9 interacts with the ER-resident form of NKCC2 and promotes its degradation by the proteasome pathway, revealing therefore a new molecular pathway in the regulation of the co-transporter. Consequently, these findings may open up new avenues in studying the regulation of the ER-associated degradation of cation-coupled chloride co-transporters in general and in particular of renal Na-Cl co-transporters, proteins that are necessary for normal blood pressure homeostasis.

Experimental Procedures

Materials—All chemicals were obtained from Sigma unless otherwise noted. Penicillin and streptomycin were from Invitrogen. Subclonings were carried out with the following vectors: 1) pGKT7 (Clontech), 2) pCMV-Myc (Clontech), 3) pEGFP-C2 (Clontech), and 4) pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen).

Yeast Two-hybrid Assay—Yeast two-hybrid screening was performed as described previously in detail (29). Briefly, the cDNA fragment encoding the distal region of the NKCC2 C terminus (last 195 amino acids) was cloned in-frame with the GAL4 DNA-binding domain in pGBKT7-BD and transformed into the yeast strain AH109. AH109 expressing the bait was then mated with the Y187 yeast strain pretransformed with a human kidney cDNA library constructed in the pACT2-AD vector. Mated yeast cells were first grown on low stringency selection plates (–Leu, –Trp, –His) and then on high stringency selection plates (–Leu, –Trp, –His, –Ade). Colonies were tested for β -galactosidase activity, and DNA from positive clones encoding the putative interacting proteins was isolated from yeast cells using the RPM yeast plasmid isolation kit (BIO 101 Systems). Prey plasmids were rescued by transformation into DH5 α bacteria (Invitrogen) and isolated using a Qiagen kit. Insert sizes were checked by BglII digestion. cDNA plasmids were then sequenced and assessed using the BLAST program.

Plasmid Construction and Site-Direct Mutagenesis—The cDNAs encoding mouse NKCC2 and Na-Cl co-transporter (NCC) were fused at the N-terminal end of Myc (Myc-NKCC2 and Myc-NCC) or EGFP (EGFP-NKCC2) using pCMV-Myc and pEGFP-C2 vectors, respectively. The mouse pcDNA3 plasmid encoding mouse OS9.1 was a kind gift from L. Litovchick (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA). The mouse OS9 coding sequence was subcloned into the mammalian expression pcDNA3.1/V5 vector. Alanine, glutamine, or asparagine substitutions were introduced into the OS-V5 construct at Tyr-120 (Y120A), Gln-130 (Q130E), Arg-188 (R188A), Glu-212 (E212N), and Tyr-212 (Y212A) using the QuikChange mutagenesis system (Stratagene). All mutations were confirmed by sequencing.

Cell Culture—Opossum kidney (OKP) cells were grown in DMEM complemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 units/ml penicillin, and 100 units/ml streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. For DNA transfection, cells were grown to 60–70% confluence on plastic culture dishes and then transiently transfected for 5 h with plasmids using a Lipofectamine Plus kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For protein degradation assays, transiently transfected cells were treated with MG132 (10 μ M) or leupeptin (100 μ M) overnight prior to cell lysis.

Measurement of Intracellular pH and Na-K-2Cl Co-transporter Activity—Measurement of cytoplasmic pH (pH_i) was accomplished in cells grown to confluence on coverslips using the intracellularly trapped pH-sensitive dye 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein as described earlier (25, 26, 36, 37). Likewise, Na-K-2Cl co-transport activity was

measured as bumetanide-sensitive NH_4 influx as described previously (25, 26, 36, 37). Briefly, cells were first bathed at 37 °C in a CO_2 -free Hepes/Tris-buffered medium to measure baseline pH_i . 20 mM NH_4Cl was then added to the medium, causing a very rapid initial cellular alkalization followed by a pH_i recovery. The initial rate of intracellular pH recovery (dpH_i/dt) was measured over the first 20 s of recordings as reported earlier (36, 38). The dpH_i caused by NH_4Cl addition was used to calculate the cell buffer capacity, which was not different between the studied groups (data not shown). Hence, the Na-K-2Cl cotransporter transport activity is expressed as dpH_i/dt .

Protein Preparation, Immunoblotting, and Immunoprecipitation—Forty-eight hours post-transfection, cells were washed with cold PBS and lysed in 0.2 or 0.5 ml of lysis buffer (120 mM Tris/Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100) containing protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics catalog number 1697498). Samples were harvested and centrifuged at 16,000 rpm for 15 min at 4 °C. Protein expression levels were assessed after normalizing and loading equal amounts of total protein for 7.5% SDS-PAGE separation and immunoblotting with the antibodies of interest. For immunoprecipitation, cells were solubilized with lysis buffer containing 0.4 M NaCl, 0.5 mM EGTA, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes, pH 7.9, 5% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, and protease inhibitors (Complete). Immunoprecipitation was carried out using the primary antibody of interest and affinity purification using protein G-agarose beads (Dynal). After incubation with protein G-agarose beads for 1 h at room temperature, the immunocomplex was washed three times in PBS (Invitrogen). The protein samples were boiled in loading buffer, run on gradient 7.5% SDS-polyacrylamide gels, and probed with primary antibodies of interest and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody according to standard procedures. Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence detection (PerkinElmer Life Sciences) according to the manufacturer's instructions.

Biotinylation—Cells were placed on ice and rinsed twice with a cold rinsing solution containing PBS^+ , pH 8.0, containing 1 mM MgCl_2 , and 0.1 mM CaCl_2 . Cells were then gently agitated at 4 °C for 1 h in PBS^+ containing 1 mg/ml NHS-biotin. Biotinylation was stopped by incubation with PBS supplemented with 100 mM glycine. Cells were then washed three times in PBS supplemented with 1 mM MgCl_2 and 0.1 mM CaCl_2 . Washed cells were lysed for 1 h at 4 °C in solubilizing buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM KCl, 120 mM Tris/Hepes, pH 7.4, 1% (v/v) Triton X-100) containing protease inhibitors (Complete). After quantification and normalization, an aliquot of the total cell extract was taken from each sample to provide a measure of total NKCC2 expression, and the rest of the cell lysates were incubated with NeutrAvidin-agarose beads (Thermo Fisher) overnight at 4 °C. After overnight incubation, samples were centrifuged at 16,000 rpm for 5 min, and the supernatant (the intracellular fraction) was removed. Avidin beads were then washed with solubilizing buffer and centrifuged for 7 min at 16,000 rpm seven times. Pellets were incubated in solubilizing buffer and denaturing buffer for 10 min at 95 °C and stored at -20 °C. Each fraction was subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis.

Immunocytochemistry—48 h post-transfection, confluent cells were washed twice with PBS^{2+} , pH 8, containing 1 mM MgCl_2 and 0.1 mM CaCl_2 . Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature, incubated with 50 mM NH_4Cl , permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 min, and incubated with Dako antibody diluent with background-reducing components for 30 min to block nonspecific antibody binding. Fixed cells were incubated for 1 h at room temperature with the primary antibodies at appropriate dilution in Dako antibody diluent. To assess protein expression at the cell surface, confluent cells were first incubated at 4 °C for 1 h in PBS^{2+} containing 1 mg/ml NHS-biotin. Cells were rinsed three times in rinsing solution with 100 mM glycine and reincubated at 4 °C in the same solution for 10 min. After washing with PBS^{2+} , the monolayers were fixed and stained for cell surface biotin (avidin-Cy2; green). Mouse anti-Myc and anti-V5 antibodies were visualized with Texas Red-coupled secondary antibodies. Rabbit anti-calnexin was visualized with FITC-coupled IgG antibodies. Cells were then washed with PBS and mounted with Vectashield.

Pulse-Chase and Cycloheximide-Chase Assays—For pulse-chase assays, OKP and HEK 293 cells transiently transfected with NKCC2 plasmid cDNAs were incubated in cysteine- and methionine-free DMEM starvation medium for 1 h. Starvation medium was removed and replaced with DMEM labeling medium containing [^{35}S]methionine/cysteine labeling mixture. After 1 h, cells were rinsed three times with PBS and another three times with normal growth medium and returned to normal growth medium for the duration of chase to the specified time points. Cells were washed twice with ice-cold PBS and incubated on ice for 1 h in lysis buffer with a mixture of protease inhibitors after which solubilized extracts were collected for immunoprecipitation. Proteins were immunoprecipitated with monoclonal anti-Myc antibody, resolved by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose, and revealed by autoradiography. For cycloheximide-chase assays, cycloheximide was added at a concentration of 100 μM to OKP or HEK cells 12–14 h post-transfection with NKCC2 plasmids. Cell lysates were then collected at 0, 1, 2, and 4 h and analyzed by quantitative immunoblotting.

Small Interfering RNA (siRNA) Knockdown—The siRNAs for control and OS9 siRNAs were purchased from Dharmacon as ON-TARGETplus SMARTpools (L-010811-01-0005) and Santa Cruz Biotechnology siRNAs (sc-96230). HEK cells were first transfected with control or specific siRNA with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) using the manufacturer's specifications. 1 day after siRNA transfection, cells were transfected with NKCC2 plasmids. 24–48 h after NKCC2 transfection, cell lysates were analyzed for each protein using the indicated antibodies.

Statistical Analyses—Results are expressed as mean \pm S.E. Differences between means were evaluated using paired or unpaired *t* test or analysis of variance as appropriate. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Yeast Two-hybrid Screen Identifies OS9 as a Novel NKCC2-binding Protein—As described in previous reports, to identify novel NKCC2-interacting proteins, we used a yeast two-hybrid

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

system to screen a human kidney cDNA expression library using a series of bait fragments spanning the predicted cytoplasmic C terminus (residues 661–1095) of murine NKCC2 named C1-term (residues 661–768), C2-term (residues 741–909), and C3-term (residues 898–1095) (36, 37). We previously identified two NKCC2 binding partners, aldolase B (36) and SCAMP2 (37), that specifically interact with the proximal region of NKCC2 C terminus (residues 661–768). In this report, we describe results obtained from the distal region of NKCC2 C terminus (residues 898–1095, C3-term). 29 positive clones were selected by activation of three reporter genes, *ADE2*, *HIS3*, and *MEL1*. Among these positive clones, five matched the sequence originating from the same cDNA sequence. The protein encoded by this cDNA was originally identified as amplified in osteosarcomas and termed OS9 (27). Three splicing isoforms of human OS9 were initially described (39). The longest isoform, isoform 1, contains 667 amino acids; isoform 2 lacks amino acids 535–589, whereas isoform 3 lacks amino acids 456–470 and 535–589. All five identified clones code for the C-terminal domain of OS9 isoform-1 starting at residue 358. The interaction between OS9 and NKCC2 C3-term could be easily confirmed by retransforming the cloned cDNA into yeast using constructs issued from the yeast two-hybrid screening as judged by growth of the AH109 reporter strain on selection medium (Fig. 1A). To check for the specificity of the interaction between OS9 and C3-term, AH109 yeast cells were co-transformed with OS9 and NKCC2 C1-term (residues 661–768). In contrast to aldolase B (36) and SCAMP2 (37), no growth was observed when AH109 yeast cells were transformed with OS9 and the proximal region of NKCC2 C terminus (Fig. 1A), indicating that the co-transporter interaction with OS9 is specific to the distal region of NKCC2 C terminus.

OS92 Interacts with NKCC2 in Renal Cells—The above data clearly indicate that OS9 interacts specifically with the distal region of NKCC2 C terminus in yeast. To show that the interaction between OS9 and NKCC2 also occurs in mammalian cells, Myc-NKCC2 construct was transiently expressed either singly or in combination with OS9-V5 in OKP cells. Cell lysates were incubated with anti-V5 or anti-Myc antibody, and the resultant immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and immunoblotting. In agreement with our previous findings (25, 26, 36, 37), when NKCC2 is exogenously expressed in renal cultured cells, both the core (immature, ER-resident) and complex glycosylated (mature) forms are observed with the latter being more abundant. As shown in Fig. 1B, lane 3, immunoprecipitation of OS9 followed by immunoblotting for NKCC2 revealed robust co-immunoprecipitation of the two proteins as illustrated by the intensity of the bands corresponding to NKCC2 proteins. Interestingly, the interaction involves mainly the immature, ER-resident form of NKCC2 despite the predominant expression of mature, glycosylated NKCC2 in these cells. Moreover, the interaction appears to be specific because Myc-NKCC2 protein was not detected in control experiments in which OKP cells were not co-transfected with OS9-V5 (lane 2). In sum, these findings clearly indicate that the interaction of NKCC2 with OS9 is not an artifact of the yeast two-hybrid system and that the two proteins really

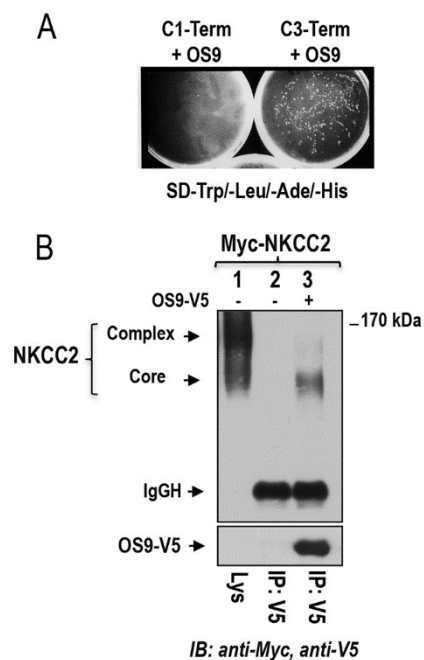


FIGURE 1. Identification of OS9 as a novel NKCC2-interacting protein. A, OS9 interacts specifically with the distal region of NKCC2 C terminus in yeast. A yeast two-hybrid assay was performed using the Matchmaker system as described under "Experimental Procedures." The experiment confirmed the interaction of OS9 with the distal region of NKCC2 C terminus 5 (C3-term) as judged by growth of the AH109 reporter strain on selection medium (–Trp, –Leu, –His, –Ade). In contrast, no growth was observed when AH109 was transformed with OS9 and C1-term. B, NKCC2 interacts *in vivo* with OS9 in OKP cells. OKP cells transiently expressing Myc-NKCC2 singly or in combination with OS9 were immunoprecipitated (IP) with anti-V5 anti-body (lanes 2 and 3). 5% of total cell lysate (Lys) was resolved as a positive control. NKCC-2 co-immunoprecipitated with OS9 was detected by immunoblotting (IB) using anti-Myc (lane 3). The positions of the core glycosylated (immature) and complex glycosylated (mature) proteins of NKCC2 are indicated. The interaction of NKCC2 with OS9 involves mainly the core glycosylated, immature form of the co-transporter. SD, synthetic defined medium; IgGH, the heavy chain of IgG.

associate *in vivo*. Most importantly, they demonstrate that this interaction involves mainly the core glycosylated form of the co-transporter.

OS9 Also Interacts with the NCC—The sequence of NKCC2 C terminus protein shares considerable homology with other members of the sodium-dependent chloride transporter family, namely the ubiquitous Na-K-2Cl co-transporter isoform NKCC1 and the related kidney-specific electroneutral NCC (2), suggesting that they may have several common binding proteins. In support of this notion, we previously showed that SCAMP2 interacts with NKCC2 and with NCC (37). Hence, to determine whether OS9 also interacts with NCC, we performed a co-immunoprecipitation assay in OKP cells using Myc-NCC and OS9-V5 proteins. Moreover, to test for the specificity of the interaction, we also checked, under the same experimental conditions, whether OS9 could interact with the endothelin B (ETB) receptor. Like NKCC2, the ETB receptor is expressed in the TAL, but it is not structurally related to the Na-Cl co-transporter family. Similar to NKCC2 (Fig. 2A, lane 3), NCC protein could be recovered from OS9 immunoprecipitates (Fig. 2A, lanes 7 and 10), indicating interactions between the proteins. Moreover, like NKCC2, the interaction of OS9 with NCC involves mainly the immature form of the co-transporter (Fig.

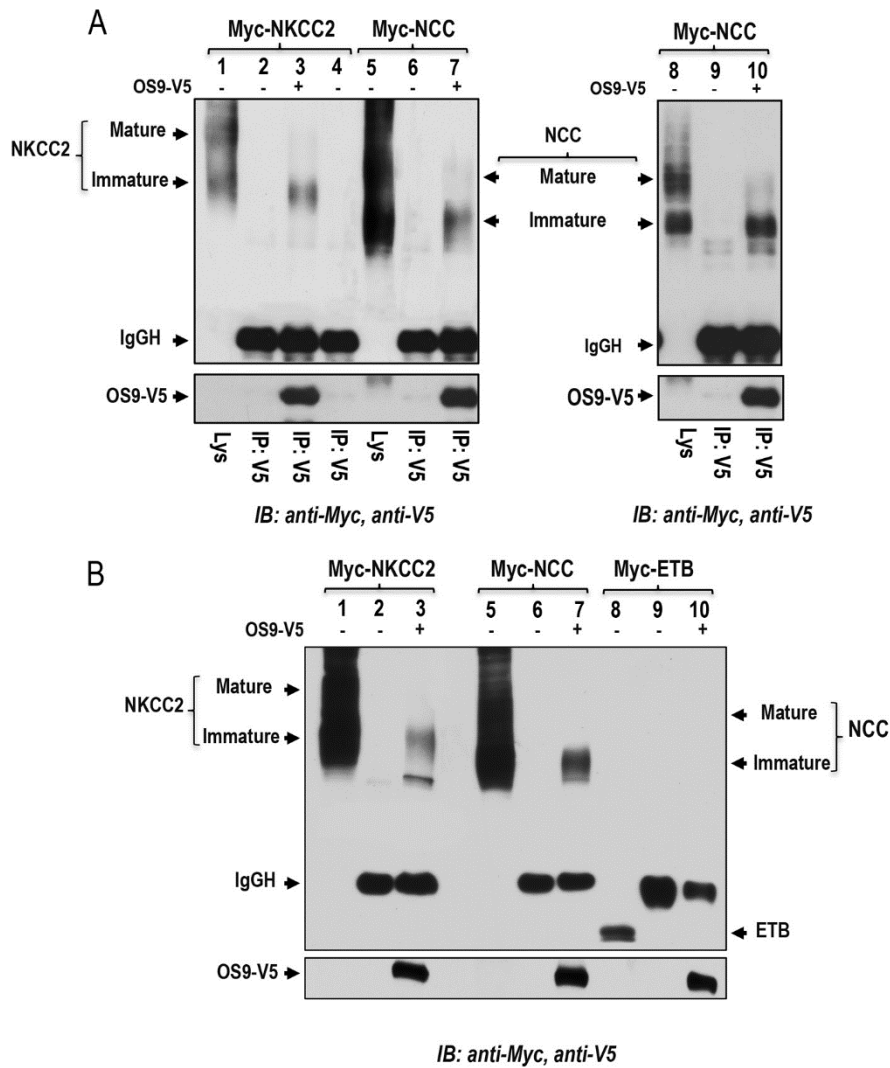


FIGURE 2. OS9 interacts specifically with NKCC2 and the related NCC. *A*, co-immunoprecipitation of OS9 with NKCC2 and NCC in OKP cells. Cell lysates from cells transiently transfected with Myc-NKCC2 or Myc-NCC in the presence or absence of OS9-V5 were immunoprecipitated (IP) with anti-V5 antibody. Similar to NKCC2, NCC co-immunoprecipitated with OS9-V5 was detected by immunoblotting (IB) using anti-Myc (lanes 7 and 10). Again, the interaction with OS9 involves mainly the core glycosylated (immature) form of the co-transporters. 5% of total cell lysate (Lys) was resolved as a positive control. *B*, OS9 does not interact with ETB receptor. Cell lysates from OKP cells transiently transfected with the co-transporters proteins or ETB receptor in the presence or absence of OS9-V5 were immunoprecipitated with anti-V5 anti-body. Again, 5% of total cell lysate (Lys) was resolved as a positive control. In contrast to NKCC2 and NCC, ETB receptor protein was not recovered from OS9 immunoprecipitates (lane 10). IgGH, the heavy chain of IgG.

2A, lanes 7 and 10). In contrast to the co-transporter proteins (Fig. 2, *A* and *B*), the ETB receptor did not co-immunoprecipitate with OS9 (Fig. 2*B*, lane 10), providing additional evidence for the specificity of the interaction of OS9 with NCC and NKCC2 in renal cells.

NKCC2 and OS9 Co-localize at the ER—The association of OS9 with the immature form of NKCC2 suggests that the two proteins interact in the ER. To support this hypothesis, we visualized the subcellular distribution of NKCC2 and OS9 proteins by immunofluorescence microscopy in renal cultured cells. To that end, OKP cells were co-transfected with EGFP-NKCC2 and OS9-V5 proteins. Of note, we have previously shown that, similar to Myc, N-terminal tagging of NKCC2 with EGFP does not influence the co-transporter intracellular trafficking (25, 36). As shown in Fig. 3*A*, NKCC2 (green) largely co-localized with OS9 (red), indicating that these two proteins share overlapping subcellular localization. Moreover, the two proteins

displayed an immunofluorescence staining pattern that is more restricted to a perinuclear ER-like distribution, which is in agreement with an interaction of NKCC2 with OS9 at the ER. To confirm this, the subcellular localization of NKCC2 in the presence and absence of transfected OS9 was compared with the distribution of calnexin, an ER marker. As anticipated, when transfected alone, NKCC2 was found distributed primarily in the plasma membrane. Under these conditions, NKCC2 cell surface expression surrounded the calnexin signal (Fig. 3*B*, upper panels). In contrast, upon OS9 co-expression, a significant fraction of total NKCC2 appeared, most of the time, to be retained in the ER as judged by its excellent co-localization with the ER marker calnexin (Fig. 3*B*, lower panels). Accordingly, OS9 protein also displayed considerable co-localization with calnexin (Fig. 3*C*). Collectively, these findings provide additional evidence that NKCC2 and OS9 interact, an interaction that takes place mainly in the ER. Moreover, they suggest that

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

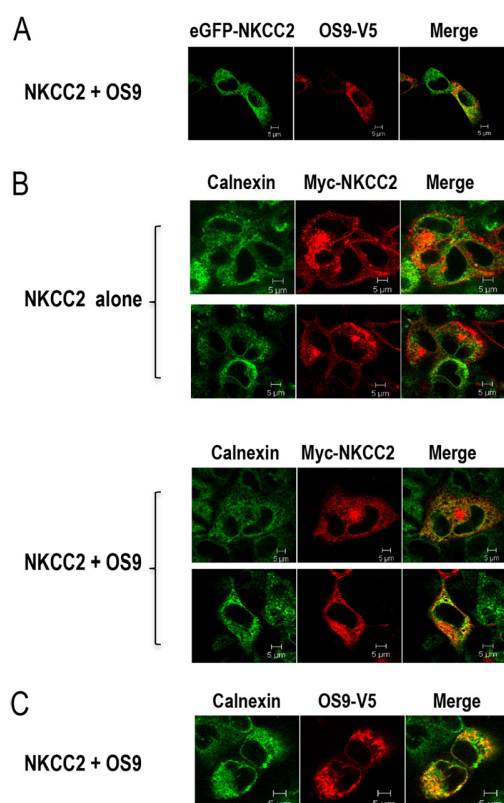


FIGURE 3. OS9 co-localizes with NKCC2 in the endoplasmic reticulum. *A*, immunofluorescence confocal microscopy showing distribution of NKCC2 and OS9 in OKP cells. OKP cells were transfected with NKCC2 N-terminally tagged with EGFP (green) and OS9-V5. Fixed and permeabilized cells were stained with mouse anti-V5 for OS9 (Texas Red). The yellow color (merged image) indicates co-localization of the proteins. *B*, effect of OS9 on subcellular distribution of NKCC2. OKP cells transfected with Myc-NKCC2 alone or with OS9 were stained with mouse anti-Myc (Texas Red; red) and rabbit anti-calnexin (fluorescein isothiocyanate; green). The yellow color indicates overlap between the Myc tag of NKCC2 protein (green) and the ER marker (red), representing co-localization of the proteins. *C*, subcellular distribution of OS9 in OKP cells. OKP cells overexpressing NKCC2 and OS9-V5 were stained with mouse anti-V5 (Texas Red; red) and rabbit anti-calnexin (FITC; green). The yellow color in the merged image indicates co-localization of OS9 (red) with the ER marker (green). The white scale bars represent 5 μ m.

OS9 regulates NKCC2 transit through the ER to alter its cell surface expression.

OS9 Regulates the Amount of NKCC2 Protein—Numerous previous reports documented that OS9 plays a pivotal role in the ER-associated regulation of several proteins (28–31). Hence, to assess the functional consequence of OS9-NKCC2 interactions, we first assessed the effects of OS9 on total NKCC2 expression. Toward this, Myc-NKCC2 cDNA was transfected into OKP cells in the absence (empty vector) or presence of OS9-V5 in OKP cells. The expression of NKCC2 and OS9 was assessed by immunoblotting lysates from OKP cells with either anti-Myc or anti-V5 antibody. As shown in Fig. 4A, OS9 co-expression strikingly decreased the amount of immature and mature forms of NKCC2 (Fig. 4A, lower panel). Accordingly, the graph in Fig. 4A (lower panel), showing averaged results for eight independent experiments, demonstrates a significant decrease in total NKCC2 protein upon OS9 co-expression (–60%; $p < 0.0001$). Importantly, similar results were obtained when NKCC2 was co-transfected with untagged OS9 protein (–48%; $p < 0.001$). Moreover, it is worth noting that

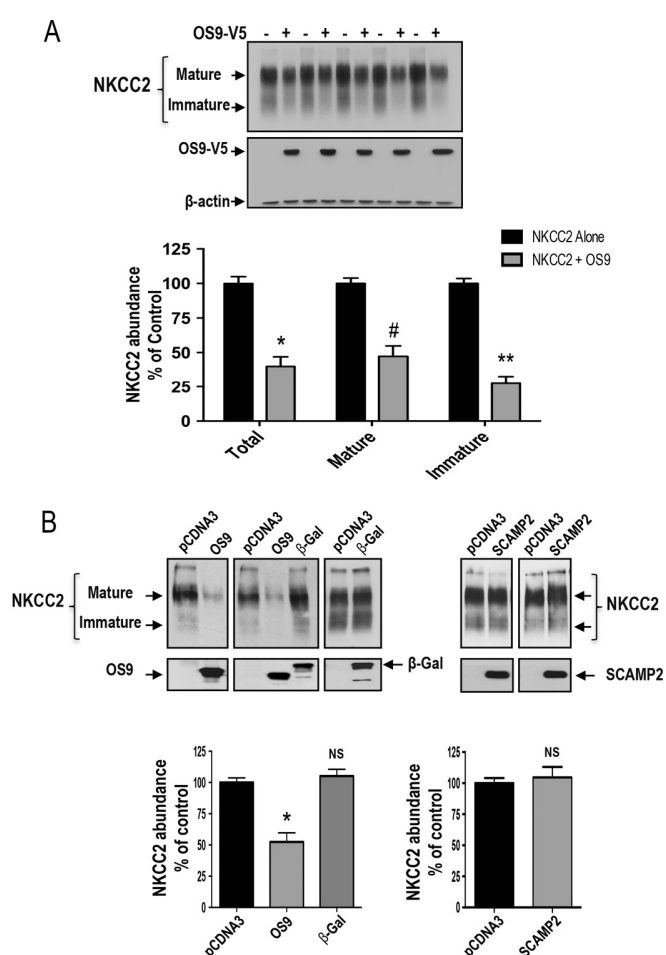


FIGURE 4. Regulation of steady-state protein level of NKCC2 by OS9. *A*, OS9 co-expression decreases the expression of NKCC2 proteins. Upper panel, representative immunoblotting analysis showing the effect of OS9 overexpression on NKCC2 protein abundance in OKP cells. Cells were transfected with Myc-NKCC2 alone or in the presence of OS9-V5. 48 h post-transfection, total cell lysates were subjected to immunoblotting analysis for Myc-NKCC2, OS9-V5, and actin. Actin was used as a loading control. Lower panel, quantitation of steady-state mature, immature, and total NKCC2 expression levels with or without OS9 co-expression. NKCC2 expression is given as the percentage of that observed in controls co-expressing empty vector ($n = 6$; mean \pm S.E.). Data are expressed as a percentage of control \pm S.E. *, $p < 0.0004$; #, $p < 0.0003$; **, $p < 0.0001$ versus control. *B*, the effect of OS9 on NKCC2 is specific. Upper panel, representative immunoblotting analysis showing the effect of OS9, β -galactosidase (β -gal), and SCAMP2 on NKCC2 protein abundance in OKP cells. Cells were co-transfected with Myc-NKCC2 and the empty vector (pCDNA3) or with OS9.1, β -galactosidase-V5 (β -gal), or SCAMP2-V5 cDNAs. Bottom, summary of results. NS, not significant versus NKCC2 alone; *, $p < 0.001$ versus NKCC2 alone. NKCC2 alone, $n = 8$; NKCC2 with OS9.1, $n = 8$; NKCC2 with β -gal, $n = 5$. In contrast to OS9, SCAMP2-V5 overexpression had no effect on NKCC2 protein abundance. OKP cells were co-transfected with Myc-NKCC2 (0.1 μ g/well) alone or in combination with SCAMP2-V5 (0.3 μ g/well). Bottom, summary of results. NS, not significant versus NKCC2 alone (NKCC2 alone, $n = 5$; NKCC2 with SCAMP2-V5, $n = 5$). Error bars, S.E.

co-transfecting β -galactosidase, a non-related protein, had no effect on the expression of NKCC2 (Fig. 4B), suggesting that the OS9-induced down-regulation of OS9 is not an artifact of protein overexpression. Additionally, it is also of great interest to note that, under identical conditions, the co-expression of SCAMP2, another NKCC2 binding partner (37), had no effect on total NKCC2 protein abundance (Fig. 4B), further corroborating our conclusion that the effect of OS9 on total NKCC2 protein abundance is specific.

