

De la délétion du premier intron de WNK1 à l'hypertension : caractérisation d'un modèle murin d'Hypertension Hyperkaliémique Familiale, une forme monogénique d'hypertension

Emmanuelle Vidal-Petiot

▶ **To cite this version:**

Emmanuelle Vidal-Petiot. De la délétion du premier intron de WNK1 à l'hypertension : caractérisation d'un modèle murin d'Hypertension Hyperkaliémique Familiale, une forme monogénique d'hypertension. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66653 . tel-00839472

HAL Id: tel-00839472

https://theses.hal.science/tel-00839472

Submitted on 28 Jun 2013

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.

UNIVERSITE PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE

UFR DE BIOLOGIE

ANNEE 2012 N° attribué par la bibliothèque

THESE DE DOCTORAT

présentée par

Emmanuelle VIDAL-PETIOT

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI
Ecole Doctorale : Complexité du Vivant
Thèse dirigée par le Pr Xavier Jeunemaitre

De la délétion du premier intron de WNK1 à l'hypertension : caractérisation d'un modèle murin d'Hypertension Hyperkaliémique Familiale, une forme monogénique d'hypertension

Soutenue le 17 septembre 2012

Devant le jury composé de :

Pr Jean-Claude DUSSAULE	Président du jury
Pr Olivier DEVUYST	Rapporteur
Pr Pascal HOUILLIER	Rapporteur
Dr Claude JULIEN	Examinateur
Dr Pierre-Louis THARAUX	Examinateur
Pr Xavier JEUNEMAITRE	Directeur de thèse
Dr Juliette HADCHOUEL	Membre invité

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout exprimer ma gratitude aux membres du jury. Pour une étudiante qui a toujours rêvé de devenir physiologiste, ce jury d'exception est une immense fierté. J'espère me montrer à la hauteur de cet honneur aussi bien dans ce travail que dans mon parcours futur.

Je remercie très sincèrement le Pr Jean-Claude Dussaule de présider le jury de ma thèse.

Je remercie également les Pr Pascal Houiller et Olivier Devuyst qui ont accepté avec une grande gentillesse d'en être rapporteurs, malgré des emplois du temps que je sais déjà très chargés. La présence de Pascal Houillier dans le jury a une valeur très particulière puisque c'est en entendant, jeune interne, mes chefs dire devant les situations métaboliques trop complexes, « il faut appeler Pascal Houillier » qu'est née une fascination qui a contribué à mon orientation vers la physiologie rénale.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance aux examinateurs, Dr Pierre-Louis Tharaux, chercheur de génie qui fut aussi mon tuteur, et Dr Claude Julien. C'est avec émotion que je remercie le Dr Claude Julien pour lequel j'ai un profond respect et qui m'a donné le goût de la recherche. Tu avais encadré, avec Christian Barrès, mon DEA il y a maintenant bien longtemps, autour d'une superbe thématique qui associait régulation de la pression artérielle et modélisations mathématiques. Même si j'ai décidé d'entreprendre des études de médecine, j'ai réfléchi d'emblée à mon futur projet de thèse, et en sachant que je te demanderais de participer au jury.

Je remercie le Pr Xavier Jeunemaitre, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et confié un projet de physiologie intégrée qui correspondait exactement à celui que je souhaitais. Grâce à vous j'ai travaillé dans un environnement exceptionnel sur un sujet qui me tenait à cœur. Merci aussi, malgré vos responsabilités et fonctions, de votre simplicité et de votre disponibilité.

J'ai eu une grande chance d'être encadrée par le Dr Juliette Hadchouel, chercheuse passionnée. Tu sais trouver le juste équilibre en laissant à tes doctorants assez de liberté pour mieux progresser, tout en étant toujours disponible. Tu nous apportes ta compétence « à la paillasse » puisque tu es à nos côtés tous les jours, voire même nuit et week-end, mais j'ai aussi apprécié les nombreuses conversations scientifiques que tu accordes sans compter ton temps et en respectant l'étudiant. Essayer de donner la réplique à une encadrante équipée d'un processeur dual core m'a stimulée. J'arrive enfin parfois à argumenter avec un

minimum de pertinence dans nos conversations et c'est finalement le meilleur signe de tout le travail accompli pendant mon doctorat.