OS9 Decreases NKCC2 Surface Expression and Function—To further elucidate the functional consequence of OS9-NKCC2 interactions, we checked the effect of OS9 on NKCC2 surface expression and activity. Toward that, we first performed cell surface biotinylation experiments. As expected, immunocytochemistry analysis showed that in the absence of OS9 transfection NKCC2 staining co-localized with biotinylated cell surface proteins, indicating appropriate trafficking of NKCC2 to the cell surface. Once again, in cells co-expressing both proteins, NKCC2 mostly disappeared from the cell membrane and clustered in an intracellular location, presumably the ER (Fig. 5A), suggesting that OS9 decreases the cell surface expression of the co-transporter. To study in a more quantitative fashion the effect of OS9 on NKCC2 surface expression, we opted for cell surface biotinylation assays. To this end, surface membrane proteins were biotinylated by reaction with sulfo-NHS-SS-biotin and isolated by precipitation with NeutrAvidin-bound agarose. Myc-NKCC2 protein was then identified by immunoblotting using anti-Myc antibody. We documented previously (25, 26, 36, 37) that only the complex glycosylated form of NKCC2 (160–170 kDa) is able to reach the cell membrane. Accordingly, only the fully glycosylated, mature form of NKCC2 was detected in biotinylated cell surface proteins. Most importantly, the decrease in total NKCC2 protein abundance in cells overexpressing OS9 was associated with a reduction (–55%; $p < 0.004$) in NKCC2 expression at the cell surface (Fig. 5B).

To elucidate the functional consequence of the observed reduction in the co-transporter cell surface level, we then checked the effect of OS9 co-expression on NKCC2 transport activity. As described previously (25, 26, 36, 37, 40), to assess Na-K-2Cl co-transporter activity, we took advantage of the fact that NH_4^+ can be carried by NKCC2 using its extracellular K^+ -binding site. OKP cells were exposed to NH_4^+ , and the rate of cell acidification following the initial cell alkalization was studied as an index of NH_4^+ transport into the cells. dpH_i/dt , which is fully due to NH_4^+ entry, was measured over the first 20 s of recordings as described earlier (25, 36). As can be seen in Fig. 5C, Na-K-2Cl co-transporter activity decreased upon OS9 co-expression (–66%; $p < 0.03$). Taken together, these results clearly indicate that OS9 co-expression decreases the transport activity of NKCC2 by decreasing the cell surface level of the co-transporter.

OS9 Promotes NKCC2 ERAD in a Proteasome-dependent Manner—Based upon the above findings, we hypothesized that OS9 co-expression results in ER retention and/or degradation of NKCC2, leading to a decrease in total and cell surface expression of the co-transporter. This mechanism involves, in most cases, activation of the proteasome proteolysis pathway and/or the lysosomal machinery (18, 19, 41–43). Accordingly, we anticipated that treatment with proteasome and lysosome inhibitors might provide important insights into the possible mechanisms of NKCC2 degradation upon OS9 co-expression.

To investigate the possible involvement of proteasomal and/or lysosomal degradation pathways in the effect of OS9-induced down-regulation of NKCC2, cells were treated overnight with 10 μM MG132 or 100 μM leupeptin, and their lysates were subjected to Western blotting analysis. In agreement with our previous report (25), exposure to MG132 significantly

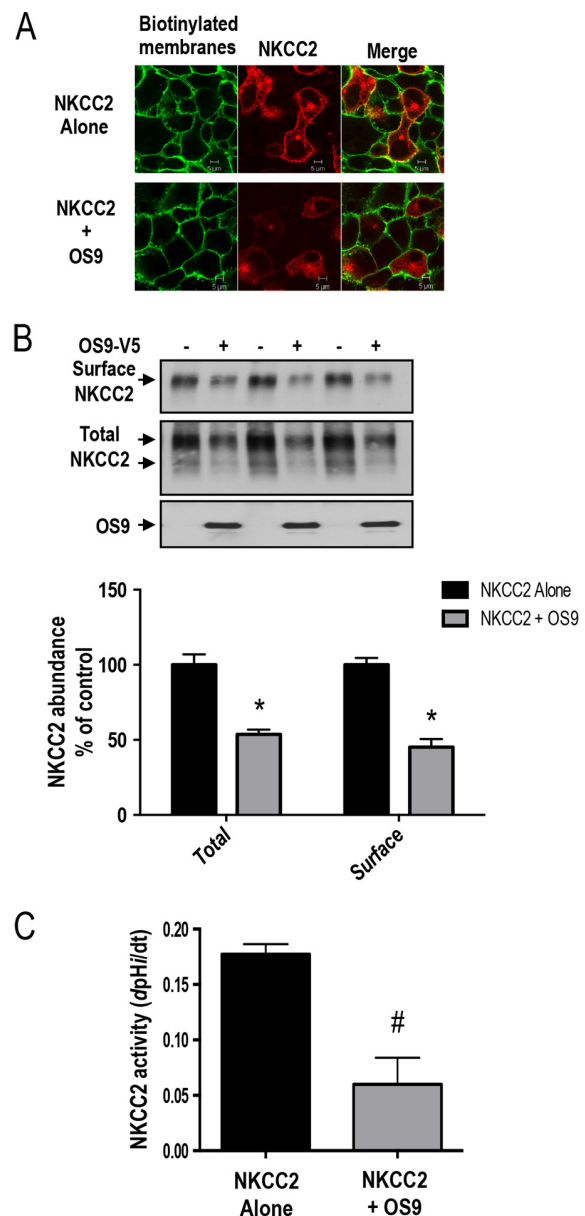


FIGURE 5. OS9 decreases NKCC2 cell surface expression and activity. *A*, effect of OS9 on subcellular distribution of NKCC2. OKP cells were transfected with Myc-NKCC2 (red) alone or with SCAMP2-V5. Membrane proteins of confluent cells were biotinylated at 4 °C with the biotinylation reagent sulfo-NHS-SS-biotin. Then the monolayers were fixed and stained for cell surface biotin (avidin-Cy2; green). The stained specimens were evaluated by confocal microscopy. Optical sections (xy) at the cell surface are depicted for the Texas Red channel (red), Cy2 channel (red), and a merged channel. *B*, total and surface NKCC2 proteins are down-regulated by OS9. OKP cells were co-transfected with Myc-NKCC2 (0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$) alone or in combination with OS9 (0.3 $\mu\text{g}/\text{well}$) as indicated. Biotinylated proteins were recovered from cell extracts by precipitation with NeutrAvidin-agarose. NKCC2 proteins on the cell surface were detected by immunoblotting with Myc antibody. An aliquot of the total cell extract from each sample was also run on a parallel SDS gel and Western blotted for total NKCC2 expression. *Bottom*, densitometric analysis of total and surface NKCC2 from cells expressing NKCC2 alone or with OS9. Data are expressed as a percentage of control. *, $p < 0.004$ versus NKCC2 alone ($n = 3$). *C*, measurement of Na-K-2Cl co-transport activity in OKP cells expressing NKCC2 alone or with OS9 proteins. Each bar represents the mean \pm S.E. rates of cell pH recovery (dpH_i/dt in pH units/min) from NH_4^+ -induced alkaline load of three independent experiments. #, $p < 0.03$ versus NKCC2 alone ($n = 3$). Error bars represent S.E.

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

increased the protein levels of the immature form of NKCC2 without an apparent increase in its mature form, an effect consistent with an ER-associated degradation (Fig. 6A). In support of this notion, OS9 was also up-regulated under these experimental conditions (Fig. 6A), which is in agreement with previous reports (44). Most importantly, when cells co-transfected with Myc-NKCC2 and OS9-V5 were treated with MG132, the OS9-dependent decrease of NKCC2 protein level was abrogated (Fig. 6A), suggesting that a proteasome-dependent mechanism underlies the degradation of NKCC2. In contrast to MG132, leupeptin was without action on the OS9-induced down-regulation of NKCC2 (Fig. 6A), indicating that the lysosome pathway is not involved in the action of OS9 on NKCC2 protein. Altogether, these results strongly suggest that OS9 decreases NKCC2 expression by promoting its ERAD in a proteasome-dependent manner.

To directly examine the effect of OS9 protein on the degradation and the maturation of NKCC2 protein, we traced the sorting delivery of newly synthesized proteins from the ER to Golgi compartments using pulse-chase analysis. In these experiments, cells transfected with Myc-tagged wild-type NKCC2 in the presence or absence of OS9 construct were labeled for 1 h with [³⁵S]methionine/cysteine and chased with unlabeled methionine and cysteine during different intervals between 1 and 4 h. At $t = 0$, similar quantities of newly synthesized NKCC2 proteins were present in controls and in cells that overexpressed OS9. During the chase period, the core glycosylated (immature) form of NKCC2 is progressively converted to a more slowly migrating band, representing the mature and functional form of the co-transporter (25, 26, 36, 37). As shown in Fig. 6B, in cells transfected with OS9, immature NKCC2 protein showed a faster rate of decay during the chase period. In kinetic analysis, the estimated half-life of the immature form of NKCC2 protein was decreased by ~55% upon OS9 co-expression. The decrease represents the conversion of the immature to the mature form as well as the degradation of the immature form of NKCC2 protein. Consequently, OS9 co-expression decreased the maturation efficiency of NKCC2 at different time points during the chase period. At $t = 4$ h, the effect of OS9 on NKCC2 maturation efficiency reached ~49% (Fig. 6B). To further corroborate these observations, we used the cycloheximide decay assay as a second approach to assess the stability and maturation of NKCC2. To this end, 12–14 h post-transfection, cycloheximide was added to block protein synthesis, and at various times after addition of cycloheximide, NKCC2 levels were monitored by immunoblotting. As illustrated in Fig. 6, OS9 overexpression decreased the half-life of immature NKCC2 protein by 61%, which is in agreement with the pulse-chase analysis described above. Moreover, the decrease in immature NKCC2 stability in cells overexpressing OS9 was associated with a decrease in the conversion of the protein from the immature to the mature form. OS9-induced decrease in the maturation efficiency of NKCC2 was accentuated during the chase period to reach ~45% at 4 h (Fig. 6C). Taken together, the results above indicate that OS9 targets the immature form of NKCC2 to the proteasome-dependent ER-associated degradation pathway.

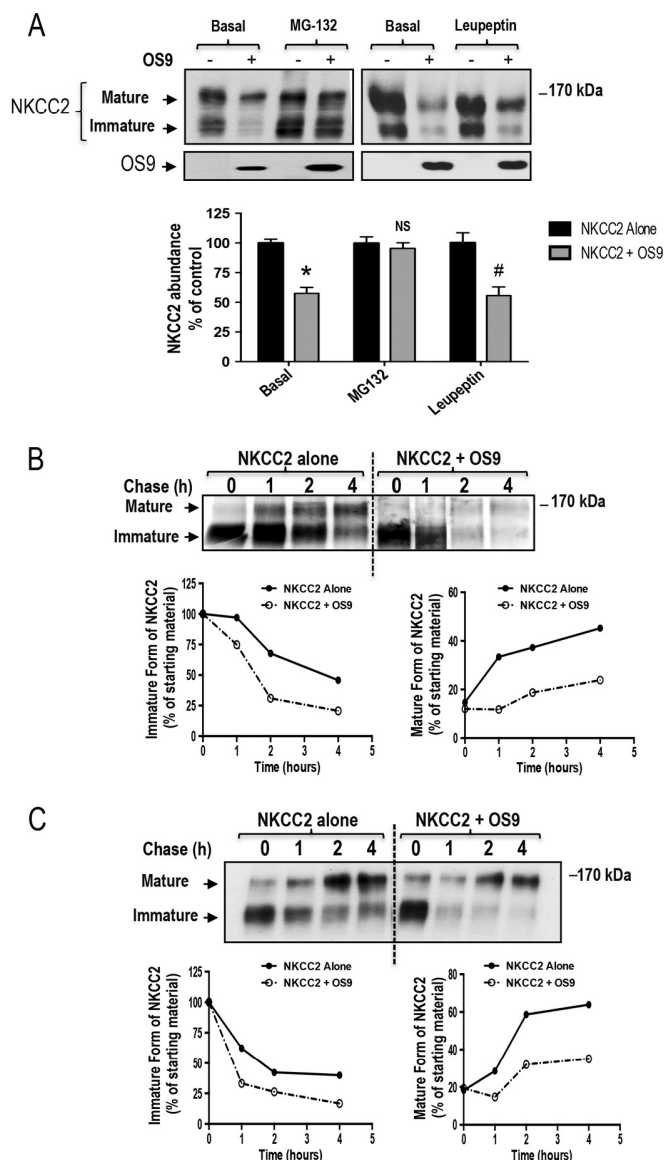


FIGURE 6. OS9 promotes NKCC2 degradation. A, OS9 decreases NKCC2 expression in a proteasome-dependent manner. OKP cells transiently transfected with Myc-NKCC2 alone or with OS9-V5 were treated with (+) or without (-) 10 μ M MG132 or 100 μ M leupeptin for 12–16 h prior to cell lysis. The cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Myc and anti-V5 antibodies. *Bottom*, densitometric analysis of NKCC2 bands from untreated (-) cells and cells treated (+) with MG132 or leupeptin. Data are expressed as percentage of control \pm S.E. *, $p < 0.0001$ versus control ($n = 8$); ^{NS}, not significant versus control ($n = 9$); #, $p < 0.02$ versus control ($n = 3$). B, pulse-chase experiments performed in OKP cells transfected with the indicated plasmids. Cells were labeled with [³⁵S]methionine/cysteine and harvested at the indicated chase times for Myc-NKCC2 immunoprecipitation. Signals were detected by autoradiography. *Lower left panel*, quantitative analysis of immature NKCC2. The density of the immature form of NKCC2 protein was normalized to the density at time 0 (100%). *Lower right panel*, quantitative analysis of NKCC2 maturation. In these experiments, we compared the amount of the newly synthesized NKCC2 (immature form at time 0) and the conversion to the complex glycosylated form of the co-transporter (mature form) during the chase period. C, cycloheximide-chase analysis of NKCC2 in the presence or absence of OS9-V5. 14–16 h post-transfection, OKP cells transiently expressing WT NKCC2 alone or in combination with OS9 were chased for the indicated times after addition of cycloheximide. Total cell lysates were separated by SDS-PAGE and probed by anti-Myc antibody. The density of the mature and immature forms of NKCC2 proteins was normalized to the density at time 0. Error bars represent S.E.

N-Glycosylation of NKCC2 Is Critical for the OS9-dependent ERAD Pathway—The processing of *N*-linked oligosaccharides plays an important role in the ERAD of glycoproteins. NKCC2 is *N*-glycosylated at two sites, Asn-442 and Asn-452, located in the long extracellular loop (2, 36). Consequently, we next examined the role of *N*-glycan in the OS9-mediated ERAD of NKCC2. To this end, we mutated the two predicted glycosylation sites, Asn-442 and Asn-452, to glutamine (Gln) and assessed the effect of these mutations on OS9-induced down-regulation of NKCC2. Hence, N442Q/N452Q proteins were expressed in OKP cells in the presence or absence of OS9 construct. As expected, elimination of both *N*-glycosylated sites (N442Q/N452Q) resulted in the complete loss of the upper band with a lower band around 120 kDa remaining (Fig. 7A). Nevertheless, as can be seen in Fig. 7A, OS9 was still able to bind to the non-glycosylated form of the NKCC2. However, OS9 association with non-glycosylated NKCC2 was unproductive because, in contrast to its effect on WT NKCC2, it did not affect the protein abundance of the co-transporter under these conditions (Fig. 7B). To corroborate this observation, we performed a pulse analysis assay. In contrast to WT NKCC2, OS9 did not affect the kinetics of disappearance of the non-glycosylated form of the co-transporter (Fig. 7C). In sum, these data demonstrate that mutations of NKCC2 *N*-glycosylation sites (N442Q and N452Q) abolish the OS9 effects, indicating that OS9-induced protein degradation of the co-transporter is *N*-glycan-dependent.

Mannose 6-Phosphate Receptor Homology (MRH) Domain of OS9 Is Dispensable for the Effect on NKCC2 Degradation—In yeast, it has been shown that the MRH domain of OS9 is required for its role in the ER quality control pathway (45). To examine the role of the lectin activity of the MRH domain in the OS9-induced down-regulation of NKCC2, we focused on five residues within this region (namely Tyr-120, Gln-130, Arg-188, Glu-212, and Tyr-212) that were found to be required for ERAD in yeast. The specific role of each of these amino acids was analyzed by site-directed mutagenesis converting each of them individually to alanine, glutamine, or asparagine (Fig. 8A). OKP cells were then transfected with NKCC2 singly or in combination with WT OS9 or mutated OS9 proteins. As can be seen in Fig. 8, inactivating the MRH domain of OS9 did not prevent the OS9-induced down-regulation of NKCC2 protein abundance. Indeed, similar to WT OS9, co-expression of mutated OS9 proteins decreased NKCC2 protein expression (Fig. 8, A and B), clearly indicating that the MRH domain of OS9 is dispensable for the ERAD of NKCC2.

The Impact of OS9 on NKCC2 Expression Is Independent of the Expression System—Because the ER quality control mechanism and the ERAD system may be cell-dependent, we sought to corroborate our findings by conducting the experiments in a second renal cell line, HEK cells. As illustrated in Fig. 9A, similar to OKP cells, immunoprecipitation of OS9 followed by immunoblotting for NKCC2 also revealed robust interaction of the two proteins. Importantly, as in OKP cells, NKCC2 interaction with NKCC2 in HEK cells involves mainly the immature form of the co-transporter. Accordingly, NKCC2 and OS9 were also co-localized to the ER in HEK cells as indicated by co-localization with the ER marker calnexin (Fig. 9B). Most impor-

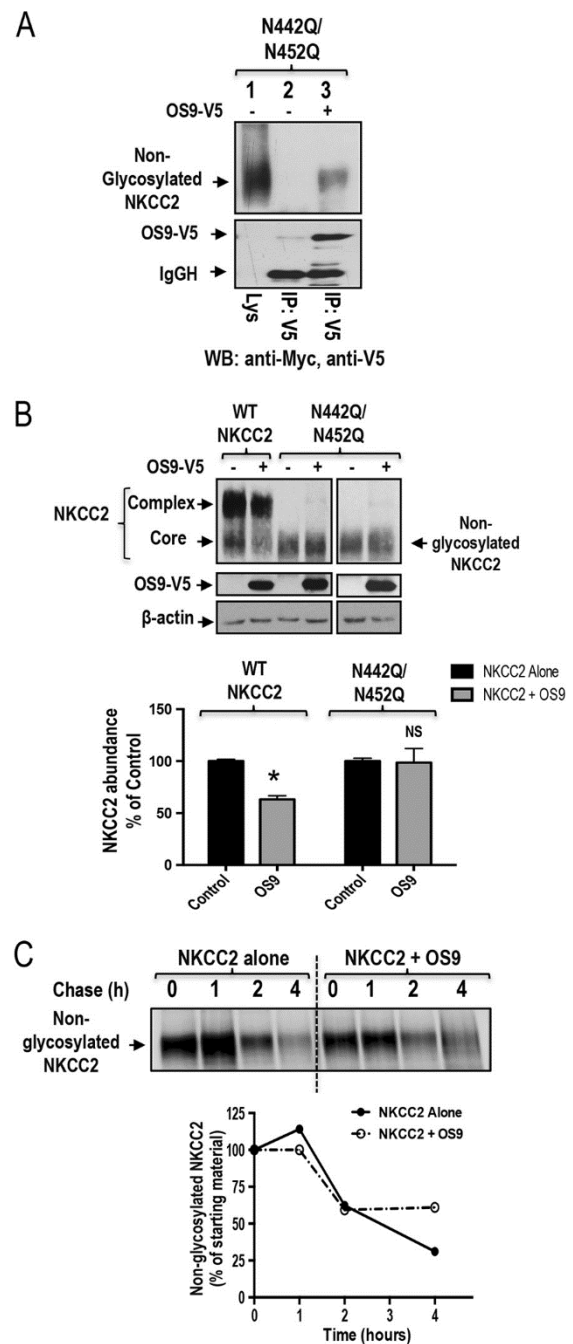


FIGURE 7. *N*-Glycosylation of NKCC2 is critical for the OS9-induced down-regulation of NKCC2. A, co-immunoprecipitation of OS9 with non-glycosylated NKCC2 (N442Q/N452Q). Cell lysates from cells transfected with N442Q/N452Q in the presence or absence of OS9-V5 were immunoprecipitated (IP) with anti-Myc or anti-V5 antibody. N442Q/N452Q co-immunoprecipitated with OS9 was detected by immunoblotting (WB) using anti-Myc (lane 3). B, OS9 association with non-glycosylated NKCC2 is unproductive. Cells were transfected with Myc-NKCC2 or N442Q/N452Q in the presence or absence of OS9-V5. 48 h post-transfection, total cell lysates were subjected to immunoblotting analysis for Myc-NKCC2, OS9-V5, and actin. Lower panel, quantitation of steady-state total NKCC2 expression levels with or without OS9 co-expression. *, $p < 0.001$ versus control ($n = 4$); NS, not significant versus control ($n = 4$). C, pulse-chase experiments performed in OKP cells transfected with non-glycosylated NKCC2 in the presence or absence of OS9 construct. Cells were labeled with [35 S]methionine/cysteine and harvested at the indicated chase times for Myc-NKCC2 immunoprecipitation. Signals were detected by autoradiography. Lower panel, quantitative analysis of non-glycosylated NKCC2. The density of NKCC2 proteins was normalized to the density at time 0 (100%). IgGH, the heavy chain of IgG. Error bars represent S.E.

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

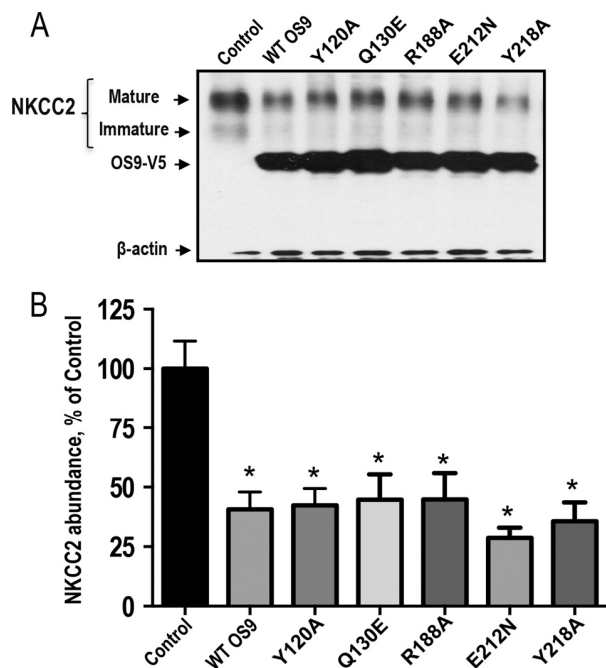


FIGURE 8. Effect of overexpression of OS9 with mutated MRH domain. *A*, representative immunoblotting analysis showing the effect of OS9 overexpression with mutated MRH domain on NKCC2 protein abundance. OKP cells were transfected with NKCC2 singly (*Control*) or in combination with WT OS9 or mutated OS9 proteins. 48 h later, total cell lysates were subjected to immunoblot analysis for Myc-NKCC2, OS9-V5, and actin. *B*, summary of results. *, $p < 0.005$ versus control ($n = 5$). Error bars represent S.E.

tantly, similar to OKP cells, OS9 co-expression in HEK cells decreased both immature and mature NKCC2 proteins (Fig. 9, *C* and *D*), clearly indicating that OS9 effects on the co-transporter expression are independent of the expression system.

Endogenous OS9 Interacts with Immature NKCC2 and Regulates the Expression of the Co-transporter—The potential significance of our findings is that the interaction of OS9 with NKCC2 in the ER could be very important for sorting determinants for the ER quality control of the co-transporter. To further corroborate these findings, we next examined the role of endogenous OS9 in NKCC2 degradation. To this end, we first checked the ability of NKCC2 to interact with endogenously expressed OS9 in HEK cells. To address this, we used a rabbit OS9 antibody raised against native OS9 protein. Importantly, Western blotting analysis following immunoprecipitation with anti-OS9 antibody detected a protein band around 100 kDa, corresponding to the expected size band of isoform 1 of OS9. More importantly, immunoprecipitation of endogenous OS9 protein brought only the immature form NKCC2, thus again demonstrating physical interaction between OS9 and the ER-resident form of the co-transporter (Fig. 10*A*, *lane 3*). Of note, Myc-NKCC2 protein was not detected in control experiments in which immunoprecipitations were carried out using mouse anti-V5 antibodies (Fig. 10*A*, *lane 2*). Taken in concert, these findings clearly indicate that, similar to exogenously expressed OS9, endogenous OS9 interacts *in vivo* with NKCC2, an interaction that involves principally the immature form of the co-transporter.

To examine the role of endogenous OS9 in the regulation of NKCC2, we first checked the effect of OS9 knockdown on

NKCC2 expression using siRNA. To this end, a sequential transfection in HEK cells was performed. Cells were first transfected with siRNAs for at least 24 h before transfection with Myc-NKCC2 plasmids for 48 h. As illustrated in Fig. 10*B*, relative to control, the endogenous expression of OS9 was reduced by 80% in cells transfected with OS9 specific siRNA (from Dharmacon). With this degree of OS9 knockdown, the steady-state level of NKCC2 was increased by 80% ($p < 0.004$). Importantly, this increase in total NKCC2 protein abundance was associated with an increase in the surface expression of the co-transporter protein (+76%; $p < 0.007$). To corroborate these findings, we also used a second set of OS9-specific siRNA (from Santa Cruz Biotechnology). As can be seen in Fig. 10*C*, using this second set of OS9 siRNA, OS9 knockdown again increased total and surface NKCC2 expression by 81 ($p < 0.03$) and 84% ($p < 0.0001$), respectively. Consequently, these data are fully in agreement with a role of endogenous OS9 in the ERAD of immature NKCC2 protein.

To further corroborate these observations, we used the cycloheximide decay assay to assess the effect of OS9 knockdown on the half-life of the immature form of NKCC2. To this end, a sequential transfection in HEK cells was performed as indicated above. However, in this series of experiments, 12–14 h after transfection of HEK cells with Myc-NKCC2 plasmids, cycloheximide was added to block protein synthesis, and at various times after addition of cycloheximide, NKCC2 levels were monitored by Western blotting. It is worth noting that at the start of the chase period ($t = 0$) total NKCC2 protein levels were comparable between the studied groups (Fig. 10*D*), indicating that a modification of protein synthesis is not responsible for the increase in total NKCC2 protein levels observed above (Fig. 10, *B* and *C*). Most importantly, in cells transfected with OS9 siRNA, immature NKCC2 protein had a slower rate of decay at different time points during the chase period (Fig. 10*D*). Indeed, in kinetic analysis, the estimated half-life of immature form of NKCC2 protein was increased by +79% ($p < 0.05$) upon OS9 knockdown. Moreover, this increase in the stability of the immature form of NKCC2 was associated with an increase in the conversion of the protein from the immature to the mature form of the co-transporter (Fig. 10*D*). Altogether, these data strongly hint at a role of endogenous OS9 in the ERAD of immature NKCC2 protein.

Discussion

This study was carried out to gain insight into the molecular mechanisms underlying the regulation of NKCC2 transit in the ER. By means of yeast two-hybrid analysis and co-immunoprecipitation assays, we identified OS9 as a *bona fide* NKCC2-interacting protein. The interaction involves mainly the immature form of the co-transporter, therefore taking place in the ER. We have found that OS9 co-expression decreases the stability of core glycosylated NKCC2 by increasing its degradation by the proteasome pathway. Accordingly, OS9 depletion increases the stability and maturation of the co-transporter protein, indicating therefore that OS9 targets NKCC2 for the ERAD pathway.

OS9 was originally identified as a gene of unknown function amplified in osteosarcoma (27). OS9 is expressed ubiquitously

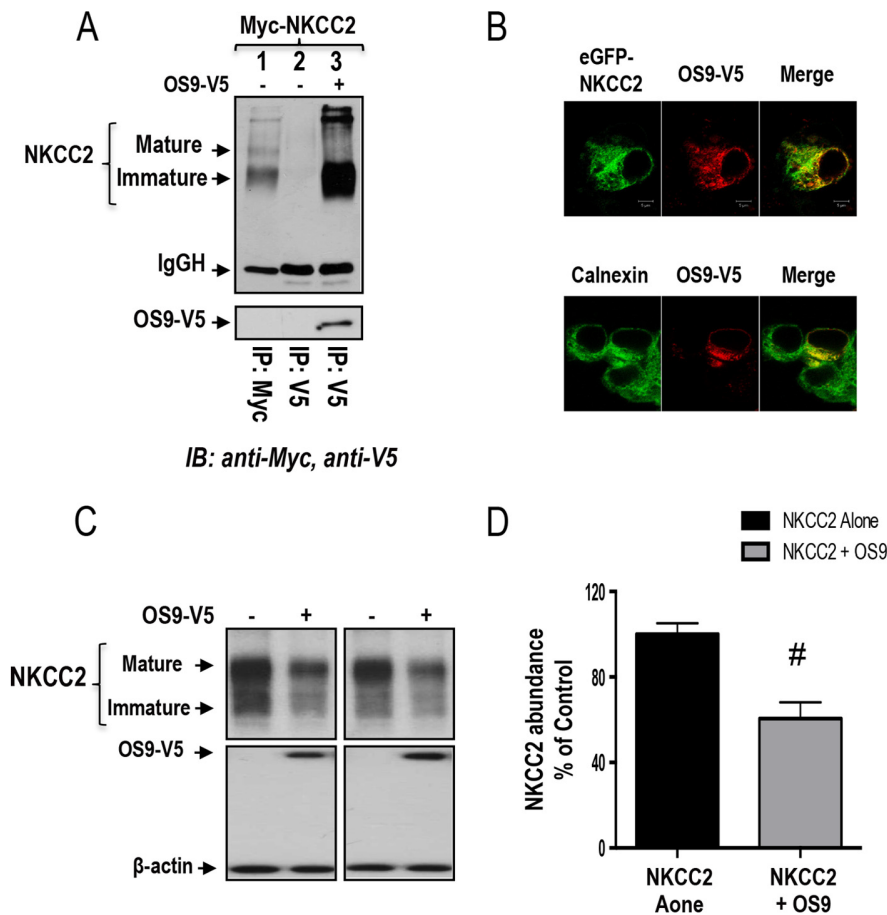


FIGURE 9. The effect of OS9 on NKCC2 ERAD is independent of the expression system. *A*, OS9 interacts with immature NKCC2 in HEK cells. Cell lysates from HEK cells transiently transfected with Myc-NKCC2 singly or in combination with OS9-V5 were immunoprecipitated (IP) with anti-Myc or anti-V5 antibody. NKCC2 protein was recovered from OS9 immunoprecipitates mainly in its immature form (lane 3). *B*, OS9 and NKCC2 co-localizes in the ER. *Upper panel*, immunofluorescence confocal microscopy showing the distribution of NKCC2 and OS9 in HEK cells. HEK cells were transfected with NKCC2 N-terminally tagged with EGFP (green) and OS9-V5. Fixed and permeabilized cells were stained with mouse anti-V5 for OS9 (Texas Red). The yellow color (merged image) indicates co-localization of the proteins. *Lower panel*, HEK cells transfected with NKCC2 and OS9-V5 were stained with mouse anti-V5 (Texas Red; red) and rabbit anti-calnexin (FITC; green). Yellow indicates overlap between the V5 tag of OS9 (red) and the ER marker (green), representing co-localization of the proteins. *C*, OS9 decreases the steady-state protein level of NKCC2. Cells were transfected with Myc-NKCC2 alone or in the presence of OS9-V5. 48 h post-transfection, total cell lysates were subjected to immunoblotting analysis for Myc-NKCC2, OS9-V5, and actin. *D*, summary of results. Data are expressed as a percentage of control \pm S.E. *, $p < 0.02$ versus control ($n = 3$). Error bars represent S.E.

and has alternatively splice versions (39). The function of OS9 remained mysterious until human OS9 and its yeast homolog Yos9p were implicated in ER-to-Golgi transport (35). Likewise, mammalian OS9 interacts with the C-terminal tails of meprin β (32) and DC-STAMP (33) to facilitate their transport from the ER. Besides its role in ER-to-Golgi transport, OS9 has been reported to interact with hypoxia-inducible factor 1- α in the cytosol to regulate its proteasome-mediated degradation in an O₂-dependent manner (46). Moreover, more recent reports have also implicated OS9 in the ERAD of misfolded glycoproteins (28–31). It was first reported that removal of Yos9p from the yeast ER selectively inhibits degradation of glycosylated ERAD substrates (47). Subsequent studies in mammalian cells indicated that the degradation of misfolded glycoproteins is partially inhibited by OS9 knockdown, but this effect seems to depend on the ERAD substrates (45). In this regard, it is worth mentioning that it was initially thought that OS9 is required for disposal of substrates with luminal folding defects, whereas it is dispensable for disposal of proteins with defects in the transmembrane and cytosolic domains (28, 29, 48–51). However, a

recent report showed evidence that the *Arabidopsis* homolog of the mammalian OS9 protein plays a key role in the ERAD of the receptor-like kinases, which are transmembrane proteins (52). Moreover, although Jansen *et al.* (33) have not explored in detail the role of OS9 in the degradation of DC-STAMP, they reported that preliminary biochemical data suggest that OS9 may also be involved in the ERAD of DC-STAMP (33). In the present study, we showed evidence for a specific interaction of mammalian OS9 with NKCC2 and NCC, two renal transmembrane proteins. Importantly, we demonstrated that OS9 binding *in vivo* involves mainly the immature form of NKCC2. Most importantly, we provided evidence that OS9 binding is involved in the regulation of NKCC2 ERAD.

In support of ERAD as a major regulator of NKCC2 trafficking and function, we previously demonstrated that the majority of newly synthesized NKCC2 proteins are targeted to proteasome degradation before export to the Golgi (26). In the present work, the function of OS9 in the ERAD of NKCC2 was first suggested by co-immunoprecipitation studies that demonstrated that the interaction *in vivo* involves mainly the imma-

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

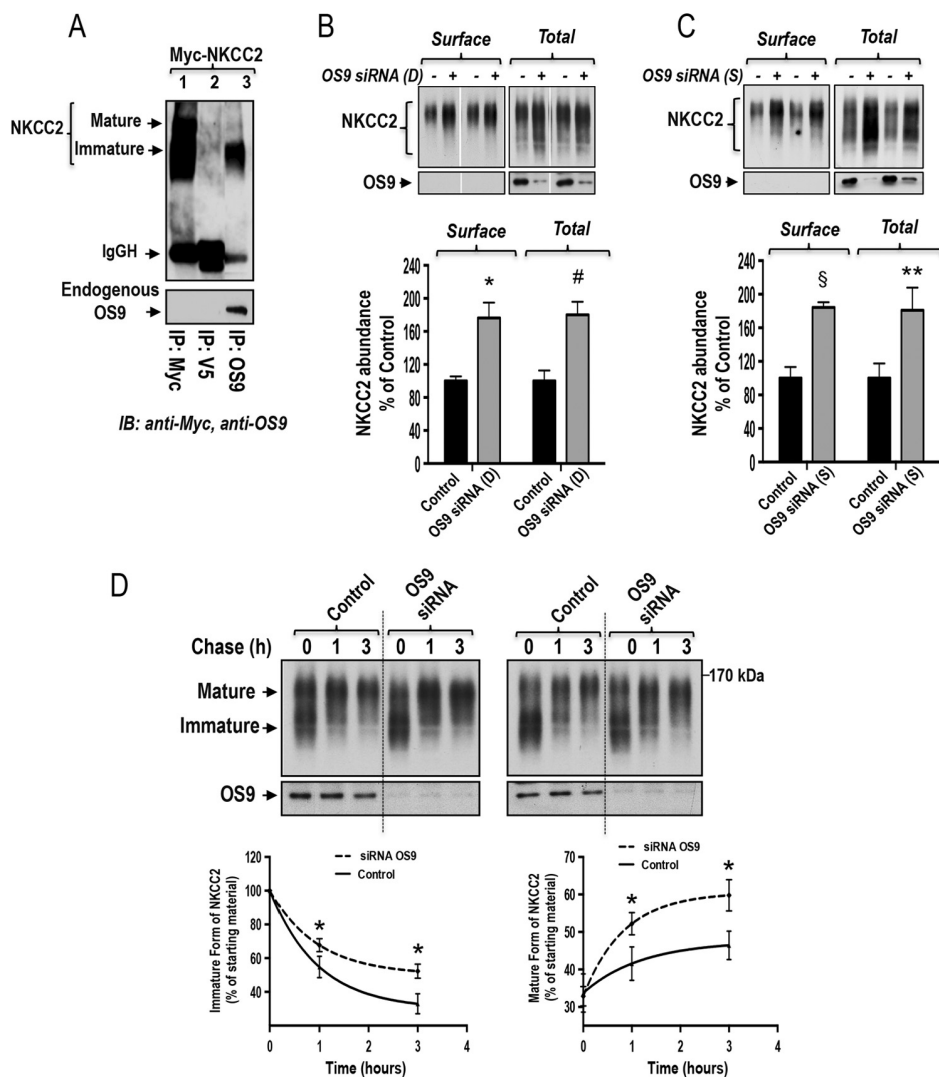


FIGURE 10. Knockdown of endogenous OS9 increases NKCC2 biogenesis. *A*, endogenous OS9 interacts with immature NKCC2. HEK cells overexpressing Myc-NKCC2 were immunoprecipitated (IP) with anti-Myc (positive control; lane 1), anti-V5 (negative control; lane 2), or anti-OS9 antibody (lane 3). Co-immunoprecipitated NKCC2 (mainly the immature form) was detected by immunoblotting (IB) using anti-Myc antibody (lane 3). IgGH, the heavy chain of IgG. *B* and *C*, knockdown of endogenous OS9 increases total and cell surface expression of NKCC2. *Upper panels*, representative immunoblotting analysis illustrating the effect of OS9 knockdown on total and surface NKCC2. HEK cells were transfected with NKCC2 in the absence (Control) or presence of specific OS9 siRNAs from Dharmacon (*D*) or Santa Cruz Biotechnology (*S*). 48 h post-transfection, biotinylated proteins were recovered from cell extracts by precipitation with NeutrAvidin-agarose. An aliquot of the total cell extract from each sample was also run on a parallel SDS gel and Western blotted for total NKCC2 expression. NKCC2 proteins were detected by immunoblotting with Myc antibody. *Lower panels*, summary of results. Data are expressed as a percentage of control. *, $p < 0.004$ versus control ($n = 4$); #, $p < 0.007$ versus control ($n = 4$); §, $p < 0.0001$ versus control ($n = 5$); **, $p < 0.03$ versus control ($n = 5$). *D*, knockdown of endogenous OS9 increases NKCC2 stability and maturation. HEK cells were first transfected in the absence (Control) or presence of OS9 siRNA followed by transfection with NKCC2 plasmids 24 h later. 12–14 h post-transfection of NKCC2, cells were chased for the indicated times after addition of cycloheximide. Total cell lysates were subjected to immunoblot analysis for NKCC2 and OS9. *Lower left panel*, quantitative analysis of immature NKCC2. The density of the immature form of NKCC2 proteins was normalized to the density at time 0 (100%). *Lower right panel*, quantitative analysis of NKCC2 maturation. The results are presented as relative intensity. Each point represents the mean \pm S.E. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ versus controls ($n = 4$). Error bars represent S.E.

ture, ER-resident form of NKCC2. Accordingly, the localization studies showed that OS9 co-localizes with NKCC2 at the endoplasmic reticulum. In contrast, OS9 did not co-immunoprecipitate with the ETB receptor, suggesting that OS9 is not simply interacting with all membrane proteins. In support of this notion, Wang *et al.* (34) demonstrated that OS9 specifically interacts with the TRP channels of the vanilloid group but not with other tested TRP channels or α NaC (34). Furthermore, we have shown that elevated OS9 levels, through the expression of exogenous OS9, prevent the cell surface localization of NKCC2 and cause the co-transporter to accumulate in a perinuclear

location. The OS9-induced down-regulation of NKCC2 surface expression was associated with an increase in co-transporter degradation. Moreover, OS9 effects on the ER-resident form of NKCC2 were prevented in the presence of the proteasome inhibitor MG132 but not with leupeptin, an inhibitor of lysosomal function, indicating that OS9 targets the immature form of the co-transporter to the proteasome-dependent ERAD pathway. It is of interest to note that, under similar experimental conditions, Wang *et al.* (34) reported that OS9 overexpression appears to protect TRPV4 from the ER-associated degradation, indicating that the effect of OS9 is substrate-dependent

(34). It is well documented that a single chaperone might be involved in either folding or degrading a given substrate that transits through the ER (53). OS9 is no exception, and therefore its actions also depend on the ERAD substrates (34). Consequently, it is conceivable that OS9 might play a protective role for TRPV4 but a destructive one for NKCC2 during ERAD. To further support the role of OS9 in the ERAD of NKCC2, we used the siRNA approach and demonstrated that OS9 knock-down delayed the degradation of the immature form of the co-transporter. Moreover, we showed that mutations of NKCC2 *N*-glycosylation sites also abolished OS9 effects, indicating that OS9-induced protein degradation is *N*-glycan-dependent. In contrast, the MRH domain of OS9 appears to be dispensable for the effect on NKCC2 degradation. In this regard, it is worth mentioning that the role of the MRH domain of OS9 remains unclear. Indeed, the significance of the lectin activity of the MRH domain of OS9 *in vivo* remains controversial and likely depends on the levels of overexpressed OS9, its sugar binding-defective mutants, and/or the yeast or mammalian expression system used (45, 54). In agreement with our findings, Bernasconi *et al.* (30) also demonstrated that the activity of OS9, in a mammalian cell background, does not require a functional MRH domain. In sum, our results demonstrate the presence of an OS9-mediated ERAD pathway in renal cells that degrades immature NKCC2 proteins.

ERAD starts with the recognition of a misfolded protein by molecular chaperones (19, 55). ERAD substrates can present a misfolded lesion either in the ER lumen, ER membrane, or cytoplasm, which will dictate the types of chaperones with which they interact (19, 55). Consequently, three different ERAD pathways have been proposed as ERAD-L, ERAD-M, and ERAD-C (19, 55). Soluble or membrane-bound proteins with a misfolded luminal domain are degraded via the ERAD-L (19, 55). Transmembrane substrates containing misfolded portions in the cytoplasmic and membrane domains are degraded via the ERAD-C and ERAD-M pathways, respectively (19, 55). For instance, to aid in folding and to select misfolded species for ERAD, nascent CFTR engages both cytoplasmic and ER luminal chaperones of CFTR (24). Likewise, NCC, another transmembrane protein, involves several cytoplasmic chaperones for its ERAD (56, 57). Similar to NCC, NKCC2 contains 12 transmembrane segments, two large cytoplasmic domains, and a large ER-exposed exofacial loop. Given the fact that the co-transporter contains domains in the ER and cytoplasm, NKCC2 could potentially interact with OS9 and/or other ER molecular chaperones on either side or on both sides of the ER membrane. In this regard, a remarkable difference between Yos9p, which is expressed only in the lumen of the ER, and its mammalian counterparts is the absence of a KDEL or other potential ER retention sequence from the mammalian proteins. However, mammalian OS9 contains a stretch of hydrophobic residues at the N terminus, suggesting at least transient localization in the ER (27). Accordingly, localization studies of OS9 in mammalian cells indicated that the protein might reside at both luminal and cytoplasmic surfaces of the ER (30, 32, 33). Hence, an interaction between OS9 and the C-terminal domain of NKCC2 at the cytoplasmic side of the ER is conceivable. However, one cannot exclude the possibility that OS9 may also interact with other

domains of NKCC2 protein. In this respect, to further define the parts in the cytoplasmic tail of NKCC2 that are responsible for the interaction with OS9, we created a series of deletion mutants in the C-terminal tail of NKCC2. Subsequent co-immunoprecipitation experiments revealed that, even in the absence of the distal part of the NKCC2 C terminus, the co-transporter is still able to interact with OS9 (data not shown), opening the possibility for an interaction of OS9 with other parts of NKCC2 protein. Consequently, an involvement of OS9 in the ERAD-L, ERAD-M, and/or ERAD-C of NKCC2 remains possible. Undeniably, OS9 cannot work in isolation to mediate the ERAD of the co-transporter. Appropriately, one may reasonably postulate that OS9 works in concert, sequentially or simultaneously, with other NKCC2-binding proteins and ERAD components such as CHIP and the Hsp70/Hsp90 organizer protein that are involved in structurally related renal NCC ERAD (56, 57) to mediate the ER quality control and its associated protein degradation of the co-transporter. Obviously, further experiments are needed to uncover the precise mechanism behind this process.

Identification of proteins that interact specifically with the immature forms of NKCC2 is important to decipher the molecular mechanisms underlying the regulation of the ER-to-Golgi transport of the co-transporter. Although our study was conducted in renal cultured cells, it is likely that NKCC2 interaction with OS9 also takes place in native TAL cells to play a crucial role in the chronic adaptations of the co-transporter. Indeed, given that variation in the activities of Na-Cl co-transporters or their regulators alters blood pressure in humans (2, 9), it is conceivable that physiological or pathological changes in the expression level of their binding partners may affect their activities, therefore altering the sodium balance and blood pressure. In support of this notion, a recent report showed evidence that *in vivo* loss of Nedd4-2, a binding partner of NCC, leads to increased NCC abundance and function (58). Most importantly, renal tubular Nedd4-2 deficiency causes NCC-mediated salt-dependent hypertension (58). Similarly, it is reasonable to postulate that physiological or pathological changes in OS9 expression levels may also affect NKCC2 function. In support of this hypothesis, a previous report showed evidence that OS9 is up-regulated in response to ER stress and facilitates the ERAD of several glycosylated proteins under these conditions (44). The OS9 overexpression approach used in the present study may therefore actually mimic OS9 up-regulation under agents or conditions causing ER stress in TAL cells such as salt loading and aging (59, 60). This is of particular interest because NKCC2 protein expression is down-regulated by high salt intake (4) and in the aged kidney (7). Consequently, an increase in OS9 expression in response to ER stress could contribute to the down-regulation of NKCC2 expression via the ubiquitin-proteasome pathway under these conditions (4, 7).

Intensive research on the mechanisms underlying the ERAD machinery has provided new insights into how ERAD contributes to human health during both normal and disease states (19, 60). The importance of ER quality control in general and the ERAD process in particular has been indicated in a large number of human pathologies called conformational diseases (19, 61, 62). One example is CFTR, the protein in which muta-

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

tions give rise to cystic fibrosis (63). One emerging and promising strategy for the possible treatment of ERAD diseases is to overcome ER retention (61, 62, 64) because some mutant proteins such as the cystic fibrosis $\Delta F508$ -CFTR mutant are actually functional if they exit the ER and reach their normal cellular location (63, 65). In regard to NKCC2, previous reports demonstrated that, when expressed in a mammalian cell background, several NKCC2 mutants are retained in the ER (10, 25, 66). Moreover, although distinct cellular mechanisms may account for NKCC2 loss of function in BS1 disease, our preliminary data in the laboratory revealed that ER-associated protein degradation is the most common mechanism underpinning BS1.⁴ Consequently, understanding the involvement of this process in BS1 is essential to provide novel therapeutic strategies for the treatment of BS1. Indeed, the identification and selective modulation of ERAD components specific to NKCC2 and its disease causing mutants might help to define a strategy to release fractions of misfolded mutant proteins from the ER by preventing their interactions with the quality control components to rescue their surface expression and restore their functional activity. Hence, it will be of interest to determine whether alterations in NKCC2 protein levels in NKCC2-related diseases are also mediated by OS9.

In summary, we found that NKCC2 interacts specifically with OS9, a protein known to be involved in the regulation of the transit in the ER. OS9 interacts mainly with the ER-resident form of NKCC2 to accelerate its degradation by the ERAD pathway. To the best of our knowledge, this is the first study identifying a protein partner of NKCC2 that plays a role in proteasome-dependent ERAD of the co-transporter. Besides, this is also the first report providing evidence that mammalian OS9 can be also involved in the ERAD of transmembrane proteins. Moreover, OS9 also binds to the structurally related co-transporter NCC, suggesting that the interaction with OS9 is a common feature of members of the SLC12A family, a group of cation-chloride co-transporters that are targets of therapeutic drugs and mutated in several human diseases such as Bartter, Gitelman, and Andermann syndromes (2, 67, 68). Consequently, further studies of OS9-mediated NKCC2 degradation should be useful in defining the recognition principles associated with the disposition of NKCC2 and perhaps other members of the cation-coupled chloride co-transporter family, in particular NCC. The thorough characterization and identification of the molecular mechanisms underlying the ER quality control of the cation-chloride co-transporters may provide a foundation for the development of therapeutic strategies targeting co-transporter transport from the ER to the cell surface.

Author Contributions—E. S., N. D., S. D., and N. Z. performed the experiments and analyzed the data. K. L. designed the study, supervised the experiments, and wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgment—We thank Dr. Aurélie Edwards for helpful discussions and careful reading of the manuscript.

⁴ E. Seayfan, N. Defontaine, S. Demaretz, N. Zaarour, and K. Laghmani, unpublished data.