Mes pensées affectueuses à l'ensemble du laboratoire de Physiologie et Physiopathologie rénale du Centre de Recherche des Cordeliers, qui m'a accueillie avec beaucoup de bienveillance pour une partie de ce travail, et en particulier aux Dr Alain Doucet et Lydie Cheval. Les journées à votre contact ont toujours été un réel plaisir et m'ont beaucoup appris. J'espère trouver rapidement un motif qui me conduise à revenir vous observer séparer les segments néphroniques et à bénéficier de votre expertise scientifique.

Et bien sûr, un grand merci à l'équipe 3 de l'INSERM U970, qui est, il faut bien le dire, une concentration rare de têtes bien faites avec le sens de la convivialité et de l'humour (incontestablement Xavier Jeunemaitre sait s'entourer !). A Catherine, pout tout ce que tu as fait pour moi, pour ton intelligence, à Véronique, micro-chirurgien de talent, à Elisabeth, qui murmure à l'oreille des souris. Un clin d'œil à Judith, Nelly, Charlotte, Laurence pour tous ces moments inoubliables. Et un merci tout particulier au labo 175 et aux collègues qui m'ont accompagnée ces quelques très heureuses années: Renette, Hélène, Shengnan, Sonia, Wei-Wei…Avec une dédicace affectueuse à celles qui m'ont tout appris: Christelle, Emilie, Julie, que je suis fière de compter parmi mes amies.

Je dois aussi beaucoup à tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce projet. Au Dr Martin Flamant, qui m'apprend tellement chaque jour en physiologie, en passant de l'homme à la souris et réciproquement, le tout agrémenté de quelques logarithmes et autres problématiques statistiques: autant dire que j'ai un job de rêve grâce à toi. Merci aussi de ta compréhension et de ton aide face au temps nécessaire à la finition de ce travail pendant cette année de clinicat.

A mes parents, qui me soutiennent inlassablement depuis le début de ces 16 longues études.

Enfin à Xavier à qui je dois tout. Cette thèse tu en es le premier co-auteur : complice de toutes mes aventures quotidiennes, de mes excitations, de mes doutes, soutien de tous les instants. Tu as même été jusqu'à m'accompagner nourrir des souris dont tu as aussi peur que moi en pleine nuit. Docteur comme on en compte peu, qui passe ses journées face à des cœurs défaillants et fait battre le mien depuis 5 ans. Papa héroïque aussi, qui prend sans hésiter une fille sous chaque bras pour laisser maman travailler. Léa, Romane, dès que vous aurez fini de lire ce manuscrit, papa et maman vous raconteront (presque) tout ce qui n'y figure pas.

RESUME

Des mutations du gène codant la serine-thréonine kinase WNK1 sont responsables de l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (HHF), une forme rare d'hypertension associée à une hyperkaliémie et une acidose métabolique hyperchlorémique. *WNK1* donne naissance à une isoforme ubiquitaire, L-WNK1, et à une isoforme dépourvue de domaine kinase fonctionnel et exprimée exclusivement dans le néphron, KS-WNK1. Plusieurs autres isoformes sont générées par un mécanisme d'épissage alternatif mais n'ont jamais été étudiées en détail.

Nous avons tout d'abord établi une description exhaustive de l'ensemble des isoformes de *WNK1* et quantifié leurs niveaux d'expression respectifs dans un panel de tissus humains et murins ainsi que dans les différents segments du néphron. Nous avons ainsi montré que 9 exons de *WNK1* sont soumis à épissage alternatif, ce de manière tissu-spécifique.

Dans un second temps, afin de comprendre la physiopathologie de l'HHF, et de ce fait le rôle de WNK1 dans la régulation de la pression artérielle et de l'homéostasie ionique, nous avons généré des souris $WNK1^{+/FHHt}$, porteuses d'une délétion du premier intron de *WNK1*, donc de la mutation HHF humaine. Les souris ont une pression artérielle augmentée, une hyperkaliémie et une acidose métabolique hyperchlorémique. Nous avons montré que ce phénotype provient d'une activation du co-transporteur sodium-chlore NCC secondaire à la surexpression de L-WNK1 dans le néphron distal.