References

1. Greger, R., and Velázquez, H. (1987) The cortical thick ascending limb and early distal convoluted tubule in the urinary concentrating mechanism. *Kidney Int.* **31**, 590–596
2. Gamba, G. (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electro-neutral cation-chloride cotransporters. *Physiol. Rev.* **85**, 423–493
3. Gamba, G. (1999) Molecular biology of distal nephron sodium transport mechanisms. *Kidney Int.* **56**, 1606–1622
4. Wu, J., Liu, X., Lai, G., Yang, X., Wang, L., and Zhao, Y. (2013) Synergistic effect of 20-HETE and high salt on NKCC2 protein and blood pressure via ubiquitin-proteasome pathway. *Hum. Genet.* **132**, 179–187
5. Kim, D., Sands, J. M., and Klein, J. D. (2004) Role of vasopressin in diabetes mellitus-induced changes in medullary transport proteins involved in urine concentration in Brattleboro rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F760–F766
6. Riaz, S., Khan, O., Tiwari, S., Hu, X., and Ecelbarger, C. A. (2006) Rosiglitazone regulates ENaC and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) abundance in the obese Zucker rat. *Am. J. Nephrol.* **26**, 245–257
7. Tian, Y., Riaz, S., Khan, O., Klein, J. D., Sugimura, Y., Verbalis, J. G., and Ecelbarger, C. A. (2006) Renal ENaC subunit, Na-K-2Cl and Na-Cl cotransporter abundances in aged, water-restricted F344 × Brown Norway rats. *Kidney Int.* **69**, 304–312
8. Lifton, R. P., Gharavi, A. G., and Geller, D. S. (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104**, 545–556
9. Ares, G. R., Caceres, P. S., and Ortiz, P. A. (2011) Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**, F1143–F1159
10. Monette, M. Y., Rinehart, J., Lifton, R. P., and Forbush, B. (2011) Rare mutations in the human Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) associated with lower blood pressure exhibit impaired processing and transport function. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **300**, F840–F847
11. Ji, W., Foo, J. N., O’Roak, B. J., Zhao, H., Larson, M. G., Simon, D. B., Newton-Cheh, C., State, M. W., Levy, D., and Lifton, R. P. (2008) Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat. Genet.* **40**, 592–599
12. Acuña, R., Martínez-de-la-Maza, L., Ponce-Coria, J., Vázquez, N., Ortal-Vite, P., Pacheco-Alvarez, D., Bobadilla, N. A., and Gamba, G. (2011) Rare mutations in SLC12A1 and SLC12A3 protect against hypertension by reducing the activity of renal salt cotransporters. *J. Hypertens.* **29**, 475–483
13. Russell, J. (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol. Rev.* **80**, 211–276
14. Vitale, A., and Denecke, J. (1999) The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**, 615–628
15. Yeaman, C., Grindstaff, K. K., and Nelson, W. J. (1999) New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol. Rev.* **79**, 73–98
16. Caplan, M. J. (1997) Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **272**, F425–F429
17. Hebert, D. N., and Molinari, M. (2007) In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol. Rev.* **87**, 1377–1408
18. Stolz, A., and Wolf, D. H. (2010) Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 694–705
19. Guerriero, C. J., and Brodsky, J. L. (2012) The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol. Rev.* **92**, 537–576
20. Jensen, T. J., Loo, M. A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L., and Riordan, J. R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**, 129–135
21. Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121–127
22. Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., and Rotin, D. (1997) Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J.* **16**, 6325–6336

23. Valentijn, J. A., Fyfe, G. K., and Canessa, C. M. (1998) Biosynthesis and processing of epithelial sodium channels in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 30344–30351
24. Ahner, A., Gong, X., and Frizzell, R. A. (2013) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation: cross-talk between the ubiquitylation and SUMOylation pathways. *FEBS J.* **280**, 4430–4438
25. Zaarour, N., Demaretz, S., Defontaine, N., Mordasini, D., and Laghmani, K. (2009) A highly conserved motif at the COOH terminus dictates endoplasmic reticulum exit and cell surface expression of NKCC2. *J. Biol. Chem.* **284**, 21752–21764
26. Zaarour, N., Demaretz, S., Defontaine, N., Zhu, Y., and Laghmani, K. (2012) Multiple evolutionarily conserved di-leucine like motifs in the carboxyl terminus control the anterograde trafficking of NKCC2. *J. Biol. Chem.* **287**, 42642–42653
27. Su, Y. A., Hutter, C. M., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1996) Complete sequence analysis of a gene (OS-9) ubiquitously expressed in human tissues and amplified in sarcomas. *Mol. Carcinog.* **15**, 270–275
28. Bhamidipati, A., Denic, V., Quan, E. M., and Weissman, J. S. (2005) Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol. Cell* **19**, 741–751
29. Szathmary, R., Biemann, R., Nita-Lazar, M., Burda, P., and Jakob, C. A. (2005) Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol. Cell* **19**, 765–775
30. Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J., and Molinari, M. (2008) A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal. *J. Biol. Chem.* **283**, 16446–16454
31. Hüttner, S., Veit, C., Schoberer, J., Grass, J., and Strasser, R. (2012) Unraveling the function of *Arabidopsis thaliana* OS9 in the endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *Plant Mol. Biol.* **79**, 21–33
32. Litovchick, L., Friedmann, E., and Shaltiel, S. (2002) A selective interaction between OS-9 and the carboxyl-terminal tail of meprin β . *J. Biol. Chem.* **277**, 34413–34423
33. Jansen, B. J., Eleveld-Trancikova, D., Sanecka, A., van Hout-Kuijer, M., Hendriks, I. A., Looman, M. G., Leusen, J. H., and Adema, G. J. (2009) OS9 interacts with DC-STAMP and modulates its intracellular localization in response to TLR ligation. *Mol. Immunol.* **46**, 505–515
34. Wang, Y., Fu, X., Gaiser, S., Kötgen, M., Kramer-Zucker, A., Walz, G., and Wegierski, T. (2007) OS-9 regulates the transit and polyubiquitination of TRPV4 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **282**, 36561–36570
35. Friedmann, E., Salzberg, Y., Weinberger, A., Shaltiel, S., and Gerst, J. E. (2002) YOS9, the putative yeast homolog of a gene amplified in osteosarcomas, is involved in the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi transport of GPI-anchored proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 35274–35281
36. Benziane, B., Demaretz, S., Defontaine, N., Zaarour, N., Cheval, L., Bourgeois, S., Klein, C., Froissart, M., Blanchard, A., Paillard, M., Gamba, G., Houillier, P., and Laghmani, K. (2007) NKCC2 surface expression in mammalian cells: down-regulation by novel interaction with aldolase B. *J. Biol. Chem.* **282**, 33817–33830
37. Zaarour, N., Defontaine, N., Demaretz, S., Azroyan, A., Cheval, L., and Laghmani, K. (2011) Secretory carrier membrane protein 2 regulates exocytic insertion of NKCC2 into the cell membrane. *J. Biol. Chem.* **286**, 9489–9502
38. Amlal, H., Paillard, M., and Bichara, M. (1994) NH_4^+ transport pathways in cells of medullary thick ascending limb of rat kidney. NH_4^+ conductance and K^+/NH_4^+ (H^+) antiport. *J. Biol. Chem.* **269**, 21962–21971
39. Kimura, Y., Nakazawa, M., and Yamada, M. (1998) Cloning and characterization of three isoforms of OS-9 cDNA and expression of the OS-9 gene in various human tumor cell lines. *J. Biochem.* **123**, 876–882
40. Amlal, H., Legoff, C., Vernimmen, C., Paillard, M., and Bichara, M. (1996) $\text{Na}^+ - \text{K}^+ (\text{NH}_4^+) - 2\text{Cl}^-$ cotransport in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **271**, C455–C463
41. Fujita, E., Kourouko, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y. K., and Momoi, T. (2007) Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum. Mol. Genet.* **16**, 618–629
42. Bernasconi, R., and Molinari, M. (2011) ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 176–183
43. Arvan, P., Zhao, X., Ramos-Castaneda, J., and Chang, A. (2002) Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic* **3**, 771–780
44. Alcock, F., and Swanton, E. (2009) Mammalian OS-9 is upregulated in response to endoplasmic reticulum stress and facilitates ubiquitination of misfolded glycoproteins. *J. Mol. Biol.* **385**, 1032–1042
45. Hosokawa, N., Kamiya, Y., and Kato, K. (2010) The role of MRH domain-containing lectins in ERAD. *Glycobiology* **20**, 651–660
46. Baek, J. H., Mahon, P. C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., and Semenza, G. L. (2005) OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF- 1α . *Mol. Cell* **17**, 503–512
47. Buschhorn, B. A., Kostova, Z., Medicherla, B., and Wolf, D. H. (2004) A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett.* **577**, 422–426
48. Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T. A. (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**, 361–373
49. Denic, V., Quan, E. M., and Weissman, J. S. (2006) A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* **126**, 349–359
50. Cormier, J. H., Pearse, B. R., and Hebert, D. N. (2005) Yos9p: a sweet-toothed bouncer of the secretory pathway. *Mol. Cell* **19**, 717–719
51. Kim, W., Spear, E. D., and Ng, D. T. (2005) Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol. Cell* **19**, 753–764
52. Su, W., Liu, Y., Xia, Y., Hong, Z., and Li, J. (2012) The *Arabidopsis* homolog of the mammalian OS-9 protein plays a key role in the endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded receptor-like kinases. *Mol. Plant* **5**, 929–940
53. Brodsky, J. L. (2007) The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem. J.* **404**, 353–363
54. Hosokawa, N., Kato, K., and Kamiya, Y. (2010) Mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins in mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation. *Methods Enzymol.* **480**, 181–197
55. Ruggiano, A., Foresti, O., and Carvalho, P. (2014) Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J. Cell Biol.* **204**, 869–879
56. Needham, P. G., Mikoluk, K., Dhakarwal, P., Khadem, S., Snyder, A. C., Subramanya, A. R., and Brodsky, J. L. (2011) The thiazide-sensitive NaCl cotransporter is targeted for chaperone-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Biol. Chem.* **286**, 43611–43621
57. Donnelly, B. F., Needham, P. G., Snyder, A. C., Roy, A., Khadem, S., Brodsky, J. L., and Subramanya, A. R. (2013) Hsp70 and Hsp90 multichaperone complexes sequentially regulate thiazide-sensitive cotransporter endoplasmic reticulum-associated degradation and biogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 13124–13135
58. Rizzo, F., and Staub, O. (2015) NEDD4–2 and salt-sensitive hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **24**, 111–116
59. Mori, T., and Cowley, A. W., Jr. (2004) Renal oxidative stress in medullary thick ascending limbs produced by elevated NaCl and glucose. *Hypertension* **43**, 341–346
60. Brown, M. K., and Naidoo, N. (2012) The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front. Physiol.* **3**, 263
61. Cohen, F. E., and Kelly, J. W. (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* **426**, 905–909
62. Chaudhuri, T. K., and Paul, S. (2006) Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J.* **273**, 1331–1349
63. Amaral, M. D. (2011) Targeting CFTR: how to treat cystic fibrosis by CFTR-repairing therapies. *Curr. Drug Targets* **12**, 683–693
64. Chaari, A., Hoarau-Véchet, J., and Ladjimi, M. (2013) Applying chaperones to protein-misfolding disorders: molecular chaperones against α -synuclein in Parkinson's disease. *Int. J. Biol. Macromol.* **60**, 196–205

OS9 Mediates NKCC2 Degradation

65. Brown, C. R., Hong-Brown, L. Q., Biwersi, J., Verkman, A. S., and Welch, W. J. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* **1**, 117–125
66. Welling, P. A. (2014) Rare mutations in renal sodium and potassium transporter genes exhibit impaired transport function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **23**, 1–8
67. Delpire, E., and Mount, D. B. (2002) Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 803–843
68. Delpire, E. (2000) Cation-chloride cotransporters in neuronal communication. *News Physiol. Sci.* **15**, 309–312

Deuxième partie :

**Identification de nouveaux
mécanismes moléculaires impliqués
dans le syndrome de Bartter**

Introduction

Comme décrit dans l'introduction, le syndrome de Bartter est une tubulopathie rénale héréditaire. Cette maladie est caractérisée comme un défaut de réabsorption de sel dans la BLA, qui est assurée par des protéines membranaires apicales et basolatérales. L'inactivation de ce système de transport de sel dans la BLA par les mutations affectant au moins quatre gènes différents codant pour des protéines impliquées dans ce mécanisme cause les différents types de syndrome de Bartter. L'inactivation des protéines NKCC2, ROMK, CLC-Kb et la barttine (la sous unité régulatrice des canaux chlorures basolatéraux CLC-Ka et CLC-Kb), caractérise le syndrome de Bartter type I, II, III et IV respectivement. À l'exception du syndrome de Bartter de type III, le polyhydramnios plus ou moins sévère, chez la femme porteuse d'un fœtus atteint de cette tubulopathie, caractérise cette maladie.

Cependant, il est important de noter que la cause génétique de presque 20% des cas de syndrome de Bartter anténatale reste inconnue. Dans la partie précédente, nous avons montré que la protéine OS-9 est importante pour la régulation de l'expression de NKCC2, ce qui nous laisse penser que des mutations affectant un partenaire de NKCC2 ou d'autres protéines impliquées dans le mécanisme de transport de sel dans la BLA pourraient expliquer la cause génétique chez de tels patients.

Dans cette partie, nous présentons sous forme d'un article publié dans NEJM (The New England Journal of Medicine), l'étude concernant l'identification pour la première fois d'un nouveau gène impliqué dans la régulation de NKCC2 et sa mutation qui cause un syndrome de Bartter anténatal et sévère. Cette étude est une collaboration internationale dans laquelle j'étais impliqué dans la partie biologie cellulaire et moléculaire et mes résultats sont présentés dans la figure 4 de l'article et la figure 4 des données supplémentaires.

ORIGINAL ARTICLE

Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter's Syndrome, and *MAGED2* Mutations

Kamel Laghmani, Ph.D., Bodo B. Beck, M.D., Sung-Sen Yang, M.D., Elie Seayfan, M.Sc., Andrea Wenzel, Ph.D., Björn Reusch, B.Sc., Helga Vitzthum, Ph.D., Dario Priem, M.Sc., Sylvie Demaretz, B.Sc., Klasien Bergmann, M.D., Leonie K. Duin, M.D., Heike Göbel, M.D., Christoph Mache, M.D., Holger Thiele, M.D., Malte P. Bartram, M.D., Carlos Dombret, Ph.D., Janine Altmüller, M.D., Peter Nürnberg, Ph.D., Thomas Benzing, M.D., Elena Levchenko, M.D., Hannsjörg W. Seyberth, M.D., Günter Klaus, M.D., Gökhan Yigit, Ph.D., Shih-Hua Lin, M.D., Albert Timmer, M.D., Tom J. de Koning, M.D., Sicco A. Scherjon, M.D., Karl P. Schlingmann, M.D., Mathieu J.M. Bertrand, Ph.D., Markus M. Rinschen, M.D., Olivier de Backer, Ph.D., Martin Konrad, M.D., and Martin Kömhoff, M.D.

ABSTRACT

BACKGROUND

Three pregnancies with male offspring in one family were complicated by severe polyhydramnios and prematurity. One fetus died; the other two had transient massive salt-wasting and polyuria reminiscent of antenatal Bartter's syndrome.

METHODS

To uncover the molecular cause of this possibly X-linked disease, we performed whole-exome sequencing of DNA from two members of the index family and targeted gene analysis of other members of this family and of six additional families with affected male fetuses. We also evaluated a series of women with idiopathic polyhydramnios who were pregnant with male fetuses. We performed immunohistochemical analysis, knockdown and overexpression experiments, and protein-protein interaction studies.

RESULTS

We identified a mutation in *MAGED2* in each of the 13 infants in our analysis who had transient antenatal Bartter's syndrome. *MAGED2* encodes melanoma-associated antigen D2 (MAGE-D2) and maps to the X chromosome. We also identified two different *MAGED2* mutations in two families with idiopathic polyhydramnios. Four patients died perinatally, and 11 survived. The initial presentation was more severe than in known types of antenatal Bartter's syndrome, as reflected by an earlier onset of polyhydramnios and labor. All symptoms disappeared spontaneously during follow-up in the infants who survived. We showed that MAGE-D2 affects the expression and function of the sodium chloride cotransporters NKCC2 and NCC (key components of salt reabsorption in the distal renal tubule), possibly through adenylate cyclase and cyclic AMP signaling and a cytoplasmic heat-shock protein.

CONCLUSIONS

We found that *MAGED2* mutations caused X-linked polyhydramnios with prematurity and a severe but transient form of antenatal Bartter's syndrome. MAGE-D2 is essential for fetal renal salt reabsorption, amniotic fluid homeostasis, and the maintenance of pregnancy. (Funded by the University of Groningen and others.)

The authors' affiliations are listed in the Appendix. Address reprint requests to Dr. Kömhoff at the University Children's Hospital, Philipps University Marburg, Baldinger Str., 35043 Marburg, Germany, or at martin.komhoff@yahoo.com.

Drs. Laghmani and Beck and Drs. Konrad and Kömhoff contributed equally to this article.

This article was published on April 27, 2016, at NEJM.org.

N Engl J Med 2016;374:1853-63.

DOI: 10.1056/NEJMoa1507629

Copyright © 2016 Massachusetts Medical Society.

IN THE SECOND TRIMESTER OF GESTATION, fetal kidneys become the predominant source of amniotic fluid, which is primarily removed by the fetus swallowing it.¹ Excessive amniotic fluid (called polyhydramnios) is caused by an imbalance between its production and removal — as observed, for instance, in fetuses with esophageal atresia. Overall, polyhydramnios has a prevalence of 1 to 2% and confers an increased risk of adverse perinatal outcome, especially preterm delivery.² The cause of polyhydramnios remains unknown in 30 to 60% of cases.^{2,3} There are only a few mendelian diseases associated with polyhydramnios, including antenatal Bartter's syndrome, a rare autosomal recessive renal tubular disorder. Antenatal Bartter's syndrome is a potentially life-threatening disease characterized by fetal polyuria, polyhydramnios, prematurity, and postnatal polyuria with persistent renal salt wasting. The known genetic causes of antenatal Bartter's syndrome directly affect the molecules that mediate salt reabsorption in the thick ascending limb of the loop of Henle.⁴ Treatment includes lifelong fluid and electrolyte supplementation, as well as the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) to inhibit excessive renal prostaglandin E₂ formation,⁵ although the safety of long-term treatment with NSAIDs, especially in preterm infants, is a subject of controversy.⁶

Two case reports describing three male infants with antenatal Bartter's syndrome are of special interest because salt wasting spontaneously resolved within several weeks after birth.^{7,8} In one family with three affected sons, only the younger two sons had postnatal development of polyuria.⁸ This points to an overlap with another condition of unknown cause, termed acute recurrent polyhydramnios, a familial condition that has also been described in male infants.⁹⁻¹¹ In this study, we sought to characterize severe polyhydramnios and transient antenatal Bartter's syndrome in 15 boys from nine families, to determine the genetic basis of this disorder, and to provide insight into the pathophysiological basis of the phenotype.

METHODS

STUDY DESIGN AND OVERSIGHT

We conducted the study from April 2013 until May 2015. DNA samples were obtained with written informed consent from the patients or

their guardians, as well as from unaffected family members. Clinical and biochemical data were collected retrospectively from medical charts. We studied the index family (F1) plus 6 additional families (F2 through F7, all of which had members with a transient clinical course of antenatal Bartter's syndrome) of Dutch, German, Belgian, and Turkish descent chosen from a cohort of 300 families with antenatal Bartter's syndrome. All affected infants were male and had tested negative for mutations in *SLC12A1* (encoding NKCC2), *KCNJ1* (encoding ROMK), and *BSND* (encoding barttin). We also evaluated a series of 11 women who had been counseled for idiopathic polyhydramnios during pregnancies with male fetuses. Polyhydramnios was diagnosed as an amniotic fluid index (a score indicating the amount of amniotic fluid measured on an ultrasound) of greater than 24 cm.¹² The study was approved by the ethics committees at the University Medical Centers in Cologne and Groningen.

LABORATORY ANALYSIS

Standard methods were used to analyze electrolyte and creatinine levels and solute concentrations (osmolalities) in urine and blood. Plasma aldosterone and plasma renin concentrations were measured with the use of radioimmunoassays.¹³ Urinary prostaglandin E₂ (PGE₂) was measured by gas chromatography–tandem mass spectrometry in cooled 24-hour urine samples, as described previously.¹⁴

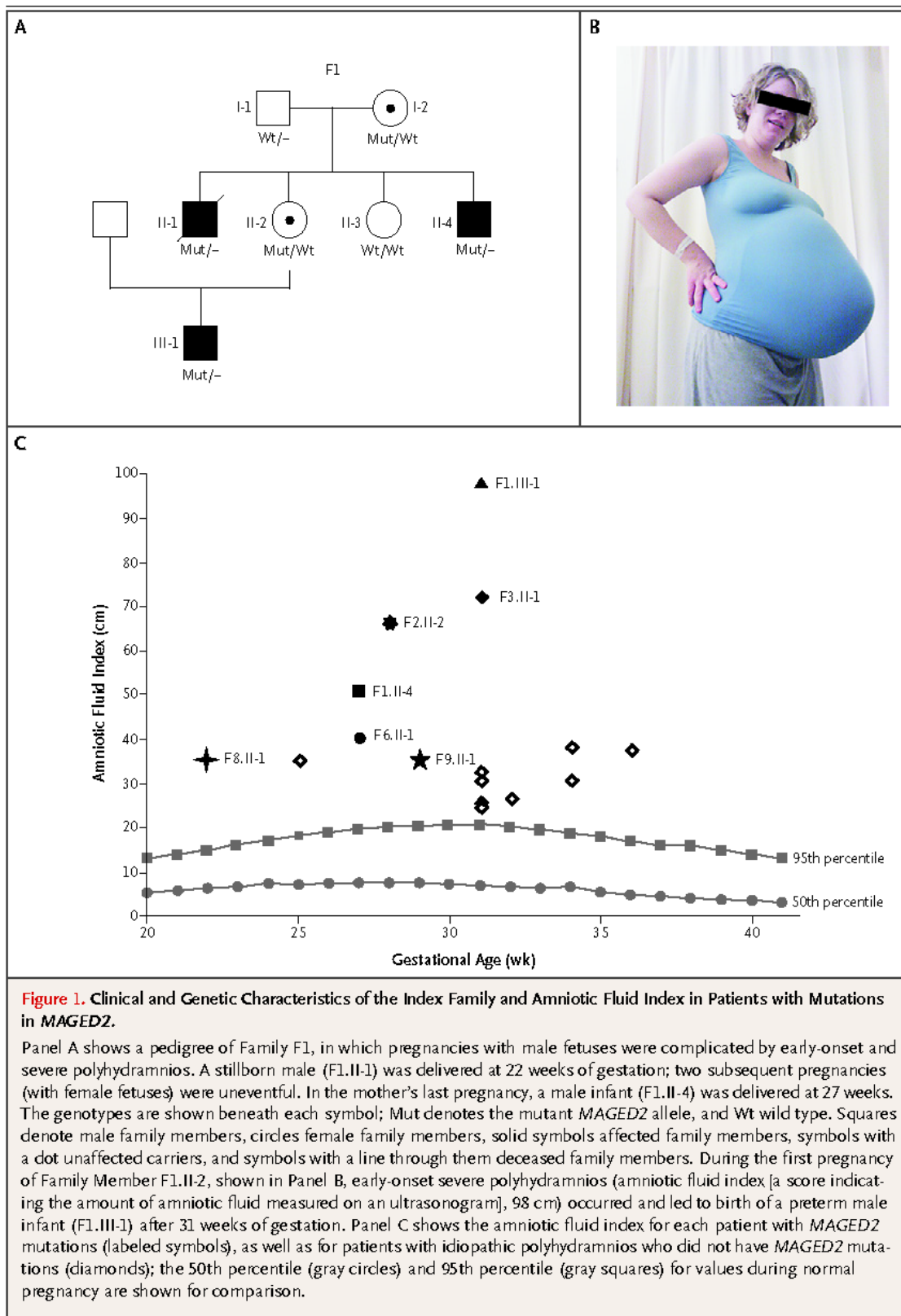
GENETIC ANALYSIS

We performed whole-exome sequencing of DNA from Patient F1.III-1 and his mother (F1.II-2), as described previously.¹⁵ Splicing was analyzed in vitro with a minigene (pSPL3 splicing) assay.¹⁶ See the Supplementary Appendix, available with the full text of this article at NEJM.org, for further details of the genetic analysis methods, as well as for details of the immunohistochemical analysis, the studies of manipulating gene expression in a cell line, and interactome analyses.

RESULTS

INDEX FAMILY

The first pregnancy of Family Member F1.I-2 was complicated by severe polyhydramnios that was diagnosed at 19 weeks of gestation and resulted in preterm delivery of a stillborn male (F1.II-1) at 22 weeks (Fig. 1A). Two subsequent pregnan-



cies (with female fetuses) were uneventful. The mother's last pregnancy was again complicated by early-onset (at 19 weeks) severe polyhydramnios (amniotic fluid index, 51 cm) that led to preterm delivery, at 27 weeks, of a male infant (F1.II-4). Immediately after birth, progressive polyuria

developed in the infant (maximum, 140 ml per kilogram per hour), with salt loss necessitating intravenous fluid infusion. Severe hypercalciuria also developed, which caused medullary nephrocalcinosis. Despite the surprising disappearance of the clinical symptoms within 3 to 4 weeks, antenatal Bartter's syndrome was suspected, and the patient was treated with supplemental electrolytes and indomethacin for 1 year. At the last follow-up, when the patient was 17 years of age, he showed no clinical signs of renal salt loss and had normal urinary concentrating and diluting capacities.

During the first pregnancy of his sister (F1.II-2), early-onset (at 19 weeks of gestation) severe polyhydramnios (amniotic fluid index, 98 cm) (Fig. 1B and 1C) occurred and led to birth of a preterm male infant (F1.III-1) after 31 weeks of gestation. Again, neonatal polyuria was observed, which peaked at 50 ml per kilogram per hour and normalized within 1 week. At last follow-up, at 2 years of age, the patient had normal tubular and glomerular function.

GENETIC ANALYSIS

Because polyhydramnios occurred exclusively in pregnancies with male offspring, we filtered the results obtained by whole-exome sequencing analysis of DNA from Patient F1.III-1 and his mother for rare shared X-chromosomal variants (minor-allele frequency, ≤ 0.001). Both the mother and the son carried a nonsense mutation that resulted in a premature stop codon in *MAGED2* (c.1038C→G, p.Y346*), which encodes melanoma-associated antigen D2 (MAGE-D2).

Targeted Sanger sequencing of DNA from family members showed cosegregation of p.Y346* in all affected males and their mothers (Fig. 1A). Subsequent sequencing of *MAGED2* in six additional families with transient antenatal Bartter's syndrome and 11 women who had had idiopathic polyhydramnios while pregnant with male fetuses identified mutations that were specific to each family in all affected males with transient antenatal Bartter's syndrome (F2 through F7) (Fig. 2A) and to two families with idiopathic polyhydramnios (F8 and F9). In total, seven truncating mutations (two nonsense, two frameshift, and three splice-site mutations) and two nontruncating mutations (one missense and one in-frame deletion) were identified (Fig. 2B, and Tables S1 and S2 in the Supplementary Appendix), none of which was present in 110 persons

of European descent without a family history of polyhydramnios or in public databases (1000 Genomes [<http://1000genomes.org>] and ExAC [<http://exac.broadinstitute.org>]).

TRANSIENT ANTENATAL BARTTER'S SYNDROME

Polyhydramnios was recognized early during pregnancy, at 19 to 20 weeks of gestation (Table 1; for individual data, see Table S1 in the Supplementary Appendix), and was deemed to be severe (amniotic fluid index, >35 cm) (Fig. 1C).² All the infants were born preterm, seven of them extremely preterm (at <28 weeks).¹⁷ The onset of polyhydramnios and labor occurred several weeks earlier than in known types of Bartter's syndrome. Two fetuses died in utero without a recognizable cause on autopsy, and one infant died from extreme prematurity.

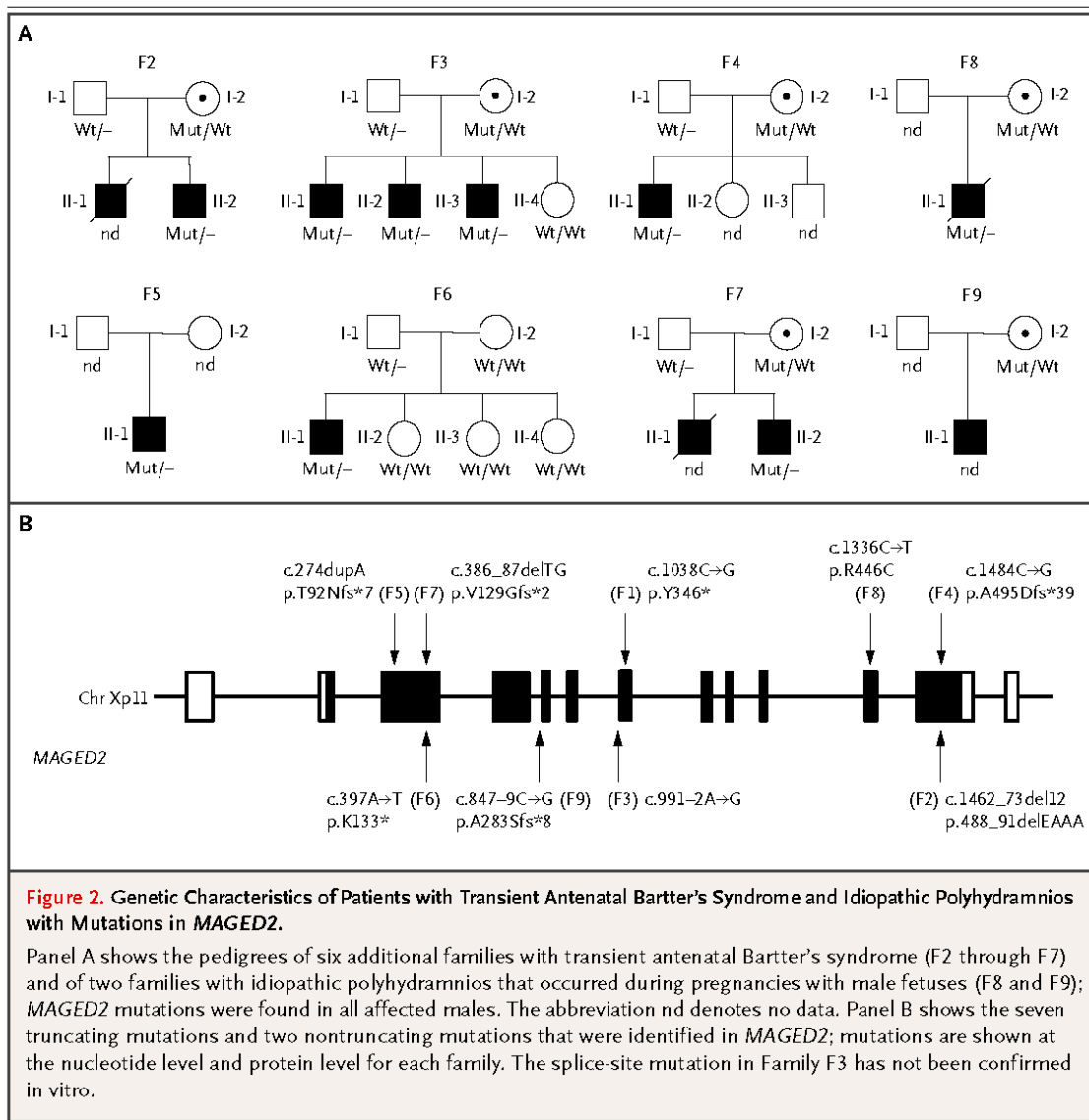
In the preterm babies, polyuria lasted from 3 days to 6 weeks and ended at 30 to 33 weeks of gestational age. Hypercalciuria was initially present, but it normalized in parallel with the resolution of renal salt and water losses. Nephrocalcinosis was noted in six patients and persisted in four patients. In the neonatal period, hyponatremia, hypokalemia, and elevated levels of renin and aldosterone were noted; these subsequently resolved or normalized. Five patients were treated with indomethacin for up to 9 years.

IDIOPATHIC POLYHYDRAMNIOS AND *MAGED2* MUTATIONS

Because the first son of Family F3 presented with polyhydramnios only,⁸ we studied a series of 11 women who had idiopathic polyhydramnios while pregnant with male fetuses and found *MAGED2* mutations in two additional families (F8 and F9) (Fig. 2A). We identified a missense mutation in one fetus (F8.II-1), who died at 22 weeks of gestation, and a heterozygous intronic mutation in the mother of a second family. The boy in the second family (F9.II-1), who was born after 29 weeks of gestation, survived without transient antenatal Bartter's syndrome. Aberrant splicing was shown in vitro; this splicing led to the generation of a premature stop codon (Fig. S1 in the Supplementary Appendix).

EXPRESSION OF MAGE-D2 IN HUMAN KIDNEY

We observed prominent tubular expression of MAGE-D2 in the human fetal renal cortex (Fig. S2 in the Supplementary Appendix). In both fetal



and adult kidney, MAGE-D2–positive tubules also bound anti-uromodulin (UMOD) antibody, which supported the conclusion that MAGE-D2 is expressed in the thick ascending limb of the loop of Henle (Fig. S3 in the Supplementary Appendix). We also found that MAGE-D2 is expressed in tubules outside the thick ascending limb of the loop of Henle in both fetal and adult kidney.

EXPRESSION OF NKCC2 AND NCC IN FETAL KIDNEY

Because of the phenotypic overlap between transient Bartter's syndrome and antenatal Bartter's syndrome caused by NKCC2 defects, we analyzed expression of NKCC2 in fetal kidney from Patient F1.II-1 and from control kidneys (21 and 23 weeks of gestation). In fetal controls, NKCC2 localized predominantly at the apical membrane

of tubular epithelial cells (Fig. 3A). In contrast, NKCC2 expression was reduced and virtually absent from the apical cell membrane in Patient F1.II-1. Instead, NKCC2 staining was predominantly cytoplasmic and colocalized with a marker of the endoplasmic reticulum.

Because impaired NKCC2 expression cannot fully account for the severity of transient Bartter's syndrome, we also analyzed the expression of the sodium chloride cotransporter NCC, a crucial component of salt reabsorption in the distal convoluted tubule that was previously shown to be compensatorily up-regulated in a mouse model of antenatal Bartter's syndrome.¹⁸ Like NKCC2, NCC was absent from the apical membrane in the patient's kidney tubules (Fig. 3B). Instead, intracellular retention of NCC

| Table 1. Clinical and Postnatal Biochemical Characteristics of Patients with <i>MAGED2</i> Mutations.* | | | |
|--|--------------|-------------------------|-----------------|
| Characteristic | Normal Value | Patients with Mutations | |
| | | Median (Range) | No. of Patients |
| Clinical data | | | |
| Onset of polyhydramnios — wk of gestation | | 19 (19–20) | 10 |
| Amniotic fluid index — cm† | <24 | 51 (36–98) | 7 |
| Gestational age at delivery — wk | 40 | 28 (22–34) | 15 |
| Duration of polyuria — wk | | 4.5 (0.5–6) | 8 |
| Nephrocalcinosis — no. of patients | | | 6 of 10 |
| Duration of mineral supplementation — mo | | 6 (1–36) | 8 |
| Duration of indomethacin treatment — yr | | 2 (1–9) | 6 |
| Blood data | | | |
| Sodium — mmol/liter | 134–146 | 128 (123–133) | 9 |
| Chloride — mmol/liter | 97–110 | 94 (84–100) | 9 |
| Potassium — mmol/liter | 4–6.5 | 2.9 (2.8–3.3) | 9 |
| Bicarbonate — mmol/liter | 22–29 | 28 (24–28) | 6 |
| Renin — ng/ml/hr | 4–23 | 69 (11–320) | 6 |
| Aldosterone — ng/dl | 25–213 | 1735 (107–4260) | 6 |
| Urine data | | | |
| Maximal calcium:creatinine ratio‡ | <0.8 | 5 (2.9–14.3) | 8 |
| PGE ₂ — ng/hr/1.73 m ² | 4–27 | 85 (8.4–243) | 5 |

* To convert the values for aldosterone to picomoles per liter, multiply by 27.74. To convert the values for renin to nanograms per liter-second, multiply by 0.2778. PGE₂ denotes prostaglandin E₂.

† The amniotic fluid index is a score indicating the amount of amniotic fluid measured on an ultrasonogram.

‡ The levels of calcium and creatinine used to calculate the ratio were measured in milligrams per deciliter.

was observed in the patient sample. Unlike the expression of NKCC2 and NCC, UMOD expression was clearly discernible in the apical membrane in the sample from the patient (Fig. 3C).

EFFECT OF MAGE-D2 ON NKCC2, NCC, AND UMOD

On the basis of the intracellular retention of NKCC2, we hypothesized that a loss of MAGE-D2 may cause retention of NKCC2 and its degradation in the endoplasmic reticulum, resulting in diminished total and cell-surface expression. We therefore analyzed the effects of MAGE-D2 on the stability and biosynthetic processing of NKCC2, using a cycloheximide decay assay in HEK293T cells transiently expressing NKCC2. In cells transfected with MAGE-D2 small interfering RNA (Fig. 4A), we observed a faster rate of decay of the immature NKCC2 protein, which was associated with significantly lower levels of mature NKCC2 protein. To confirm the specificity of these findings, we investigated the effects of MAGE-D2 overexpression, which increased the

half-life of immature NKCC2 (Fig. 4B) and accelerated its maturation, resulting in higher levels of the mature and hence membrane-expressed NKCC2.¹⁹ These results were confirmed by the increase in cell-surface expression and activity of NKCC2 when it was coexpressed with MAGE-D2 (Fig. 4C and 4D). MAGE-D2 overexpression enhanced the expression of total and cell-surface NCC but did not affect the expression of UMOD, a finding consistent with the immunohistochemical findings (Fig. S4A and S4B in the Supplementary Appendix).

INTERACTOME OF MAGE-D2

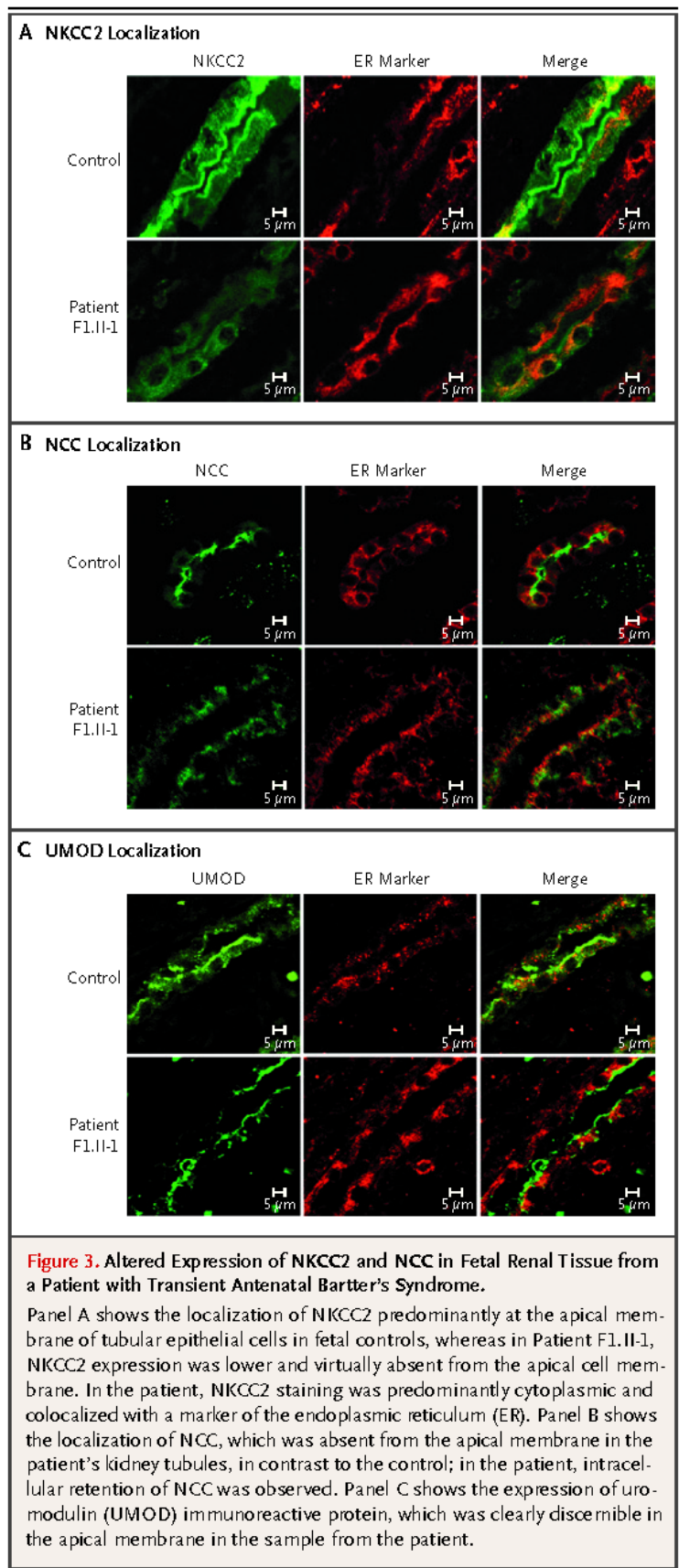
To determine the mechanism by which MAGE-D2 regulates renal salt reabsorption, we analyzed the MAGE-D2 interactome and compared the interactors of wild-type versus mutant MAGE-D2 (p.R446C). Gs-alpha (also called GNAS) and Hsp40 (also called DNAJB1) interacted with wild-type MAGE-D2 but not with mutant MAGE-D2 (Fig. S5A and S5B in the Supplementary Appen-

dix). The interaction of MAGE-D2 with Gs-alpha was further confirmed in HEK293T cells with the use of endogenous MAGE-D2 immunoprecipitated with two different polyclonal antibodies with nonoverlapping epitopes (Fig. S5C and S5D in the Supplementary Appendix).

DISCUSSION

We examined an X-linked disease entity characterized by acute, early-onset, severe polyhydramnios; prematurity; perinatal mortality; and transient renal salt-wasting. We identified mutations in *MAGED2* in nine families, including those originally described in the 1990s.^{7,8} In developing and adult kidneys, we found expression of MAGE-D2 in the thick ascending limb of the loop of Henle and distal tubules. In a fetus with transient antenatal Bartter's syndrome, we found reduced expression of the two critical sodium chloride cotransporters NKCC2 and NCC (which are expressed in the thick ascending limb of the loop of Henle and distal convoluted tubules), which explains the massive salt loss. We observed that, in a cultured renal-cell line, MAGE-D2 promotes NKCC2 and NCC expression and activity and that MAGE-D2 interacts specifically with Hsp40 and Gs-alpha. MAGE-D2 may thereby control the maturation of membrane proteins in the endoplasmic reticulum and enhance apical expression and activity of sodium chloride cotransporters.

Our results indicate that MAGE-D2 is critical for the maintenance of normal pregnancy. The fetal genotype is both necessary and sufficient for the full obstetrical and perinatal phenotype, as evidenced by Family F6, in which a de novo mutation in *MAGED2* was found in the fetus. Antenatal Bartter's syndrome with sensorineural deafness caused by mutations in *BSND* was hitherto considered to be the form of antenatal Bartter's syndrome with the most severe initial presentation.^{20,21} However, the severe consequences of fetal MAGE-D2 loss are illustrated by the fact that the onset of severe polyhydramnios was earlier in fetuses with MAGE-D2 loss than in fetuses with *BSND* mutations (median, 19 vs. 22 weeks of gestation), as was the age at delivery (median, 28 vs. 32 weeks of gestation). The severity of the polyhydramnios caused by mutated *MAGED2* is further illustrated by a comparison of the amniotic fluid index in patients with "idiopathic" polyhydramnios who had *MAGED2* muta-



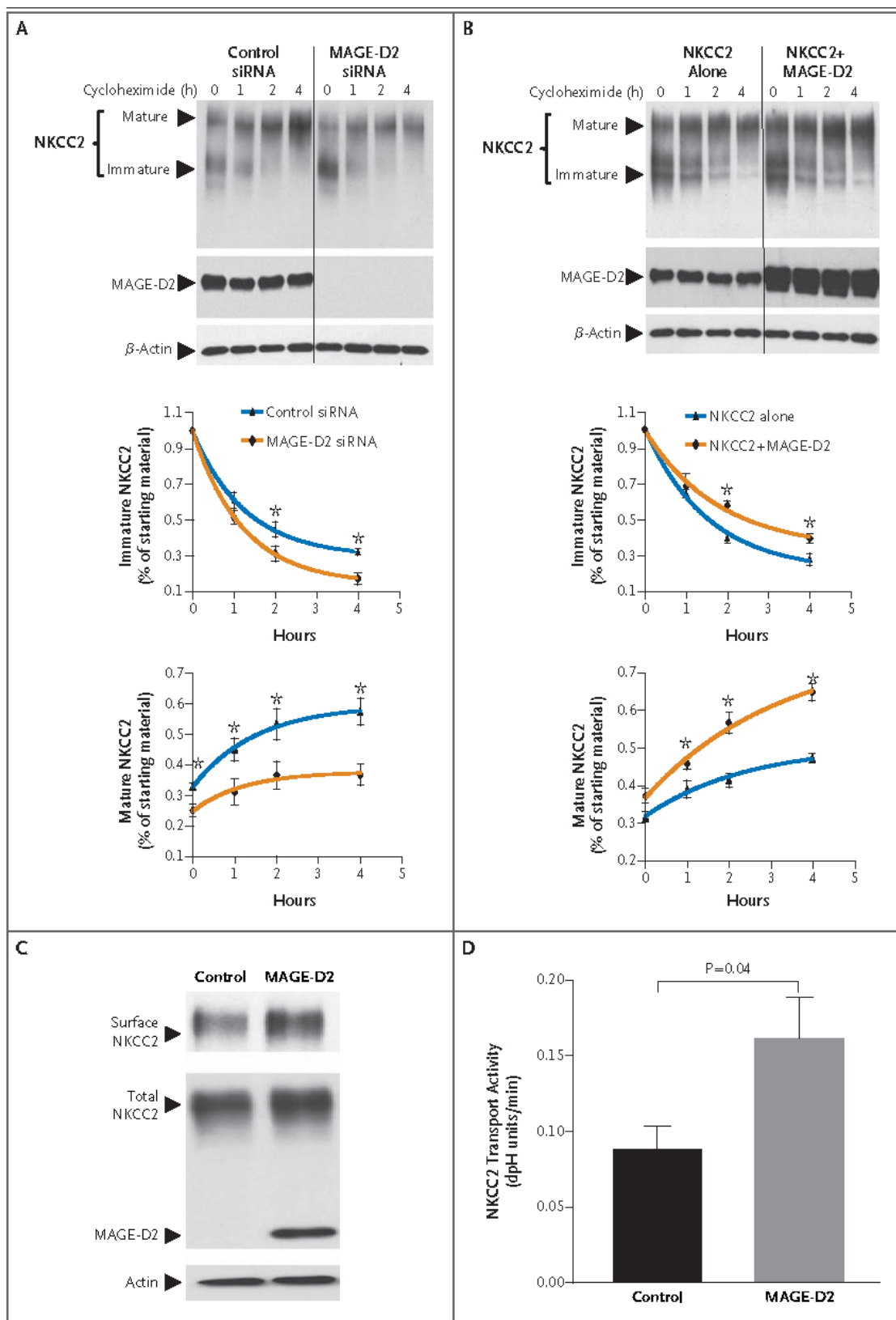


Figure 4 (facing page). Promotion of NKCC2 Biosynthesis, Cell-Surface Expression, and Activity by MAGE-D2.

To assess the stability and maturation of NKCC2, 12 to 14 hours after transfection of the cotransporter, cycloheximide was added to block protein synthesis; at various times after the addition of cycloheximide, NKCC2 levels were monitored by means of Western blotting. In cells transfected with MAGE-D2 small interfering RNA (siRNA), the immature NKCC2 protein had a higher rate of decay, which was associated with a significantly decreased maturation of NKCC2 protein (Panel A). MAGE-D2 overexpression was found to increase the half-life of immature NKCC2 (Panel B) and accelerate its maturation, resulting in increased levels of the mature and therefore membrane-expressed NKCC2. I bars represent the mean \pm SE. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$). These results were confirmed by the increase in cell-surface expression and activity of NKCC2 when coexpressed with MAGE-D2 (Panels C and D). The bars and T bars in Panel D represent the mean \pm SE rates of cell pH recovery from the ammonium-induced alkaline load.

tions with those who did not have such mutations (Fig. 1C). The absence of polyuria in F3.II-1 and F9.II-1 raises the question of whether previously reported cases of acute recurrent polyhydramnios might also be attributed to *MAGED2* mutations.⁹⁻¹¹

Apart from our previous study showing that MAGE-D2 is prominently expressed in the developing mouse and human kidney,²² studies of MAGE-D2 have been conducted primarily in the context of proliferation and tumor biology.^{23,24} In contrast to several MAGEs that have been shown to promote ubiquitylation by activating RING ligases, little is known about the precise function of MAGE-D2.²⁵ We therefore sought to identify its binding partners and showed that MAGE-D2 interacts with Hsp40 and Gs-alpha.

Hsp40 is a cytoplasmic chaperone that interacts with NCC (and NKCC2 [unpublished observations]) and regulates its biogenesis in the endoplasmic reticulum.²⁶ Our observation that MAGE-D2 promotes NCC and NKCC2 biogenesis in a heterologous expression system that induces endoplasmic reticulum-associated degradation²⁷ is consistent with Hsp40 being a binding partner of MAGE-D2.

Gs-alpha is activated by G protein-coupled receptors and promotes the generation of cyclic AMP (cAMP) by activating adenylate cyclases.

Our finding that MAGE-D2 promotes both total and cell-surface expression of NKCC2 and NCC is compatible with its binding to Gs-alpha. First, heterozygous loss of *GNAS*, which encodes Gs-alpha, reduces the expression of NKCC2 total protein.²⁸ Second, cAMP is a key regulator of cell-surface expression of NKCC2 and also enhances the activity of NCC.^{29,30}

An intriguing aspect is the transient character of the renal phenotype, which is characterized by the spontaneous resolution of polyuria, a decrease in the concentrations of renin and aldosterone, and a decrease in urinary prostaglandin E_2 levels. Five patients in our study were given long-term treatment with NSAIDs and supplemental minerals in spite of their clinical and biochemical recovery; genetic diagnosis facilitated by our findings may help patients avoid such long-term treatment and may lead to better clinical management.

We do not have an explanation for the transient nature of the phenotype and can only speculate about the mechanisms involved. First, we hypothesize that increases in the sensitivity of adenylate cyclase activity to vasopressin, which has been described during renal development in several species,^{31,32} permit expression of NKCC2 and NCC independent of MAGE-D2 beyond a certain stage of renal development. In addition, or alternatively, higher levels of oxygenation in the kidney during gestation may promote synthesis of NKCC2 and NCC: antenatally, the renal blood supply is just one fifth of postnatal values, which results in a remarkable degree of tissue hypoxia, especially in the medulla, where NKCC2 is expressed.³³⁻³⁵ Both tissue hypoxia and heterologous expression of membrane proteins (i.e., NKCC2 in HEK293T cells) induce endoplasmic reticulum-associated protein degradation.^{27,36}

We speculate that MAGE-D2 binding to the cytoplasmic chaperone Hsp40 protects NKCC2 and NCC from endoplasmic reticulum-associated degradation mediated by Hsp40. This could explain the (constitutive) requirement of MAGE-D2 for proper expression of NCC and NKCC2 in our cell system, in contrast to the oxygen-dependent — and, hence, time-dependent — function of MAGE-D2 during gestation.

We have shown that loss-of-function mutations in *MAGED2* caused a previously unrecognized

distinct phenotype of transient renal salt-wasting, which promoted early and severe polyhydramnios and therefore prematurity in association with substantial perinatal mortality. Our data indicate that *MAGE-D2* has a role in positively regulating the expression of membrane proteins, which points to new avenues for restoring the trafficking of defective membrane proteins in human diseases. We speculate that the identification of loss-of-function mutations in *MAGED2* in the mothers of male fetuses with acute, early, and severe polyhydramnios may result in the avoid-

ance of unnecessary diagnostic measures in pregnant women and of potentially harmful treatment of preterm babies.

Supported by the Stichting Beatrix Kinderkliniek, University of Groningen, the Netherlands (grant 671435 to Dr. Kömhoff), Koeln Fortune Program/Faculty of Medicine (grant KF Nr 245/2014 to Dr. Beck), University of Cologne, Germany, and Tri-Service General Hospital, Taiwan (grant TSGH-C104-111, MOST-104-2314-B-016-023-MY3 to Dr. Yang).

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at NEJM.org.

We thank the patients and family members for their participation in this study; Saskia Seland, Marion Müller, and Beate Reygol for technical assistance; Jacky Senior for critically reading the manuscript; and Werner Garbe for providing patient information.

APPENDIX

The authors' affiliations are as follows: INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Unité 1138, Centre National de la Recherche Scientifique, ERL8228 Université Pierre et Marie Curie and Université Paris-Descartes, Paris (K.L., E.S., S.D.); Institute of Human Genetics (B.B.B., A.W., B.R., J.A., G.Y.), Department of Pathology (H.G.), Cologne Center for Genomics and Center for Molecular Medicine (H.T., J.A., P.N.), Department II of Internal Medicine and Center for Molecular Medicine Cologne (M.P.B., T.B., M.M.R.), and Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging Associated Diseases and Systems Biology of Aging Cologne (T.B., M.M.R.) — all at the University of Cologne, Cologne, the Department of Cellular and Integrative Physiology, University Medical Center Hamburg, Hamburg (H.V.), University Children's Hospital, Philipps University Marburg (H.W.S.), and Kuratorium für Heimdialyse, Pediatric Kidney Center (G.K.), Marburg, the Institute of Human Genetics, University Health Services Göttingen, Göttingen (G.Y.), and the Department of General Pediatrics, University Hospital Münster, Münster (K.P.S., M. Konrad) — all in Germany; the Division of Nephrology, Department of Medicine, Tri-Service General Hospital, National Defense Medical Center (S.-S.Y., S.-H.L.), and Institute of BioMedical Sciences, Academia Sinica (S.-S.Y.) — both in Taipei, Taiwan; the Department of Biomedical Molecular Biology, Inflammation Research Center, VIB/Ghent University, Ghent (D.P., M.J.M.B.), Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire, University of Namur, Namur (C.D., O.B.), and the Division of Nephrology, University Children's Hospital Leuven (E.L.) — all in Belgium; the Divisions of Neonatology (K.B.) and Nephrology (M. Kömhoff), Beatrix Children's Hospital, and the Departments of Obstetrics and Gynecology (L.K.D., S.A.S.), Pathology and Medical Biology (A.T.), and Genetics (T.J.K.) — all at University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands; and University Children's Hospital Graz, Graz, Austria (C.M.).

REFERENCES

- Ross MG, Brace RA. National Institute of Child Health and Development Conference summary: amniotic fluid biology — basic and clinical aspects. *J Matern Fetal Med* 2001;10:2-19.
- Magann EF, Chauhan SP, Doherty DA, Lutgendorf MA, Magann MI, Morrison JC. A review of idiopathic hydramnios and pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62:795-802.
- Dorleijn DM, Cohen-Overbeek TE, Groenendaal F, Bruinse HW, Stoutenbeek P. Idiopathic polyhydramnios and postnatal findings. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:315-20.
- Jeck N, Schlingmann KP, Reinalter SC, et al. Salt handling in the distal nephron: lessons learned from inherited human disorders. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R782-95.
- Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kühl PG, Mehls O, Schärer K. Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediatr* 1985;107:694-701.
- Johnston PG, Gillam-Krakauer M, Fuller MP, Reese J. Evidence-based use of indomethacin and ibuprofen in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol* 2012;39:111-36.
- Reinalter S, Devlieger H, Proesmans W. Neonatal Bartter syndrome: spontaneous resolution of all signs and symptoms. *Pediatr Nephrol* 1998;12:186-8.
- Engels A, Gordjani N, Nolte S, Seyberth HW. Angeborene passagere hyperprostaglandinurische Tubulopathie bei zwei frühgeborenen Geschwistern Mschr Kinderheilk 1991;139:185.
- Pitkin RM. Acute polyhydramnios recurrent in successive pregnancies: management with multiple amniocenteses. *Obstet Gynecol* 1976;48:Suppl:42S-43S.
- Rode L, Bundgaard A, Skibsted L, Odum L, Jørgensen C, Langhoff-Roos J. Acute recurrent polyhydramnios: a combination of amniocenteses and NSAID may be curative rather than palliative. *Fetal Diagn Ther* 2007;22:186-9.
- Weissman A, Zimmer EZ. Acute polyhydramnios recurrent in four pregnancies: a case report. *J Reprod Med* 1987;32:65-6.
- Magann EF, Sanderson M, Martin JN, Chauhan S. The amniotic fluid index, single deepest pocket, and two-diameter pocket in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1581-8.
- Fiselier T, Monnens L, van Munster P, Jansen M, Peer P, Lijnen P. The renin-angiotensin-aldosterone system in infancy and childhood in basal conditions and after stimulation. *Eur J Pediatr* 1984;143:18-24.
- Schweer H, Watzel B, Seyberth HW. Determination of seven prostanoids in 1 ml of urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization triple stage quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr* 1994;652:221-7.
- Basmanav FB, Oprisoreanu AM, Pasternack SM, et al. Mutations in *POGLUT1*, encoding protein O-glucosyltransferase 1, cause autosomal-dominant Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* 2014;94:135-43.
- Burn TC, Connors TD, Klinger KW, Landes GM. Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector. *Gene* 1995;161:183-7.
- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75-84.
- Cantone A, Yang X, Yan Q, Giebisch G, Hebert SC, Wang T. Mouse model of type II Bartter's syndrome. I. Upregulation of thiazide-sensitive Na-Cl cotransport activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F1366-72.
- Zaarour N, Defontaine N, Demarets S, Azroyan A, Cheval L, Laghmani K. Secretory carrier membrane protein 2 regulates exocytic insertion of *NKCC2* into the

- cell membrane. *J Biol Chem* 2011;286:9489-502.
20. Brochard K, Boyer O, Blanchard A, et al. Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1455-64.
21. Peters M, Jeck N, Reinalter S, et al. Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med* 2002;112:183-90.
22. Bertrand M, Huijbers I, Chomez P, De Backer O. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development. *Dev Dyn* 2004;230:325-34.
23. Tseng HY, Chen LH, Ye Y, et al. The melanoma-associated antigen MAGB-D2 suppresses TRAIL receptor 2 and protects against TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 2012;33:1871-81.
24. Kanda M, Nomoto S, Oya H, et al. The expression of melanoma-associated antigen D2 both in surgically resected and serum samples serves as clinically relevant biomarker of gastric cancer progression. *Ann Surg Oncol* 2016;23:Suppl 2:214-21.
25. Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR. MAGB-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 2010;39:963-74.
26. Donnelly BF, Needham PG, Snyder AC, et al. Hsp70 and Hsp90 multichaperone complexes sequentially regulate thiazide-sensitive cotransporter endoplasmic reticulum-associated degradation and biogenesis. *J Biol Chem* 2013;288:13124-35.
27. Casagrande R, Stern P, Diehn M, et al. Degradation of proteins from the BR of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell* 2000;5:729-35.
28. Ecelbarger CA, Yu S, Lee AJ, Weinstein LS, Knepper MA. Decreased renal Na-K-2Cl cotransporter abundance in mice with heterozygous disruption of the G(s)alpha gene. *Am J Physiol* 1999;277:F235-44.
29. de Jong JC, Willems PH, van den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ. Functional expression of the human thiazide-sensitive NaCl cotransporter in Madin-Darby canine kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2428-35.
30. Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;301:F1143-59.
31. Schlondorff D, Weber H, Trizna W, Fine LG. Vasopressin responsiveness of renal adenylate cyclase in newborn rats and rabbits. *Am J Physiol* 1978;234:F16-21.
32. Imbert-Teboul M, Chabardès D, Clique A, Montégut M, Morel F. Ontogenesis of hormone-dependent adenylate cyclase in isolated rat nephron segments. *Am J Physiol* 1984;247:F316-25.
33. Rudolph AM, Heymann MA, Teramo KA, Barrett CT, Räihä NCR. Studies on the circulation of the previsible human fetus. *Pediatr Res* 1971;5:452-65.
34. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla — its implications for disease. *N Engl J Med* 1995;332:647-55.
35. Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, et al. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int* 2006;69:114-22.
36. Karar J, Dolt KS, Qadar Pasha MA. Endoplasmic reticulum stress response in murine kidney exposed to acute hypobaric hypoxia. *FEBS Lett* 2008;582:2521-6.