En conclusion, ce travail a permis d'établir une description détaillée de toutes les isoformes de *WNK1* et de leur profil d'expression et de mieux comprendre la physiopathologie de l'HHF par mutation de *WNK1*.

Mots clés : WNK1, épissage alternatif, hypertension, NCC

ABSTRACT

Mutations in the gene encoding the serine-threonine kinase WNK1 are responsible for Familial Hyperkalemic Hypertension (FHHt), a rare form of hypertension associated with hyperkaliemia and hyperchloremic metabolic acidosis. *WNK1* gives rise to a ubiquitous isoform, L-WNK1, and a kinase-deficient isoform expressed exclusively in the nephron, KS-WNK1. Several other isoforms are generated through alternative splicing although this has never been studied in detail.

We first established an exhaustive description of all *WNK1* isoforms and quantified their relative level of expression in a panel of human and mouse tissues and in mouse nephron segments. We thus showed that 9 exons of *WNK1* are alternatively spliced in a tissue-specific manner.

In a second part of the work, in order to elucidate the mechanisms underlying FHHt pathogenesis and thereby the role of WNK1 in ion homeostasis and blood pressure, we generated *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice harbouring a deletion of *WNK1* first intron, i.e. the human FFHt mutation. These mice display increased blood pressure, hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis. We demonstrated that this phenotype results from an activation of the sodium-chloride co-transporteur NCC induced by the overexpression of L-WNK1 in the distal nephron.

In conclusion, this work provided a detailed description of all *WNK1* isoforms and their pattern of expression and allowed a better understanding of the pathophysiology of *WNK1*-related FHHt.

Key words: WNK1, alternative splicing, hypertension, NCC

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE : DE L'HYPERTENSION HYPERKALIEMIQUE FAMILIALE AUX KINASES WNK, DECOUVERTE DE NOUVEAUX REGULATEURS DE LA PRESSION ARTERIELLE 12

INTRODUCTION 13

I. DE L'HYPERTENSION HYPERKALIEMIQUE FAMILIALE AUX WNKS 14

1. Historique 14

2. L'HHF est liée à des mutations des kinases WNK 16

3. Description phénotypique des patients 19

4. Découverte récente de nouvelles mutations HHF 21

II. WNK : UNE NOUVELLE FAMILLE DE SERINE-THREONINE KINASES 22

1. Un domaine catalytique unique qui explique leur nom 22

2. Autres domaines protéiques 24

a) Domaines régulateurs de l'activité kinase 24

b) Les autres domaines de la protéine WNK1 24

3. Analyse génomique : WNK1 et ses transcrits 26

a) Région 5' non traduite 27

b) Région 3' non traduite 28

c) Les variants d'épissage de WNK1 28

4. Spécificités des autres WNKs 33

a) WNK2 33

b) WNK3 33

c) WNK4 34

5. Profil d'expression des kinases WNK 35

a) WNK1 35

b) WNK4 37

c) WNK2 et WNK3 38

III. ROLES ET MECANISMES D'ACTION DES WNKS 39

1. Transports ioniques dans le néphron distal : études in vitro 39

a) Le néphron distal sensible à l'aldostérone ; les cibles théoriques 39
b) Les effets montrés *in vitro* 44
2. Apport des modèles animaux 59
a) L-WNK1 59
b) KS-WNK1 60
c) WNK4 61
d) SPAK/OSR1 64
3. Régulation des kinases WNK 69
a) Osmolarité 69
b) Teneur en sodium et en potassium dans l'alimentation 70
c) Aldostérone 70
d) Angiotensine II 73
e) Insuline 75
f) Activité sympathique et WNK4 76
4. Peut-on expliquer l'HHF à ce jour ? 76
a) Physiopathologie de l'HHF par mutations de WNK1 76
b) Physiopathologie de l'HHF par mutations de WNK4 78
c) Physiopathologie de l'HHF : l'activation de NCC est-elle suffisante 78
d) Physiopathologie de l'HHF : comprendre l'hyperkaliémie 79
IV. AU-DELA DE L'HHF : APPORT DES WNKS EN PHYSIOPATHOLOGIE RENALE 81
1. WNKs et pression artérielle 81
a) Régulation à long terme de la pression artérielle 81
b) HTA et apports alimentaires en sodium et potassium 82
c) WNKs et HTA essentielle 83
2. Le paradoxe de l'aldostérone 86
3. WNKs et inhibiteurs de calcineurine 89
CONCLUSION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 90
PREMIERE PARTIE : UN EPISSAGE ALTERNATIF TISSU-SPECIFIQUE GENERE DE MULTIPLES ISOFORMES DE *WNK1* 92
I. INTRODUCTION 93
1. Les isoformes de WNK1 : état des connaissances 93

2. Les rôles extra-rénaux des kinases WNK 93

a) WNK1 et système cardiovasculaire 94

b) Prolifération, migration, différentiation cellulaire 95

c) Rôle neurologique 96

3. Objectifs de l'étude 97

4. Résumé de l'article 98

a) Les exons alternatifs de *WNK1* 98

b) Méthodologie 99

c) Profil d'expression des isoformes de WNK1 100

II. PREMIER ARTICLE 101

III. CONCLUSION ET NOUVEAUX RESULTATS 120

1. Conclusion 120

2. Perspectives et résultats récents 121

DEUXIEME PARTIE : GENERATION ET CARACTERISATION D'UN MODELE MURIN D'HYPERTENSION HYPERKALIEMIQUE FAMILIALE PAR DELETION DU PREMIER INTRON DE *WNK1* 123

I. INTRODUCTION 124

3. Génération du modèle murin 124

4. Analyse phénotypique des souris $WNK1^{+/FHHt}$ 127

II. DEUXIEME ARTICLE 128

III. NOUVEAUX RESULTATS ET PERSPECTIVES 152

1. Voie d'activation de NCC. 152

2. Comprendre l'hypercalciurie des souris $WNK1^{+/FHHt}$ 153

a) Transport rénal du calcium : brefs rappels 154

b) HHF, kinases WNK et métabolisme calcique 156

c) Métabolisme calcique chez les souris $WNK1^{+/FHHt}$ 159

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 166

ANNEXES : AUTRES PUBLICATIONS 187

Liste des abbréviations:

ADSN: néphron distal sensible à l'aldostérone

ATP: adénosine triphosphate

BKCa: Ca^{2+}-dependent K^+ channel

BAC: chromosome artificiel de bactérie

CCD: canal collecteur cortical

CNT: tubule connecteur

CUL3: cullin 3

cTAL: branche ascendante large corticale

DCT: tubule contourné distal

EGF: Endothelial Growth Factor

ENaC: canal sodium epithelial

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1 and 2

EST: expressed sequence tag

GABA: gamma aminobutyric acid

HEK: human embryonic kidney

HHF: hypertension hyperkaliémique familiale

HSANII: hereditary sensory and autonomic neuropathy type II

HSN2: hereditary sensory neuropathy type 2

HTA: hypertension artérielle

JNK1-3: c-jun N-terminal kinases

KCC: co-transporteur potassium-chlore

KIR5.1: inwardly rectifying K^+ channel

KLHL3: kelch-like 3

KS-WNK1: kidney-specific WNK1

L-WNK1: long WNK1

MBP: myelin basic protein

MAP kinase : mitogen activated protein kinase

MDCK: madin-darby canine kidney

NCC: co-transporteur sodium-chlore

NCX1: Na^{+}/Ca^{2+} exchanger

NDCBE: sodium-driven chloride/bicarbonate exchanger

Nedd4-2: neural precursor cell-expressed developmentally downregulated protein4-2

NKCC1 ou 2 : co-transporteur Na, K, 2Cl de type 1 ou 2

OSR1: oxidative stress-responsive kinase-1

OMIM: online mendelian inheritance in man

PA: pression artérielle

PHAII: pseudohypoaldostéronisme de type II

PI3-K: phosphoinositide 3-kinase

PKB: protein kinase B

ROMK: renal outer medullary potassium channel

SGK1: serum and glucocorticoid induced kinase 1

SH3: Src-homology 3

SNP: single nucleotide polymorphism

SPAK: sterile 20/SPS21-related proline/alanine-rich kinase

STRAD: STE20-related adaptor

TRP: transient receptor potential

TRPV5: transient receptor potential vanilloid 5 Ca^{2+} channel

UTR: untranslated region

WNK: With No lysine (K)