Copyright © 2016 Massachusetts Medical Society.

Supplementary Appendix

This appendix has been provided by the authors to give readers additional information about their work.

Supplement to: Laghmani K, Beck BB, Yang S-S, et al. Polyhydramnios, transient antenatal Bartter's syndrome, and *MAGED2* mutations. *N Engl J Med* 2016;374:1853-63. DOI: 10.1056/NEJMoa1507629

Supplementary Appendix

Table of contents

| | |
|-------------|----|
| Methods : | 2 |
| Figures : | 8 |
| Tables: | 16 |
| References: | 19 |

Non-standard abbreviations: LC-MS/MS: Liquid chromatography–mass spectrometry/
mass spectrometry, LFQ: Label free quantification

Methods

Genetic analysis

Whole exome sequencing was performed using NimbleGen SeqCapEZ Human Exome Library v2.0 (Roche NimbleGen, Inc.) followed by next generation sequencing on an Illumina HighSeq™ sequencing platform as described:¹ Filtering and variant calling was performed using the Cologne Center for Genomics' VARBANK database and analysis tool (<https://varbank.ccg.uni-koeln.de>).

Minigene Assay/pSPL3 splicing assay: *In vitro* analysis of the potential splice-site mutation c.847-(9)C>G was performed using the pSPL3 splicing assay. Fragments of the human *MAGED2* gene containing exon 5, flanked by *MAGED2* upstream and downstream intronic sequences, were cloned into the splicing vector pSPL3 generating the plasmids pSPL3-*MAGED2*-Exon5-WT and the mutant pSPL3-*MAGED2*-c.847-(9)C>G-Exon5. Accordingly, *in vitro* analysis of the potential splice-site mutation c.1484C>G was performed by cloning fragments of the human *MAGED2* gene containing exon 12 flanked by *MAGED2* upstream and downstream sequences into the splicing vector pSPL3 generating the plasmid pSPL3-*MAGED2*-Exon12-WT. The c.1336C>G mutation was introduced by site-directed mutagenesis generating the plasmid pSPL3-*MAGED2*-Exon12-1484C>G. All plasmids were sequenced to confirm the distinct mutation and absence of off-target mutations in the constructs. Plasmids were transfected into HEK293T cells and mRNA was reverse transcribed.

Databases: The following sources were used to obtain genetic information: National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>), UCSC Genome

Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>), 1000 Genomes (<http://1000genomes.org/>) and Broad Institute (<http://exac.broadinstitute.org>). Missense variants were subjected to *in silico* analysis using the following tools: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Alamut software (http://www.interactive-biosoftware.com/doc/alamut-visual/whats_new/v2.6.html).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as described previously.² Human fetal samples were derived from autopsy of patient F1.II-1 and control samples after medical abortions at 18, 21 and 23 weeks of gestation. Adult kidney tissue was obtained after tumor nephrectomy.

Antibodies

Use of all antibodies for immunohistochemistry on paraffin-embedded tissue: Abcam, Cambridge UK (BIP ab21685, UMOD ab11221, XBP1 ab37152), EMD millipore, Temecula, CA (NCC: AB 3553, NKCC2: AB3562P) and Santa Cruz, Heidelberg, Germany (Calnexin: sc-80645) has been described.²⁻⁷ Monoclonal anti-Calnexin antibodies were used as ER-markers in double-immunofluorescence studies with polyclonal anti-NKCC2- and NCC antibodies. Polyclonal anti-BIP (ER-marker) antibodies were used in combination with monoclonal anti UMOD antibodies. The specificity of the anti MAGE-D2 antibodies (Atlas, Stockholm, SE, HPA031572) has been analyzed by comparing the staining of control and knockout tissue (see

Supplementary figure 2). Immunofluorescence images were obtained using a LSM510 microscope (Carl Zeiss).

Western-Blotting: A rabbit anti-mouse-MAGE-D2 antibody was raised by immunization with the peptide QVQENQDTRPKVKAK corresponding to the amino acids 161-175 of the mouse Maged2 protein. Specificity was shown by absence of a band at 58 kd in MAGE-D2 knockout cells. Monoclonal anti-Myc, anti-Flag, and anti- β actin antibodies were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France), respectively.

Knockdown/over-expression of MAGE-D2 in HEK293 cells

We knocked down the endogenous expression of MAGE-D2 in human embryonic kidney (HEK293) cells using a mixture of MAGE-D2-specific siRNA's (1: GGACGAAGCUGAUAUCGGA, 2: GCUAAAGACCAGACGAAGA, 3: AGGCGAUGGAAGCGGAUUU, 4: GAAAAGGACAGUAGCUCGA.) or scrambled control siRNA (UGGUUUACAUGUCGACUAA, GE Darmachon, France). Cells were then transfected with a plasmid containing Myc-tagged NKCC2. To analyze the stability and maturation of NKCC2, cycloheximide (20 μ g/ml) was added to the culture medium at 12 to 14 h post-transfection.⁸ To investigate the effects of MAGE-D2 over-expression, cells were transfected with genes encoding the cation-chloride cotransporters NKCC2, NCC or the biochemically distinct membrane protein UMOD with or without a MAGE-D2-encoding plasmid. To determine the presence of NKCC2, NCC and UMOD at the plasma membrane their cell surface biotinylation and the activity of transiently expressed NKCC2 were analyzed in HEK293 cells.^{9,10}

Quantification of NKCC2 biosynthesis

To analyze the stability of immature NKCC2, its density at given time points of the chase was normalized to its density at time 0 by means of the NIH-Image program. To quantify NKCC2 maturation, the density of mature NKCC2 at each time point was compared to immature NKCC2 at time 0. Results are expressed as mean \pm S.E. Differences between means were evaluated using paired or unpaired t-test or analysis of variance as appropriate. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Interactome analysis

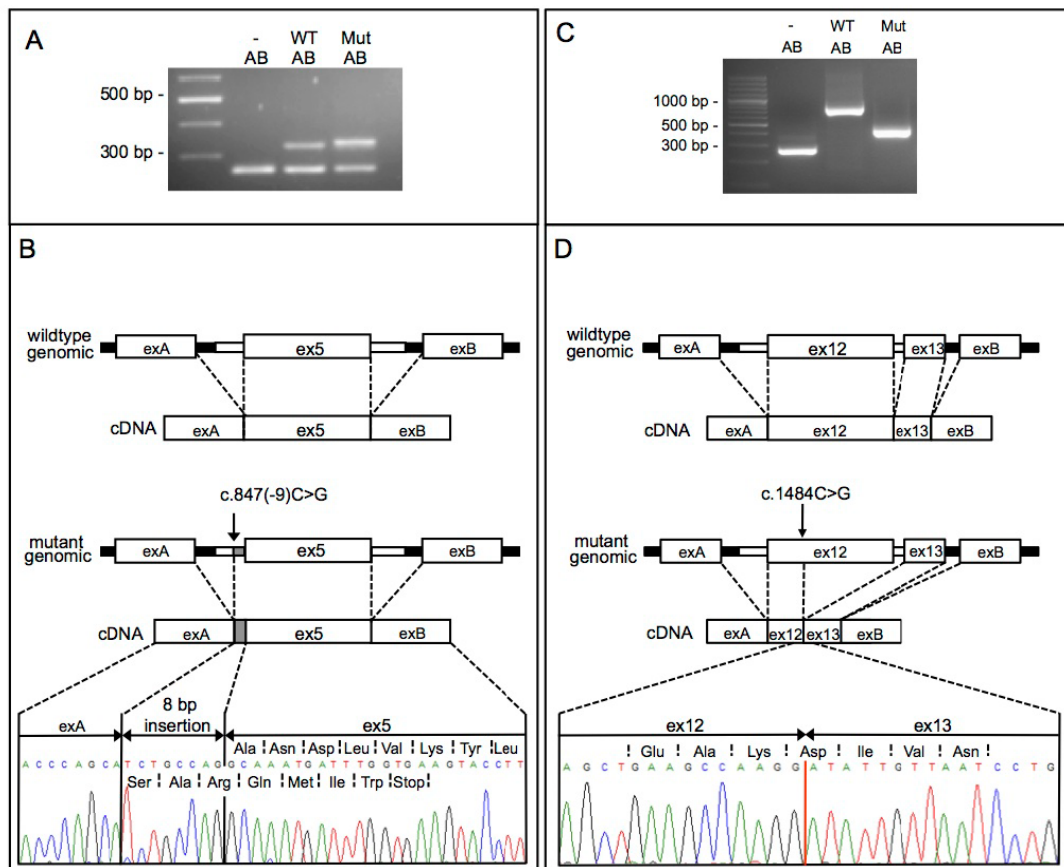
Prior analyzing the MAGED-2 interactome we selected the most appropriate nontruncating mutation for subsequent protein interaction studies. As predicted, a minigene splice assay revealed that c.1484C>G activates a cryptic splice donor site within exon 12, leading to aberrantly spliced mRNA (p.A495Dfs*39), whereas splicing was not affected by c.1336C>T (p.R446C). The latter mutant was therefore selected for comparison to wildtype MAGE-D2. HEK293T protein lysates were then generated and endogenous MAGE-D2 was immunoprecipitated using two different MAGE-D2 antibodies (Atlas, Stockholm, SE, HPA031572, HPA031573) as previously described.¹¹ To compare the interactome of wildtype MAGE-D2 and the p.R446C-mutant MAGE-D2, we tagged both wildtype and mutant *MAGED2* cDNAs such that the N-termini of the proteins would carry the FLAG epitope, transfected the cDNAs into HEK293T cells, and then purified recombinant protein by immunoprecipitation.

LC-MS/MS: Quantitative label-free interactomic analysis was performed in triplicates according to a protocol previously described.¹² Briefly, peptides were cleaned-up using C18 stage-tips as previously described and loaded on a nLC-MS/MS system which was coupled to a Q Exactive Plus tandem mass spectrometer (Thermo scientific).¹³ Separation was performed using an in-house packed 50 cm column with 1.7 μ m C18 beads (Dr Maisch GmbH) in a column oven. A binary buffer system was utilized (solution A: 0.1% formic acid, and solution B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid and a linear gradient from 7-38% B in 60 min). MS1 spectra were acquired (AGC target of 1E6). Resolution was 70,000 within a mass range of 200-1200 m/z. Top10 peaks were fragmented by Higher-energy collisional dissociation (HCD). Resolution for MS/MS spectra was set to 35,000 at 200m/z. The raw data of this study, including search results, is available via ProteomeXchange/PRIDE, Project accession: PXD003279, Username: reviewer60194@ebi.ac.uk, Password: 72egNIPW, Password will be removed upon acceptance of the manuscript.¹⁴

Bioinformatic analysis: For analysis of RAW files, Maxquant v 1.5.1 was used with default settings and the human reference uniprot database (May 2014, including common contaminants) as a database. Identifications were filtered to a protein and peptide FDR of 0.01. Match between run option was enabled. The MaxQuant label-free quantification algorithm was enabled for all samples.¹⁵ Perseus (v. 1.5.2.4) was used for further analysis, including removal of reverse and contaminant protein identifications as previously described.^{12, 16} Missing values were imputed, if at least 3 valid LFQ values were present

in at least one experimental group. To correct p-values for multiple testing, an approach similar to SAM was utilized ($s_0=1$, and the maximum allowed FDR was <0.05).¹⁷

Supplemental figures

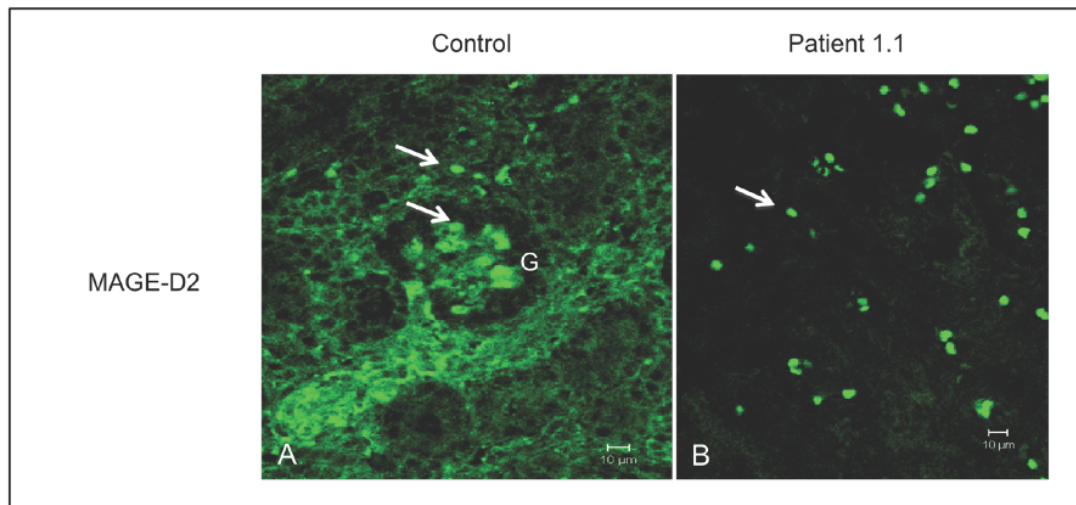


Supplemental figure 1: In vitro characterization of the putative splice site mutations in *MAGED2* in families F9 and F4.

Panel A shows the results of the Minigene splicing assay with a size shift of the c.847(-9)C>G *MAGED2* PCR amplicon compared to wild type cDNA on agarose gel. Panel B depicts a schematic representation of the splicing assay: the fragments of the human *MAGED2* gene containing exon 5 flanked by intronic upstream and downstream sequences were cloned into the splicing vector pSPL3 generating the plasmids pSPL3-*MAGED2*-Exon5-WT and pSPL3-*MAGED2*-Exon5-847(-9)C>G. After transfection, mRNA was extracted from HEK293T cells and reverse transcribed cDNA was amplified

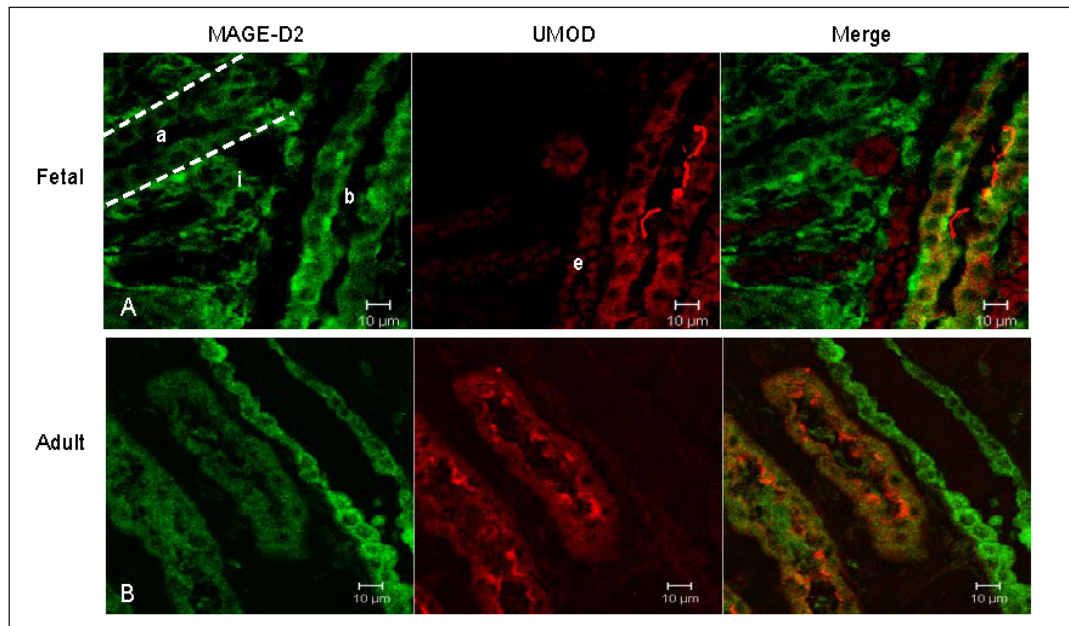
using specific flanking primers. As predicted, the C>G substitution at position -9 crippled the wild type acceptor splice site by activating an aberrant new acceptor site which leads to the inclusion of 8 bp from intron 4 and subsequent generation of a premature stop codon (p.A283Sfs*8).

Panel C shows the results of the Minigene splicing assay with a size shift of the c.1484C>G *MAGED2* PCR amplicon compared to wild type cDNA on agarose gel. Panel D depicts a schematic representation of the splicing assay: the fragments of the human *MAGED2* gene containing exons 12 and 13 flanked by intronic upstream and downstream sequences were cloned into the splicing vector pSPL3 generating the plasmids pSPL3-*MAGED2*-Exon12-WT and pSPL3-*MAGED2*-Exon12-1484C>G. After transfection, mRNA was extracted from HEK293T cells and reverse transcribed cDNA was amplified using specific flanking primers. As predicted, the C>G substitution at position c.1484 generated a new donor splice-site which leads to alternative splicing inducing a frameshift and premature protein truncation (p.A495Dfs*39).



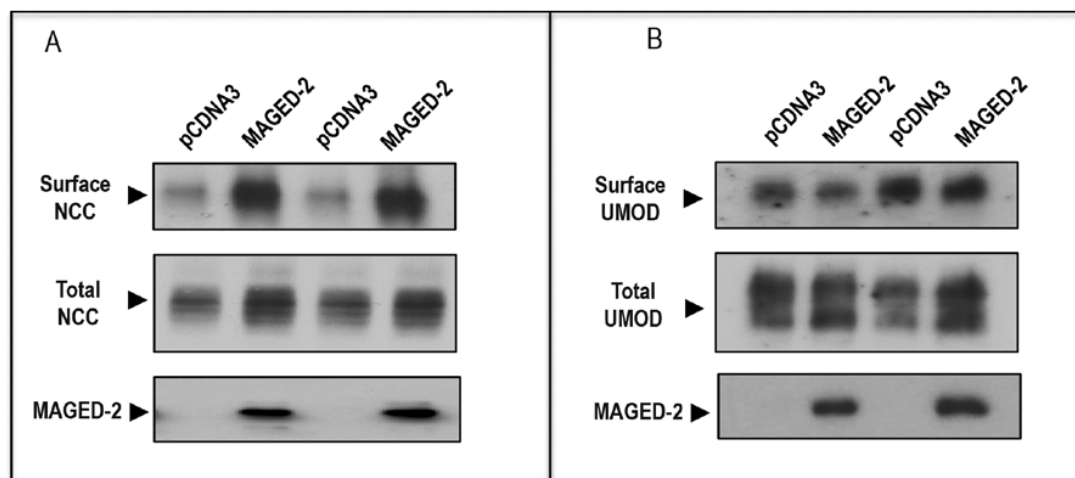
Supplemental figure 2: Cortical expression of MAGE-D2 in fetal human kidney.

Widespread tubular expression is seen surrounding a glomerulum (“G”). Unspecific staining of erythrocytes (white arrows) are noted both in the control and the kidney from patient F1.II-1. Note complete absence of specific staining in F1.II-1.



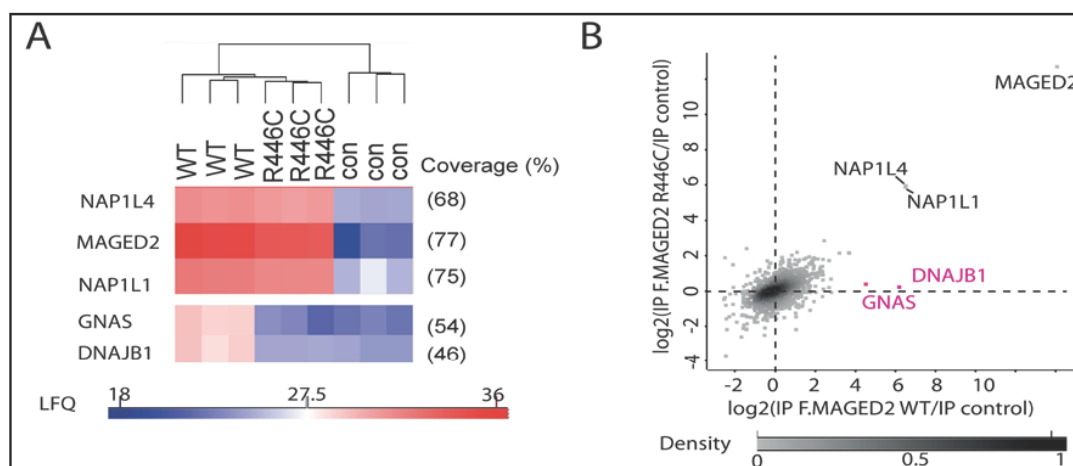
Supplemental figure 3: Expression of MAGE-D2 in fetal and adult human kidney.

Panel A: In fetal kidney (18wGA), MAGE-D2 (green) is expressed in tubules (tubule “a” is demarcated by white dashed lines), which can partly (tubule “b”) be identified as thick ascending limbs of the loop of Henle by coexpression of UMOD (red). There is also abundant interstitial staining (“i”) localizing to capillaries and interstitial cells. Likewise, MAGE-D2 is observed in both TALH and UMOD-negative nephron segments in adult human kidney.



Supplemental figure 4: Total and surface NCC are specifically upregulated by MAGE-D2.

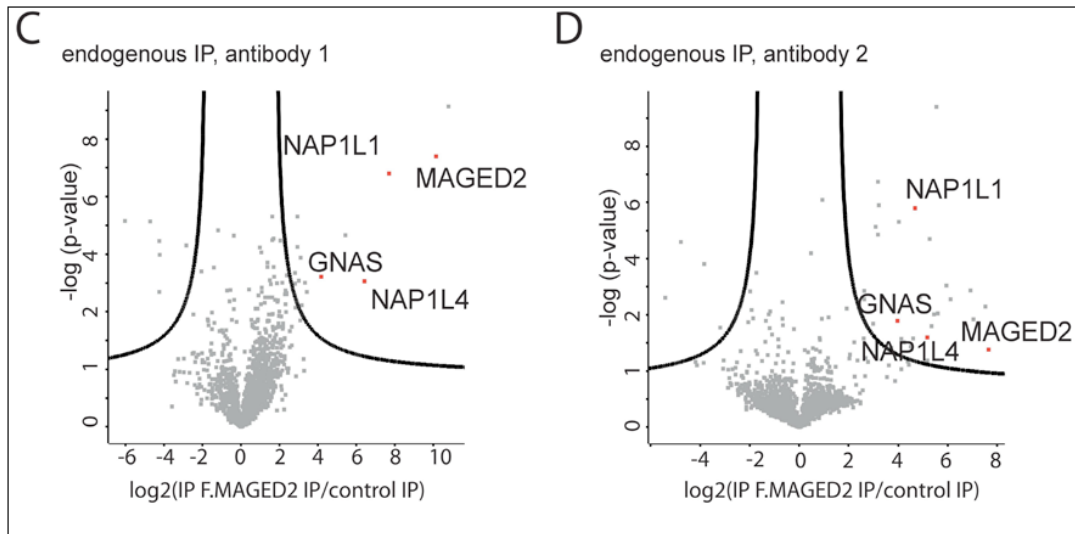
HEK295T cells were transfected with NCC (A) or UMOD (B), in the absence or presence of MAGE-D2 as indicated. Surface biotinylated proteins were recovered from cell extracts by precipitation with neutravidin-agarose as described earlier^{9, 10}. Similar to NKCC2 (Fig. 4C), MAGE-D2 overexpression increased total and surface NCC protein expression by 46% ($p < 0.01$, $n = 5$) and 104% ($p < 0.02$, $n = 5$). In contrast to NKCC2 and NCC, MAGE-D2 had no significant effect on UMOD expression ($n = 7$).



Supplemental figure 5 A and B: The cytoplasmic chaperone Hsp40 and Gs-alpha interact with wildtype but not with mutant MAGE-D2 p.R446C

Panel A: Heatmap demonstrating replicate proteomic analyses of FLAG-tagged MAGE-D2 wildtype (WT) and mutant protein (p.R446C) pull-downs. NAP1L1, NAP1L4, GNAS (Gs-alpha) and DNAJB1 (Hsp40) were first identified as interactors by statistically significant changes in binding to WT, or empty vector (control) by means of label-free quantification (LFQ) intensities. Whereas NAP1L1 and NAP1L4 bound to both, WT or mutant MAGE-D2, the latter did not interact with GNAS (Gs-alpha) and DNAJB1 (Hsp40). Coverage denotes the total percentage of individual protein sequences covered by identified and quantified peptides. Panel B: Quantitative proteomic analysis of the MAGE-D2 interactome. Logarithmized ratio of quantitative immunoprecipitation (IP) analysis of FLAG-tagged WT protein (F.MAGE-D2 WT IP vs. control IP) is plotted against the ratio from the FLAG-tagged mutant protein (F.MAGE-D2 p.R446C IP vs. control IP). Labeled proteins were determined as interactors after correction for multiple testing (FDR = 0.05; $s_0 = 1$). Non-binding proteins have a ratio close to 1:1 and are located close to the dashed 0-lines. Density of data points is coded in grey scale. The

interactors GNAS and DNAJB1 were only significant in MAGE-D2 WT IP, but not MAGE-D2 p.R446C IP. Relative enrichment for GNAS in the WT immunoprecipitation is 17.6 fold as compared to p.R446C protein ($p < 0.001$, $FDR < 0.05$), whereas enrichment for DNAJB1 is 62.2 fold as compared to R446C ($p < 0.001$, $FDR < 0.05$).



Supplemental figure 5 C and D: Proteomic analysis of the endogenous MAGE-D2 interactome in HEK293T cells.

Volcano plot of endogenous MAGE-D2 pulldowns using two different anti-MAGE-D2 antibodies as indicated in the methods. Logarithmized LFQ ratios of triplicate analyses are plotted against the negative logarithmic P value of a Student's t -test. The proteins on the right side of the curved line were determined as interactors. This line was drawn to correct for multiple testing [false discovery rate (FDR) = 0.05; $s_0 = 1$]. Interactors confirmed from the first study (Fig. S5 A and B) are indicated by their Gene symbol.

Supplemental table 1: Clinical, biochemical and genetic data of individual patients

Abbreviations: PGE₂ - prostaglandin E₂.

| Clinical diagnosis | Transient antenatal Bartter syndrome | | | | | | | | | | Polyhydramnios | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|----------------|------|------|
| | F1 | | F2 | | F3 | | F4 | F5 | F6 | F7 | | F8 | F9 |
| family | II-1 | II-4 | III-1 | II-1 | II-2 | II-1 | II-2 | II-1 | II-1 | II-1 | II-1 | II-1 | II-1 |
| patient | | | | | | | | | | | | | |
| <i>clinical data</i> | normal | | | | | | | | | | | | |
| polyhydramnios, | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes |
| onset (weeks) | 19 | 19 | 19 | 20 | 20 | 19 | 20 | 20 | 20 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| amniotic fluid index (cm) | < 24 | | | | | | | | | | | | |
| gestational age at delivery (weeks) | 22 | 27 | 31 | 25 | 28 | 34 | 33 | 31 | 24 | 26 | 27 | 30 | 29 |
| neonatal survival | no | yes | yes | no | yes | yes | yes | yes | yes | yes | yes | no | yes |
| polyuria, | yes | yes | | yes | yes | no | yes | yes | yes | yes | yes | | no |
| duration (weeks) | 5 | 1 | | 5 | 5 | | | 6 | 4 | 4 | 4 | 1 | |
| nephrocalcinosis | yes | yes | | no | no | no | no | no | yes | yes | yes | | no |
| indometacin (years) | 1 | no | | no | no | no | 9 | 3 | 1 | no | 1.2 | 2.8 | no |
| <i>blood</i> | | | | | | | | | | | | | |
| sodium (mmol/l), neonatal | 126 | 133 | | 136 | 136 | 128 | 135 | 128 | 126 | 126 | 123 | | 133 |
| chloride (mmol/l), neonatal | 85 | 100 | | 99 | 99 | 84 | 95 | 93 | 92 | 92 | 84 | | 97 |
| bicarbonate (mmol/l), neonatal | 24 | 38 | | 28 | 28 | | | 24 | 28 | 28 | 24 | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|-----------|------|-----------------|------------|------|-----------|-----------|----------|----------------|------------|------------|
| potassium (mmol/l), neonatal | 4-6.5 | 2.8 | 3 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 3 | 3.2 | 2.9 | 2.8 | 3.3 | |
| PRA (ng/ml/hr), neonatal | 4 - 23 | 46 | 345 | 15 | 92 | | | | 320 | 11 | | |
| PA (ng/dl), neonatal | 25-213 | 106 | 4260 | 255 | 1980 | | | | 1490 | 3400 | | |
| sodium (mmol/l), follow up | 138-145 | 134 | 139 | 136 | 137 | 137 | 137 | 138 | 136 | 138 | | |
| chloride (mmol/l), follow up | 98-106 | 96 | | 99 | 106 | 107 | 102 | 102 | 97 | 100 | | |
| bicarbonate (mmol/l), follow up | 22-29 | 26 | | | 25 | 24 | | | 28 | 27 | | |
| potassium (mmol/l), follow up | 3.5-5 | 4.1 | 4.5 | 3.5 | 3.5 | 3.8 | 4.1 | 4.2 | 4.2 | 4.2 | | |
| PRA (ng/ml/hr), follow up | 0.5-12 | 5 | | 6.9 | 40 | 20 | 9 | | 21 | 17 | | |
| PA (ng/dl), follow up | 7-39 | 8 | | 11.7 | 192 | 20 | 100 | | 16 | 101 | | |
| urine | | | | | | | | | | | | |
| max Ca/crea (mg/mg), neonatal | < 0.8 | 14.3 | 6.1 | 6.1 | 2.9 | 4.3 | | 3.0 | 5.8 | 3.6 | | |
| PGE ₂ (ng/h/1.73m ²), neonatal | 4 - 27 | | 154 | 243 | 27 | | | | 8.4 | 85 | | |
| max Ca/creat (mg/mg), follow up | < 0.2 | 0.07 | 0.27 | 0.17 | 0.1 | 0.07 | 0.23 | | 0.13 | 0.07 | | |
| PGE ₂ (ng/h/1.73m ²), follow up | 4 - 27 | | | 9 | 32 | 15 | 4 | | | | | |
| minimal osmolality (mOsmol/l) | < 70 | 71 | 43 | 88 | 58 | 92 | | | 76 | | | |
| maximal osmolality (mOsmol/l) | > 800 | 1116 | | 800 | 831 | 1055 | | | 713 | | | |
| MAGED2 mutation | | | | | | | | | | | | |
| nucleotide level (NM_177433) | | c.1038C>G | | c.1462_73 del12 | c.991-2A>G | | c.1484C>G | c.274dupA | c.397A>T | c.386_87 delTG | c.1336 C>T | c.847-9C>G |

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--|---------|-------------------|--------------------------|---------------|-------------|---------|--------------|---------|--------------|
| protein level (NP_803182) | | p.Y346* | p.488_491 delEAAA | new acceptor splice site | p.A495D fs*39 | p.T92N fs*7 | p.K133* | p.V129G fs*2 | p.R446C | p.A28 3Sfs*8 |
|---------------------------|--|---------|-------------------|--------------------------|---------------|-------------|---------|--------------|---------|--------------|

Supplemental table 2: *in silico* prediction of pathogenicity of *MAGED2* missense and novel splice site mutations.

| Family | Inheritance | <i>MAGED2</i> genotype | Type of mutation | <i>in silico</i> prediction | | Minigene assay |
|--------|-------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|----------|--|
| | | Nucleotide level Protein level | | Polyphen2 | SIFT | Alamut Visual* <i>in vitro</i> splicing pattern |
| F4 | familial | c.1484C>G | splice site | possibly damaging, Score 0.94 | damaging | activation of a cryptic splice donor site within exon 12 |
| F8 | familial | c.1336C>T | missense | probably damaging, Score 1.0 | damaging | no effect |
| F9 | familial | c.847(-9)C>G | splice site | NA | NA | insertion of 8 bp from intron 4 resulting in a frameshift and premature stop codon (p.A283Sfs*8); Figure S1) |

NA – not applicable; *version 2.6 (Interactive Biosoftware, Rouen, France)

References

1. Basmanav FB, Oprisoreanu AM, Pasternack SM, et al. Mutations in POGlut1, encoding protein O-glucosyltransferase 1, cause autosomal-dominant Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* 2014; 94:135-43.
2. Kida Y, Asahina K, Teraoka H, Gitelman I, Sato T. Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney. *J Histochem Cytochem* 2007; 55:661-73.
3. Ogino T, Wang X, Kato S, Miyokawa N, Harabuchi Y, Ferrone S. Endoplasmic reticulum chaperone-specific monoclonal antibodies for flow cytometry and immunohistochemical staining. *Tissue Antigens* 2003; 62:385-93.
4. Nasr SH, Lucia JP, Galgano SJ, Markowitz GS, D'Agati VD. Uromodulin storage disease. *Kidney Int* 2008; 73:971-6.
5. Ledeganck KJ, Boulet GA, Horvath CA, et al. Expression of renal distal tubule transporters TRPM6 and NCC in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity and effect of EGF treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301:F486-93.
6. Kitahara H, Masumoto J, Parker AL, et al. COP35, a cholangiocarcinoma-binding oligopeptide, interacts with the clathrin heavy chain accompanied by GRP78. *Mol Cancer Res* 2011; 9:688-701.
7. Hsiao JR, Chang KC, Chen CW, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers XBP-1-mediated up-regulation of an EBV oncoprotein in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69:4461-7.
8. Zaarour N, Demaretz S, Defontaine N, Zhu Y, Laghmani K. Multiple evolutionarily conserved Di-leucine like motifs in the carboxyl terminus control the anterograde trafficking of NKCC2. *J Biol Chem* 2012; 287:42642-53.
9. Benziane B, Demaretz S, Defontaine N, et al. NKCC2 surface expression in mammalian cells: down-regulation by novel interaction with aldolase B. *J Biol Chem* 2007; 282:33817-30.
10. Chu TS, Peng Y, Cano A, Yanagisawa M, Alpern RJ. Endothelin(B) receptor activates NHE-3 by a Ca²⁺-dependent pathway in OKP cells. *J Clin Invest* 1996; 97:1454-62.
11. Rinschen MM, Bharill P, Wu X, et al. The ubiquitin ligase Ubr4 controls stability of podocin/MEC-2 supercomplexes. *Hum Mol Genet* 2016.
12. Kohli P, Bartram MP, Habbig S, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of the YAP/TAZ interactome. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306:C805-18.
13. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 2003; 75:663-70.
14. Vizcaino JA, Deutsch EW, Wang R, et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol* 2014; 32:223-6.
15. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13:2513-26.

16. Cox J, Mann M. 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC Bioinformatics* 2012; 13 Suppl 16:S12.
17. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:5116-21.

Troisième partie :

**Rôle des protéines de choc thermique
(HSP) dans la dégradation et la
maturation de NKCC2**

Conclusions et perspectives

Dans ce travail, nous avons participé à approfondir les connaissances sur la régulation du trafic intracellulaire de la protéine NKCC2 depuis sa biosynthèse. Nous avons démontré qu'à l'image de toutes les protéines membranaires, la maturation des protéines NKCC2 nouvellement synthétisées au niveau du RE est l'étape critique pour l'expression membranaire du co-transporteur. En effet, cette maturation implique un réseau protéique du contrôle qualité selon lequel les formes improprement repliées de NKCC2 sont corrigées et stabilisées par des chaperons spécifiques, et ceux qui persistent mal-repliés, sont dégradés par la voie de dégradation associée au RE appelée ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Nous avons identifié par le système de double hybride et de co-immunoprécipitation, les protéines OS-9, DNAJB1, HSPA1A et STCH comme partenaire spécifique de la forme immature de NKCC2. La co-expression d'OS-9 augmente la dégradation de la forme immature de NKCC2 par le protéasome et diminue son expression membranaire. D'autre part, sous des conditions de stress, la co-expression de DNAJB1 ou HSPA1A augmente la stabilité de la forme immature de NKCC2 augmentant aussi sa maturation. En revanche, sous les mêmes conditions de stress, la co-expression de STCH, membre de la même famille que HSPA1A, diminue la stabilité de la forme immature du co-transporteur diminuant aussi sa maturation. Nous avons montré aussi que HSPA1A régule d'une manière différentielle l'expression de NKCC2 en fonction de l'état de stress de la cellule, en protégeant le co-transporteur en présence de stress et en le dégradant en absence de stress. Plus encore, en collaboration avec d'autres groupes de recherche internationaux, nous avons montré pour la première fois que la mutation du gène codant pour la protéine MAGED2, partenaire de DNAJB1, entraîne un syndrome de Bartter sévère et transitoire en diminuant l'expression membranaire de NKCC2 et NCC. Une meilleure compréhension du mécanisme de contrôle qualité de NKCC2 *via* l'identification de composants spécifiques modulant la régulation de NKCC2 pourrait à long terme aboutir à des nouveaux outils thérapeutiques dans le traitement du syndrome de Bartter de type I.

À l'image de nombreuses autres maladies rénales héréditaires, le syndrome de Bartter de type I serait secondaire à des défauts de trafic intracellulaire des protéines NKCC2 exprimant des mutations dans les sites régulateurs. Une stratégie thérapeutique facilitant le trafic intracellulaire et l'adressage membranaire des protéines mutées pourrait donc permettre le traitement pharmacologique de cette tubulopathie (6, 205). Cette hypothèse est renforcée par la capacité d'un chaperon chimique (Lumacaftor, Orkambi), approuvé pour l'utilisation clinique par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA), à traiter les sujets porteurs de la mutation $\Delta F508$ du CFTR, responsable de la majorité des cas de mucoviscidose,

ce chaperon corrige l'expression membranaire de la protéine CFTR mutée (206). Cette stratégie de restauration fonctionnelle des protéines mutées a été également étudiée pour plusieurs autres maladies héréditaires comme le syndrome de déficience de transporteur de dopamine (dopamine transporter deficiency syndrome, DTDS) et le diabète insipide néphrogénique. Dans le cas du diabète insipide néphrogénique lié au chromosome X, il a été montré que des chaperons chimiques, comme le glycérol, le DMSO, la curcumine et l'ionomycine, peuvent restaurer l'expression et la fonction du récepteur V2 muté de la vasopressine, responsable de la maladie. Ainsi, le traitement des cellules par le bupropion et l'ibigaine a montré une capacité de restauration d'expression fonctionnelle du transporteur de dopamine muté (A314V et R445C) en augmentant sa maturation (207). À l'image de ces trois protéines transmembranaires, nous étudierons l'effet de ces chaperons pharmacologiques et d'autres sur l'expression et le trafic intracellulaire des mutants de NKCC2 retenus au niveau du RE.

En dehors de ces chaperons pharmacologiques, l'inhibition ou l'activation d'une interaction spécifique entre NKCC2 et un de ces partenaire pourrait également fournir une deuxième approche thérapeutique pour les sujets atteints de syndrome de Bartter de type I (205, 208). Cette approche a été validée par des études effectuées sur quelques protéines membranaires (209-211). Le meilleur exemple est celui de l'interaction entre le récepteur AMPA (régule la majorité de la transmission synaptique rapide dans le système nerveux central) et la protéine TARP- γ 8 (augmente l'expression membranaire du récepteur AMPA) qui pourrait être inhibé d'une manière spécifique au niveau de l'hippocampe par le traitement avec la molécule JNJ-55511118 (5-[2-chloro-6-(trifluoromethoxy)phenyl]-1,3-dihydrobenzimidazol-2-one) (209). À ce sujet, il est donc important dans la suite de ce travail d'identifier les protéines impliquées dans la régulation de l'expression de NKCC2 sauvage et mutée, en étudiant les partenaires identifiés par la technique de double hybride effectuée par notre laboratoire. Nous avons choisi AUP1 (ancient ubiquitous protein 1) et MAN1A1 (1,2-alpha-mannosidase IA), ces deux protéines interagissent avec la forme immature de NKCC2, pour étudier leur effet sur l'expression de NKCC2. La surexpression de la protéines AUP1, un partenaire d'OS-9 (212), entraîne une diminution de l'expression de NKCC2, un effet associé à l'augmentation de la poly-ubiquitinylation du co-transporteur. Ainsi, la surexpression de la protéine MAN1A1, une protéine connue par deux rôles ; le premier est de favoriser la maturation des protéines N-glycosylées par son activité catalytique et le deuxième est de favoriser la dégradation du substrat par le système ERAD (213), entraînant une diminution de l'expression de NKCC2. Il serait donc intéressant d'approfondir l'étude de l'effet de ces

protéines, en particulier sur la stabilité de la forme immature de NKCC2, de vérifier la voie de dégradation du co-transporteur par l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de protéasome et de l'autophagie, et de confirmer l'ordre de leur interaction, s'il existe, en accomplissant des expériences de knock-down suivies par des co-immunoprécipitations avec NKCC2.

À la lumière des résultats obtenus avec MAGED2 et les différentes HSPs, il est tentant de spéculer que la présence de l'hypoxie chez le fœtus pendant la grossesse entraîne l'expression de MAGED2 pour maintenir l'expression membranaire de NKCC2 et NCC. En effet, l'hypoxie induit un stress de RE à l'image de la transfection transitoire des protéines membranaires et dans ces conditions, la mutation ou l'inactivation de MAGED2 pourrait entraîner une diminution de l'expression de DNAJB1 entraînant ainsi la diminution de l'abondance membranaire de NKCC2 et NCC. À ce sujet, nos expériences préliminaires ont montré que MAGED2 co-immunoprécipite NKCC2 et DNAJB1 et augmente l'expression de DNAJB1 en fonction de la quantité exprimée de MAGED2. Il serait donc intéressant d'étudier en détail l'interaction NKCC2/MAGED2/DNAJB1, en particulier de déterminer l'ordre de l'interaction de MAGED2 et DNAJB1 avec NKCC2, et de déterminer si l'interaction NKCC2/MAGED2 est directe ou indirecte en procédant à des expériences de knock-down suivies par des co-immunoprécipitations avec le co-transporteur.

Bibliographie

1. Gamba G. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiological Reviews*. 2005;85(2):423.
2. Mount DB. Thick Ascending Limb of the Loop of Henle. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;9(11):1974-86.
3. Hebert SC, Mount DB, Gamba G. Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family. *Pflügers Archiv*. 2004;447(5):580-93.
4. Gamba G, Friedman PA. Thick ascending limb: the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2008;458(1):61.
5. Carota I, Theilig F, Oppermann M, Kongsuphol P, Rosenauer A, Schreiber R, et al. Localization and functional characterization of the human NKCC2 isoforms. *Acta Physiologica*. 2010;199(3):327-38.
6. Schaeffer C, Creatore A, Rampoldi L. Protein trafficking defects in inherited kidney diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;29(suppl_4):iv33-iv44.
7. Allen F, Tisher CC. Morphology of the ascending thick limb of Henle. *Kidney International*. 1976;9(1):8-22.
8. Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiological Reviews*. 1985;65(3):760-97.
9. Hou J. The kidney tight junction (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2014;34(6):1451-7.
10. Good DW, Burg MB. Ammonia production by individual segments of the rat nephron. *The Journal of Clinical Investigation*. 1984;73(3):602-10.
11. Buerkert J, Martin D, Trigg D. Segmental analysis of the renal tubule in buffer production and net acid formation. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1983;244(4):F442-F54.
12. Stern L, Backman KA, Hayslett JP. Effect of cortical-medullary gradient for ammonia on urinary excretion of ammonia. *Kidney International*. 1985;27(4):652-61.
13. Nagami GT, Kurokawa K. Regulation of ammonia production by mouse proximal tubules perfused in vitro. Effect of luminal perfusion. *The Journal of Clinical Investigation*. 1985;75(3):844-9.
14. Good DW, Knepper MA, Burg MB. Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1984;247(1):F35-F44.
15. Good D, Knepper M, Burg M. Ammonia absorption by the thick ascending limb of Henle's loop. *New Advances in Renal Ammonia Metabolism: Karger Publishers*; 1985. p. 110-5.
16. Good DW. Active absorption of NH₄⁺ by rat medullary thick ascending limb: inhibition by potassium. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1988;255(1):F78-F87.
17. Attmane-Elakeb A, Mount DB, Sibella V, Vernimmen C, Hebert SC, Bichara M. Stimulation by in Vivo and in Vitro Metabolic Acidosis of Expression of rBSC-1, the Na⁺-K⁺-(NH₄⁺)-2Cl⁻-Cotransporter of the Rat Medullary Thick Ascending Limb. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(50):33681-91.
18. Garvin JL, Burg MB, Knepper MA. Active NH₄⁺ absorption by the thick ascending limb. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1988;255(1):F57-F65.

19. Bourgeois S, Meer LV, Wootla B, Bloch-Faure M, Chambrey R, xE, et al. NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(6):1895-904.
20. Good DW. Sodium-dependent bicarbonate absorption by cortical thick ascending limb of rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1985;248(6):F821.
21. Kikeri D, Azar S, Sun A, Zeidel ML, Hebert SC. Na(+)-H⁺ antiporter and Na(+)-HCO₃⁻ symporter regulate intracellular pH in mouse medullary thick limbs of Henle. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1990;258(3):F445.
22. Bourgeois S, Massé S, Paillard M, Houillier P. Basolateral membrane Cl⁻-, Na⁺-, and K⁺-coupled base transport mechanisms in rat MTALH. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2002;282(4):F655-F68.
23. Good D, editor *The thick ascending limb as a site of renal bicarbonate reabsorption. Seminars in nephrology*; 1993.
24. Gottschalk C, Mylle M. Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. *The American journal of physiology*. 1959;196(4):927-36.
25. Burg MB, Green N. Function of the thick ascending limb of Henle's loop. *American Journal of Physiology--Legacy Content*. 1973;224(3):659-68.
26. Rocha AS, Kokko JP. Sodium Chloride and Water Transport in the Medullary Thick Ascending Limb of Henle. EVIDENCE FOR ACTIVE CHLORIDE TRANSPORT. *The Journal of Clinical Investigation*. 1973;52(3):612-23.
27. Imai M, Kokko JP. Sodium chloride, urea, and water transport in the thin ascending limb of Henle. Generation of osmotic gradients by passive diffusion of solutes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1974;53(2):393-402.
28. Greger R. Chloride reabsorption in the rabbit cortical thick ascending limb of the loop of Henle. *Pflügers Archiv*. 1981;390(1):38-43.
29. Nishimura H, Imai M, Ogawa M. Sodium chloride and water transport in the renal distal tubule of the rainbow trout. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1983;244(3):F247-F54.
30. Rocha AS, Kokko JP. Permeability of medullary nephron segments to urea and water: Effect of vasopressin. *Kidney International*. 1974;6(6):379-87.
31. Hebert SC, Andreoli TE. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1984;246(6):F745-F56.
32. Hebert SC, Andreoli TE. Ionic conductance pathways in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. The paracellular pathway and electrogenic Cl⁻ absorption. *The Journal of General Physiology*. 1986;87(4):567-90.
33. Andreoli T, Schaffer J. Some considerations of the role of antidiuretic hormone in water homeostasis. *Recent progress in hormone research*. 1976;33:387.
34. Hebert SC, Reeves WB, Molony DA, Andreoli TE. The medullary thick limb: Function and modulation of the single-effect multiplier. *Kidney International*. 1987;31(2):580-9.
35. Sasaki S, Imai M. Effects of vasopressin on water and NaCl transport across the in vitro perfused medullary thick ascending limb of Henle's loop of mouse, rat, and rabbit kidneys. *Pflügers Archiv*. 1980;383(3):215-21.
36. Burg MB. Thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney International*. 1982;22(5):454-64.
37. Suki WN, Rouse D, Ng RC, Kokko JP. Calcium transport in the thick ascending limb of Henle. Heterogeneity of function in the medullary and cortical segments. *The Journal of Clinical Investigation*. 1980;66(5):1004-9.

38. Gagnon KB, Delpire E. Physiology of SLC12 transporters: lessons from inherited human genetic mutations and genetically engineered mouse knockouts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2013;304(8):C693-C714.
39. Hook JB, Williamson HE. Effect of Furosemide on Renal Medullary Sodium Gradient. *Experimental Biology and Medicine*. 1965;118(2):372-4.
40. Fraser AG, Cowie JF, Lambie AT, Robson JS. The effects of furosemide on the osmolality of the urine and the composition of renal tissue. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1967;158(3):475-86.
41. Leme CE, Wajchenberg BL, Lichewitz B, Bezas AG, Santos RR. The site of action of furosemide in the human kidney. *Metabolism*. 1967;16(10):871-89.
42. Greger R, Schlatter E. Presence of luminal K⁺, a prerequisite for active NaCl transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Archiv*. 1981;392(1):92-4.
43. Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt BC, Pfeifferl B, Heinz E. Electrically silent cotransport of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1980;600(2):432-47.
44. Greger R, Schlatter E, Lang F. Evidence for electroneutral sodium chloride cotransport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Archiv*. 1983;396(4):308-14.
45. Koenig B, Ricipito S, Kinne R. Chloride transport in the thick ascending limb of Henle's loop: potassium dependence and stoichiometry of the NaCl cotransport system in plasma membrane vesicles. *Pflügers Archiv*. 1983;399(3):173-9.
46. Greger R, Hampel W. A modified system for in vitro perfusion of isolated renal tubules. *Pflügers Archiv*. 1981;389(2):175-6.
47. Chipperfield AR. An effect of chloride on (Na + K) co-transport in human red blood cells. *Nature*. 1980;286(5770):281-2.
48. Eveloff J, Kinne R. Sodium-chloride transport in the medullary thick ascending limb of henle's loop: Evidence for a sodium-chloride cotransport system in plasma membrane vesicles. *The Journal of Membrane Biology*. 1983;72(3):173-81.
49. Kikeri D, Sun A, Zeidel ML, Hebert SC. Cell membranes impermeable to NH₃. *Nature*. 1989;339(6224):478-80.
50. Kinne R, Kinne-Saffran E, Schütz H, Schölermann B. Ammonium transport in medullary thick ascending limb of rabbit kidney: Involvement of the Na⁺, K⁺, Cl⁻-cotransporter. *The Journal of Membrane Biology*. 1986;94(3):279-84.
51. Good DW. Effects of potassium on ammonia transport by medullary thick ascending limb of the rat. *The Journal of Clinical Investigation*. 1987;80(5):1358-65.
52. Forbush Iii B, Lytle C, Xu JC, Payne JA, Biemesderfer D. The Na, K, C Cotransporter of Shark Rectal Gland. *Kidney and Blood Pressure Research*. 1994;17(3-4):201-4.
53. Payne JA, Forbush B, 3rd. Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(10):4544-8.
54. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, et al. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(26):17713-22.
55. Gagnon É, Forbush B, Flemmer AW, Giménez I, Caron L, Isenring P. Functional and molecular characterization of the shark renal Na-K-Cl cotransporter: novel aspects. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2002;283(5):F1046-F55.

56. Igarashi P, Vanden Heuvel GB, Payne JA, Forbush B. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1995;269(3):F405-F18.
57. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, Pietro AD, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*. 1996;13(2):183-8.
58. Delpire E, Rauchman MI, Beier DR, Hebert SC, Gullans SR. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(41):25677-83.
59. Payne JA, Xu J-C, Haas M, Lytle CY, Ward D, Forbush B. Primary Structure, Functional Expression, and Chromosomal Localization of the Bumetanide-sensitive Na-K-Cl Cotransporter in Human Colon. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(30):17977-85.
60. Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet*. 1999;22(2):192-5.
61. Mount DB, Baekgaard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DR, et al. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1999;276(3):F347-F58.
62. Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2011;301(6):F1143-F59.
63. Yang T, Huang YG, Singh I, Schnermann J, Briggs JP. Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1996;271(4):F931.
64. Vargas-Poussou R, Feldmann D, Vollmer M, Konrad M, Kelly L, van den Heuvel LPWJ, et al. Novel Molecular Variants of the Na-K-2Cl Cotransporter Gene Are Responsible for Antenatal Bartter Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;62(6):1332-40.
65. Haas M, Dunham PB, Forbush B. [³H]bumetanide binding to mouse kidney membranes: identification of corresponding membrane proteins. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1991;260(4):C791-C804.
66. Kaplan MR, Plotkin MD, Lee W-S, Xu Z-C, Lytton J, Hebert SC. Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney International*. 1996;49(1):40-7.
67. Forbush B, Palfrey HC. [³H]bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(19):11787-92.
68. Haas M, McManus TJ. Bumetanide inhibits (Na + K + 2Cl) co-transport at a chloride site. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1983;245(3):C235-C40.
69. Plata C, Meade P, Vázquez N, Hebert SC, Gamba G. Functional Properties of the Apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(13):11004-12.
70. Giménez I, Isenring P, Forbush B. Spatially Distributed Alternative Splice Variants of the Renal Na-K-Cl Cotransporter Exhibit Dramatically Different Affinities for the Transported Ions. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(11):8767-70.
71. Gagnon É, Bergeron MJ, Daigle ND, Lefoll M-H, Isenring P. Molecular Mechanisms of Cation Transport by the Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporter: STRUCTURAL INSIGHT INTO THE OPERATING CHARACTERISTICS OF THE ION TRANSPORT SITES. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(37):32555-63.

72. Giménez I, Forbush B. The Residues Determining Differences in Ion Affinities among the Alternative Splice Variants F, A, and B of the Mammalian Renal Na-K-Cl Cotransporter (NKCC2). *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(9):6540-7.
73. Tovar-Palacio C, Bobadilla NA, Cortés P, Plata C, de los Heros P, Vázquez N, et al. Ion and diuretic specificity of chimeric proteins between apical Na(+)-K(+)-2Cl(-) and Na(+)-Cl(-) cotransporters. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2004;287(3):F570-F7.
74. Greger R. Coupled transport of Na⁺ and Cl⁻ in the thick ascending limb of Henle's loop of rabbit nephron. *Scandinavian audiology Supplementum*. 1981;14 Suppl:1-15.
75. Takahashi N, Chernavvsky DR, Gomez RA, Igarashi P, Gitelman HJ, Smithies O. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(10):5434-9.
76. Takahashi N, Brooks HL, Wade JB, Liu W, Kondo Y, Ito S, et al. Posttranscriptional Compensation for Heterozygous Disruption of the Kidney-Specific NaK2Cl Cotransporter Gene. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13(3):604-10.
77. Oppermann M, Mizel D, Huang G, Li C, Deng C, Theilig F, et al. Macula Densa Control of Renin Secretion and Preglomerular Resistance in Mice with Selective Deletion of the B Isoform of the Na,K,2Cl Co-Transporter. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(8):2143-52.
78. Oppermann M, Mizel D, Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Huang Y, et al. Renal Function in Mice with Targeted Disruption of the A Isoform of the Na-K-2Cl Co-Transporter. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(2):440-8.
79. Castrop H, Schnermann J. Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2008;295(4):F859-F66.
80. Brunet GM, Gagnon E, Simard CF, Daigle ND, Caron L, Noël M, et al. Novel Insights Regarding the Operational Characteristics and Teleological Purpose of the Renal Na⁺-K⁺-Cl₂ Cotransporter (NKCC2s) Splice Variants. *The Journal of General Physiology*. 2005;126(4):325-37.
81. Schießl IM, Rosenauer A, Kattler V, Minuth WW, Oppermann M, Castrop H. Dietary salt intake modulates differential splicing of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2013;305(8):F1139-F48.
82. Haas M, Forbush B. The Na-K-Cl Cotransporters. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1998;30(2):161-72.
83. Russell JM. Sodium-Potassium-Chloride Cotransport. *Physiological Reviews*. 2000;80(1):211-76.
84. Edwards A, Castrop H, Laghmani K, Vallon V, Layton AT. Effects of NKCC2 isoform regulation on NaCl transport in thick ascending limb and macula densa: a modeling study. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2014;307(2):F137-F46.
85. Plata C, Meade P, Hall A, Welch RC, Vázquez N, Hebert SC, et al. Alternatively spliced isoform of apical Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na(+)-Cl(-)cotransporter. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2001;280(4):F574-F82.
86. Plata C, Mount DB, Rubio V, Hebert SC, Gamba G. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL II. Functional characterization and activation by cAMP. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1999;276(3):F359-F66.
87. Gerelsaikhon T, Parvin MN, Turner RJ. Biogenesis and Topology of the Secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter (NKCC1) Studied in Intact Mammalian Cells. *Biochemistry*. 2006;45(39):12060-7.
88. Paredes A, Plata C, Rivera M, Moreno E, Vázquez N, Muñoz-Clares R, et al. Activity of the renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is reduced by mutagenesis of N-glycosylation sites:

- role for protein surface charge in Cl⁻ transport. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2006;290(5):F1094-F102.
89. Vitale A, Denecke J. The Endoplasmic Reticulum—Gateway of the Secretory Pathway. *The Plant Cell*. 1999;11(4):615-28.
 90. YEAMAN C, GRINDSTAFF KK, NELSON WJ. New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiological Reviews*. 1999;79(1):73-98.
 91. Hebert DN, Molinari M. In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases. *Physiological Reviews*. 2007;87(4):1377-408.
 92. Stolz A, Wolf DH. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2010;1803(6):694-705.
 93. Guerriero CJ, Brodsky JL. The Delicate Balance Between Secreted Protein Folding and Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Human Physiology. *Physiological Reviews*. 2012;92(2):537-76.
 94. Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*. 1995;83(1):129-35.
 95. Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 1995;83(1):121-7.
 96. Ahner A, Gong X, Frizzell RA. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation: cross-talk between the ubiquitylation and SUMOylation pathways. *FEBS Journal*. 2013;280(18):4430-8.
 97. Zaarour N, Demaretz S, Defontaine N, Mordasini D, Laghmani K. A Highly Conserved Motif at the COOH Terminus Dictates Endoplasmic Reticulum Exit and Cell Surface Expression of NKCC2. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(32):21752-64.
 98. Zaarour N, Demaretz S, Defontaine N, Zhu Y, Laghmani K. Multiple Evolutionarily Conserved Di-leucine Like Motifs in the Carboxyl Terminus Control the Anterograde Trafficking of NKCC2. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(51):42642-53.
 99. Carmosino M, Giménez I, Caplan M, Forbush B. Exon Loss Accounts for Differential Sorting of Na-K-Cl Cotransporters in Polarized Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2008;19(10):4341-51.
 100. Nezu A, Parvin MN, Turner RJ. A Conserved Hydrophobic Tetrad near the C Terminus of the Secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter (NKCC1) Is Required for Its Correct Intracellular Processing. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(11):6869-76.
 101. Schekman R, Orci L. Coat Proteins and Vesicle Budding. *Science*. 1996;271(5255):1526-33.
 102. Kuehn MJ, Schekman R. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997;9(4):477-83.
 103. Aridor M, Bannykh SI, Rowe T, Balch WE. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *The Journal of Cell Biology*. 1995;131(4):875-93.
 104. Mostov KE, Verges M, Altschuler Y. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 2000;12(4):483-90.
 105. Nufer O, Guldbrandsen S, Degen M, Kappeler F, Paccaud J-P, Tani K, et al. Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *Journal of Cell Science*. 2002;115(3):619-28.
 106. Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual review of cell and developmental biology*. 2004;20:87-123.
 107. Ortiz PA. cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2006;290(3):F608-F16.

108. Caceres PS, Mendez M, Ortiz PA. Vesicle-associated Membrane Protein 2 (VAMP2) but Not VAMP3 Mediates cAMP-stimulated Trafficking of the Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Co-transporter NKCC2 in Thick Ascending Limbs. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(34):23951-62.
109. Caceres PS, Mendez M, Haque MZ, Ortiz PA. Vesicle-associated Membrane Protein 3 (VAMP3) Mediates Constitutive Trafficking of the Renal Co-transporter NKCC2 in Thick Ascending Limbs: ROLE IN RENAL FUNCTION AND BLOOD PRESSURE. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(42):22063-73.
110. Benziane B, Demaretz S, Defontaine N, Zaarour N, Cheval L, Bourgeois S, et al. NKCC2 Surface Expression in Mammalian Cells: DOWN-REGULATION BY NOVEL INTERACTION WITH ALDOLASE B. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(46):33817-30.
111. Zaarour N, Defontaine N, Demaretz S, Azroyan A, Cheval L, Laghmani K. Secretory Carrier Membrane Protein 2 Regulates Exocytic Insertion of NKCC2 into the Cell Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(11):9489-502.
112. Richardson C, Sakamoto K, de los Heros P, Deak M, Campbell DG, Prescott AR, et al. Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *Journal of Cell Science*. 2011;124(5):789-800.
113. Fraser Scott A, Gimenez I, Cook N, Jennings I, Katerelos M, Katsis F, et al. Regulation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter NKCC2 by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Biochemical Journal*. 2007;405(1):85-93.
114. Carmosino M, Rizzo F, Procino G, Basco D, Valenti G, Forbush B, et al. MAL/VIP17, a New Player in the Regulation of NKCC2 in the Kidney. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;21(22):3985-97.
115. Carmosino M, Rizzo F, Procino G, Zolla L, Timperio AM, Basco D, et al. Identification of moesin as NKCC2-interacting protein and analysis of its functional role in the NKCC2 apical trafficking. *Biology of the Cell*. 2012;104(11):658-76.
116. Borschewski A, Himmerkus N, Boldt C, Blankenstein KI, McCormick JA, Lazelle R, et al. Calcineurin and Sorting-Related Receptor with A-Type Repeats Interact to Regulate the Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016;27(1):107-19.
117. Giménez I, Forbush B. Short-term Stimulation of the Renal Na-K-Cl Cotransporter (NKCC2) by Vasopressin Involves Phosphorylation and Membrane Translocation of the Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(29):26946-51.
118. Meade P, Hoover RS, Plata C, Vázquez N, Bobadilla NA, Gamba G, et al. cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2003;284(6):F1145-F54.
119. Ares GR, Ortiz PA. Direct renal effects of a fructose-enriched diet: interaction with high salt intake. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2015;309(9):R1078-R81.
120. Burch HB, Choi S, Dence CN, Alvey TR, Cole BR, Lowry OH. Metabolic effects of large fructose loads in different parts of the rat nephron. *Journal of Biological Chemistry*. 1980;255(17):8239-44.
121. Castle JD, Guo Z, Liu L. Function of the t-SNARE SNAP-23 and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) in exocytosis in mast cells. *Molecular Immunology*. 2002;38(16-18):1337-40.
122. Cheong KH, Zacchetti D, Schneeberger EE, Simons K. VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(11):6241-8.

123. Puertollano R, Martín-Belmonte F, Millán J, del Carmen de Marco M, Albar JP, Kremer L, et al. The MAL Proteolipid Is Necessary for Normal Apical Transport and Accurate Sorting of the Influenza Virus Hemagglutinin in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *The Journal of Cell Biology*. 1999;145(1):141-51.
124. Piechotta K, Lu J, Delpire E. Cation Chloride Cotransporters Interact with the Stress-related Kinases Ste20-related Proline-Alanine-rich Kinase (SPAK) and Oxidative Stress Response 1 (OSR1). *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(52):50812-9.
125. Rinehart J, Kahle KT, de los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, et al. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(46):16777-82.
126. Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, MacGregor GG, Wilson FH, Canessa CM, et al. WNK3, a kinase related to genes mutated in hereditary hypertension with hyperkalaemia, regulates the K⁺ channel ROMK1 (Kir1.1). *The Journal of Physiology*. 2006;571(2):275-86.
127. O'Reilly M, Marshall E, MacGillivray T, Mittal M, Xue W, Kenyon CJ, et al. Dietary Electrolyte-Driven Responses in the Renal WNK Kinase Pathway In Vivo. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(9):2402-13.
128. Liu Z, Xie J, Wu T, Truong T, Auchus RJ, Huang C-L. Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models. *Human Molecular Genetics*. 2011;20(5):855-66.
129. Cheng C-J, Truong T, Baum M, Huang C-L. Kidney-specific WNK1 inhibits sodium reabsorption in the cortical thick ascending limb. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2012;303(5):F667-F73.
130. Ponce-Coria J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de los Heros P, et al. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(24):8458-63.
131. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, et al. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters *in vivo*. *Biology Open*. 2012;1(2):120-7.
132. Mederle K, Mutig K, Paliege A, Carota I, Bachmann S, Castrop H, et al. Loss of WNK3 is compensated for by the WNK1/SPAK axis in the kidney of the mouse. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2013;304(9):F1198-F209.
133. Bazúa-Valenti S, Castañeda-Bueno M, Gamba G. Physiological role of SLC12 family members in the kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2016;311(1):F131-F44.
134. Reiche J, Theilig F, Rafiqi FH, Carlo A-S, Militz D, Mutig K, et al. SORLA/SORL1 Functionally Interacts with SPAK To Control Renal Activation of Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporter 2. *Molecular and Cellular Biology*. 2010;30(12):3027-37.
135. Trudu M, Janas S, Lanzani C, Debaix H, Schaeffer C, Ikehata M, et al. Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression. *Nat Med*. 2013;19(12):1655-60.
136. Gross I, Siedner-Weintraub Y, Simckes A, Gillis D. Antenatal Bartter syndrome presenting as hyperparathyroidism with hypercalcemia and hypercalciuria: a case report and review. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2015;28(7-8):943-6.
137. Li D, Tian L, Hou C, Kim CE, Hakonarson H, Levine MA. Association of Mutations in SLC12A1 Encoding the NKCC2 Cotransporter With Neonatal Primary Hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(5):2196-200.
138. Wongsangsak S, Vidmar AP, Addala A, Kamil ES, Sequeira P, Fass B, et al. A novel SLC12A1 gene mutation associated with hyperparathyroidism, hypercalcemia, nephrogenic diabetes insipidus, and nephrocalcinosis in four patients. *Bone*. 2017;97:121-5.

139. Seyberth HW, Weber S, Kömhoff M. Bartter's and Gitelman's syndrome. *Current Opinion in Pediatrics*. 2016; Publish Ahead of Print.
140. Bartter FC, Pronove P, Gill JR, MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. *The American Journal of Medicine*. 1962;33(6):811-28.
141. Gitelman H, Graham J, Welt L. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1966;79:221-35.
142. Fanconi A, Schachenmann G, Nüssli R, Prader A. Chronic hypokalaemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism ("Bartter's syndrome"), and hypercalciuria. Report of two cases with emphasis on natural history and on catch-up growth during treatment. *Helvetica paediatrica acta*. 1971;26(2):144.
143. Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kühl PG, Mehls O, Schärer K. Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: A hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *The Journal of Pediatrics*. 1985;107(5):694-701.
144. McCredie DA, Rotenberg E, Williams AL. Hypercalciuria in potassium-losing nephropathy: a variant of Bartter's syndrome. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 1974;10(5):286-95.
145. Clive DM. Bartter's syndrome: The unsolved puzzle. *American Journal of Kidney Diseases*. 1995;25(6):813-23.
146. Károlyi L, Koch MC, Grzeschik K-H, Seyberth HW. The molecular genetic approach to "Bartter's syndrome". *Journal of Molecular Medicine*. 1998;76(5):317-25.
147. Rodriguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M. Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatric Nephrology*. 1987;1(3):465-72.
148. Gill JR, Bartter FC. Evidence for a prostaglandin-independent defect in chloride reabsorption in the loop of Henle as a proximal cause of Bartter's syndrome. *The American Journal of Medicine*. 1978;65(5):766-72.
149. Bettinelli A, Bianchetti MG, Girardin E, Caringella A, Cecconi M, Appiani AC, et al. Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *The Journal of Pediatrics*. 1992;120(1):38-43.
150. Greger R, Schlatter E. Cellular mechanism of the action of loop diuretics on the thick ascending limb of Henle's loop. *Klinische Wochenschrift*. 1983;61(20):1019-27.
151. Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson Bia M, Ellison D, Karet FE, Morey Molina A, et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*. 1996;12(1):24-30.
152. Kurtz CL, Károlyi L, Seyberth HW, Koch MC, Vargas R, Feldmann D, et al. A common NKCC2 mutation in Costa Rican Bartter's syndrome patients: evidence for a founder effect. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1997;8(11):1706-11.
153. Pressler CA, Heinzinger J, Jeck N, Waldegger P, Pechmann U, Reinalter S, et al. Late-Onset Manifestation of Antenatal Bartter Syndrome as a Result of Residual Function of the Mutated Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Co-Transporter. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(8):2136-42.
154. Adachi M, Asakura Y, Sato Y, Tajima T, Nakajima T, Yamamoto T, et al. Novel SLC12A1 (NKCC2) Mutations in Two Families with Bartter Syndrome Type 1. *Endocrine Journal*. 2007;54(6):1003-7.
155. Colussi G, Bettinelli A, Tedeschi S, De Ferrari ME, Syrén ML, Borsa N, et al. A Thiazide Test for the Diagnosis of Renal Tubular Hypokalemic Disorders. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;2(3):454-60.

156. Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, et al. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet.* 2008;40(5):592-9.
157. Brochard K, Boyer O, Blanchard A, Loirat C, Niaudet P, Macher M-A, et al. Phenotype–genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009;24(5):1455-64.
158. Yamazaki H, Nozu K, Narita I, Nagata M, Nozu Y, Fu XJ, et al. Atypical phenotype of type I Bartter syndrome accompanied by focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatric Nephrology.* 2009;24(2):415-8.
159. Lee EH, Heo JS, Lee HK, Han KH, Kang HG, Ha IS, et al. A case of Bartter syndrome type I with atypical presentations. *Korean J Pediatr.* 2010;53(8):809-13.
160. Nozu K, Iijima K, Kanda K, Nakanishi K, Yoshikawa N, Satomura K, et al. The Pharmacological Characteristics of Molecular-Based Inherited Salt-Losing Tubulopathies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010;95(12):E511-E8.
161. Puricelli E, Bettinelli A, Borsa N, Sironi F, Mattiello C, Tammaro F, et al. Long-term follow-up of patients with Bartter syndrome type I and IIE. Puricelli et al. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2010;25(9):2976-81.
162. Urbanova M, Reiterova J, Stekrova J, Lnenicka P, Rysava R. DNA analysis of renal electrolyte transporter genes among patients suffering from Bartter and Gitelman syndromes: summary of mutation screening. *Folia biologica.* 2011;57(2):65-73.
163. Nozu K, Iijima K, Kawai K, Nozu Y, Nishida A, Takeshima Y, et al. In vivo and in vitro splicing assay of SLC12A1 in an antenatal salt-losing tubulopathy patient with an intronic mutation. *Human Genetics.* 2009;126(4):533.
164. Fukuyama S, Okudaira S, Yamazato S, Yamazato M, Ohta T. Analysis of renal tubular electrolyte transporter genes in seven patients with hypokalemic metabolic alkalosis. *Kidney International.* 2003;64(3):808-16.
165. Sun M, Ning J, Xu W, Zhang H, Zhao K, Li W, et al. Genetic heterogeneity in patients with Bartter syndrome type 1. *Molecular medicine reports.* 2017.
166. Starremans PGJF, Kersten FFJ, Knoers NVAM, van den Heuvel LPWJ, Bindels RJM. Mutations in the Human Na-K-2Cl Cotransporter (NKCC2) Identified in Bartter Syndrome Type I Consistently Result in Nonfunctional Transporters. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2003;14(6):1419-26.
167. Fischer H, Fukuda N, Barbry P, Illek B, Sartori C, Matthay MA. Partial restoration of defective chloride conductance in $\Delta F508$ CF mice by trimethylamine oxide. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2001;281(1):L52-L7.
168. Hageman J, Kampinga HH. Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. *Cell stress & chaperones.* 2009;14(1):1-21.
169. Needham PG, Mikoluk K, Dhakarwal P, Khadem S, Snyder AC, Subramanya AR, et al. The Thiazide-sensitive NaCl Cotransporter Is Targeted for Chaperone-dependent Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(51):43611-21.
170. Bae J-S, Koo N-Y, Namkoong E, Davies AJ, Choi S-K, Shin Y, et al. Chaperone Stress 70 Protein (STCH) Binds and Regulates Two Acid/Base Transporters NBCe1-B and NHE1. *Journal of Biological Chemistry.* 2013;288(9):6295-305.
171. Kishor A, Tandukar B, Ly YV, Toth EA, Suarez Y, Brewer G, et al. Hsp70 Is a Novel Posttranscriptional Regulator of Gene Expression That Binds and Stabilizes Selected mRNAs Containing AU-Rich Elements. *Molecular and Cellular Biology.* 2013;33(1):71-84.
172. Litovchick L, Friedmann E, Shaltiel S. A Selective Interaction between OS-9 and the Carboxyl-terminal Tail of Meprin β . *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(37):34413-23.

173. Friedmann E, Salzberg Y, Weinberger A, Shaltiel S, Gerst JE. YOS9, the Putative Yeast Homolog of a Gene Amplified in Osteosarcomas, Is Involved in the Endoplasmic Reticulum (ER)-Golgi Transport of GPI-anchored Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(38):35274-81.
174. Bernasconi R, Pertel T, Luban J, Molinari M. A Dual Task for the Xbp1-responsive OS-9 Variants in the Mammalian Endoplasmic Reticulum: INHIBITING SECRETION OF MISFOLDED PROTEIN CONFORMERS AND ENHANCING THEIR DISPOSAL. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(24):16446-54.
175. Hosokawa N, Kamiya Y, Kamiya D, Kato K, Nagata K. Human OS-9, a Lectin Required for Glycoprotein Endoplasmic Reticulum-associated Degradation, Recognizes Mannose-trimmed N-Glycans. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(25):17061-8.
176. Castrop H, Schiefl IM. Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2). *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2014;307(9):F991.
177. Ecelbarger CA, Yu S, Lee AJ, Weinstein LS, Knepper MA. Decreased renal Na-K-2Cl cotransporter abundance in mice with heterozygous disruption of the $Gs\alpha$ gene. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1999;277(2):F235-F44.
178. Rieg T, Tang T, Uchida S, Hammond HK, Fenton RA, Vallon V. Adenylyl Cyclase 6 Enhances NKCC2 Expression and Mediates Vasopressin-Induced Phosphorylation of NKCC2 and NCC. *The American Journal of Pathology*. 2013;182(1):96-106.
179. Cheetham ME, Caplan AJ. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell stress & chaperones*. 1998;3(1):28-36.
180. Ohtsuka K, Hata M. Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. *Cell stress & chaperones*. 2000;5(2):98-112.
181. Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40--a review. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2000;16(3):231-45.
182. Fink AL. Chaperone-Mediated Protein Folding. *Physiological Reviews*. 1999;79(2):425-49.
183. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*. 2009;14(1):105-11.
184. Ruggieri A, Saredi S, Zanotti S, Pasanisi MB, Maggi L, Mora M. DNAJB6 Myopathies: Focused Review on an Emerging and Expanding Group of Myopathies. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2016;3(63).
185. Hageman J, Rujano MA, van Waarde MAWH, Kakkar V, Dirks RP, Govorukhina N, et al. A DNAJB Chaperone Subfamily with HDAC-Dependent Activities Suppresses Toxic Protein Aggregation. *Molecular Cell*. 2010;37(3):355-69.
186. Choo-Kang LR, Zeitlin PL. Induction of HSP70 promotes $\Delta F508$ CFTR trafficking. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001;281(1):L58-L68.
187. FARINHA CM, NOGUEIRA P, MENDES F, PENQUE D, AMARAL MD. The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochemical Journal*. 2002;366(3):797-806.
188. Qi M, Zhang J, Zeng W, Chen X. DNAJB1 stabilizes MDM2 and contributes to cancer cell proliferation in a p53-dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2014;1839(1):62-9.

189. Donnelly BF, Needham PG, Snyder AC, Roy A, Khadem S, Brodsky JL, et al. Hsp70 and Hsp90 Multichaperone Complexes Sequentially Regulate Thiazide-sensitive Cotransporter Endoplasmic Reticulum-associated Degradation and Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(18):13124-35.
190. Michels AA, Kanon B, Bensaude O, Kampinga HH. Heat Shock Protein (Hsp) 40 Mutants Inhibit Hsp70 in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(51):36757-63.
191. Vaishali K, Louis CBP, Harm HK. DNAJ Proteins and Protein Aggregation Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2012;12(22):2479-90.
192. Otterson GA, Flynn GC, Kratzke RA, Coxon A, Johnston PG, Kaye FJ. Stch encodes the 'ATPase core' of a microsomal stress 70 protein. *The EMBO journal*. 1994;13(5):1216-25.
193. Wang AM, Miyata Y, Klinedinst S, Peng H-M, Chua JP, Komiyama T, et al. Activation of Hsp70 reduces neurotoxicity by promoting polyglutamine protein degradation. *Nat Chem Biol*. 2013;9(2):112-8.
194. Abisambra J, Jinwal UK, Miyata Y, Rogers J, Blair L, Li X, et al. Allosteric Heat Shock Protein 70 Inhibitors Rapidly Rescue Synaptic Plasticity Deficits by Reducing Aberrant Tau. *Biological Psychiatry*. 2013;74(5):367-74.
195. Seo JH, Park JH, Lee EJ, Vo TT, Choi H, Kim JY, et al. ARD1-mediated Hsp70 acetylation balances stress-induced protein refolding and degradation. *Nature communications*. 2016;7:12882.
196. Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarzab M, Lisowska KM, et al. Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Molecular Biology*. 2011;12(1):27.
197. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(3):181-91.
198. Sitia R, Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*. 2003;426(6968):891-4.
199. Vincenz-Donnelly L, Hipp MS. The Endoplasmic Reticulum: A Hub of Protein Quality Control in Health and Disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017.
200. Ohtsuka K, Masuda A, Nakai A, Nagata K. A novel 40-kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;166(2):642-7.
201. Hata M, Okumura K, Seto M, Ohtsuka K. Genomic Cloning of a Human Heat Shock Protein 40 (Hsp40) Gene (HSPF1) and Its Chromosomal Localization to 19p13.2. *Genomics*. 1996;38(3):446-9.
202. Hageman J, van Waarde Maria AWH, Zylicz A, Walerych D, Kampinga Harm H. The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. *Biochemical Journal*. 2011;435(1):127-42.
203. Fan C-Y, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell stress & chaperones*. 2003;8(4):309-16.
204. Michels AA, Kanon B, Konings AWT, Ohtsuka K, Bensaude O, Kampinga HH. Hsp70 and Hsp40 Chaperone Activities in the Cytoplasm and the Nucleus of Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(52):33283-9.
205. Rives M-L, Javitch JA, Wickenden AD. Potentiating SLC transporter activity: Emerging drug discovery opportunities. *Biochemical Pharmacology*. 2017.
206. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PDJ, Burton B, Stack JH, Straley KS, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(46):18843-8.

207. Beerepoot P, Lam VM, Salahpour A. Pharmacological Chaperones of the Dopamine Transporter Rescue Dopamine Transporter Deficiency Syndrome Mutations in Heterologous Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2016.
208. Arkin Michelle R, Tang Y, Wells James A. Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality. *Chemistry & Biology*. 2014;21(9):1102-14.
209. Maher MP, Wu N, Ravula S, Ameriks MK, Savall BM, Liu C, et al. Discovery and Characterization of AMPA Receptor Modulators Selective for TARP- γ 8. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;357(2):394-414.
210. Kim H, Oh KH. Protein Network Interacting with BK Channels. *International Review of Neurobiology*. 2016;128:127-61.
211. Stoilova-McPhie S, Ali S, Laezza F. Protein-Protein Interactions as New Targets for Ion Channel Drug Discovery. *Austin journal of pharmacology and therapeutics*. 2013;1(2):5.
212. Klemm EJ, Spooner E, Ploegh HL. Dual Role of Ancient Ubiquitous Protein 1 (AUP1) in Lipid Droplet Accumulation and Endoplasmic Reticulum (ER) Protein Quality Control. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(43):37602-14.
213. Hosokawa N, You Z, Tremblay LO, Nagata K, Herscovics A. Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong α 1-antitrypsin by Golgi α 1,2-mannosidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;362(3):626-32.