Introduction Générale : de l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale aux kinases WNK, découverte de nouveaux régulateurs de la pression artérielle

Introduction

L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie complexe soumise à des facteurs génétiques et environnementaux. Une stratégie classiquement utilisée pour décrypter les mécanismes de régulation de la pression artérielle consiste à étudier des formes monogéniques d'HTA humaine. L'analyse de familles atteintes du syndrome de Gordon s'est ainsi révélée particulièrement intéressante, puisqu'elle a permis d'identifier de nouveaux régulateurs insoupçonnés de la pression artérielle, les sérine-thréonine kinases WNK (With No lysine (K)).

Le syndrome de Gordon, aussi appelé Hypertension Hyperkaliémique Familiale (HHF) ou PseudoHypoAldostéronisme de type 2 (PHA2) est une forme rare d'hypertension (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database entry 145260). Le mode de transmission est autosomique dominant dans la grande majorité des cas [1]. Ce syndrome a la particularité d'associer à l'hypertension une hyperkaliémie et une acidose métabolique hyperchlorémique [2]. Les patients ont une fonction rénale normale et une sensibilité caractéristique aux diurétiques thiazidiques. Le taux de rénine est bas tandis que l'aldostéronémie est plus variable, influencée dans des sens opposés par la rénine et l'hyperkaliémie [3]. L'hyperkaliémie précède en général l'hypertension de plusieurs années [4].

Toutes les autres formes d'HTA monogéniques identifiées jusqu'alors agissent en augmentant directement ou indirectement l'activité du canal sodium épithélial (ENaC). Dans tous les cas, *via* une électronégativité luminale augmentée, on trouve de manière associée une perte rénale de protons et de potassium, d'où hypokaliémie et alcalose métabolique. Le

phénotype de l'HHF était inexplicable par la physiologie rénale connue jusqu'à récemment, mais commence à être élucidé avec l'étude des kinases WNK.

I. De l'hypertension hyperkaliémique familiale aux WNKs

1. Historique

Le premier cas rapporté dans la littérature, en 1964, est celui d'un homme de 15 ans, en Australie [5]. Un examen systématique en vue de travailler en usine avait retrouvé chez ce patient asymptomatique une pression artérielle à 180/120 mmHg, une kaliémie à 8.2 mEq/l et une acidose avec une fonction rénale normale et une excrétion tubulaire de potassium altérée. La description de ce cas a été complétée lorsque le patient a été revu quelques années plus tard [6]. On apprenait que son aldostéronémie plasmatique était normale avec une aldostérone urinaire légèrement élevée. De plus, l'HTA comme l'hyperkaliémie avaient très bien répondu aux diurétiques thiazidiques. L'histoire familiale était peu informative. La mère âgée de 55 ans était modérément hypertendue mais normokaliémique. Le père était décédé de mort subite à l'âge de 67 ans.

La pathologie est nommée pour la première fois « pseudohypoaldostéronisme de type 2 » par Schambelan en 1981 [7], en raison de l'hyperkaliémie résistante aux minéralocorticoïdes, et par opposition au pseudohypoaldostéronisme de type 1 dans lequel l'hyperkaliémie est associée à une perte de sel et une hypotension. Même si cette dénomination est contestée ensuite par Gordon [2], elle perdurera et se lit encore fréquemment aujourd'hui. Schambelan *et al*. [7] présentent des explorations physiologiques

poussées chez un homme de 23 ans atteint de la pathologie. L'excrétion urinaire de potassium est anormalement faible tandis que l'excrétion fécale est élevée. Les valeurs d'aldostérone plasmatique et urinaire du patient soumis à un régime à teneur normale en sodium et potassium sont dans les limites supérieures de la normale. L'aldostérone baisse lorsque l'on diminue la kaliémie par résine échangeuse d'ions. Même en présence de minéralocorticoïdes, la kaliurèse reste insuffisante lors de la perfusion de chlorure de sodium tandis qu'elle augmente de manière appropriée lors de la perfusion de sodium sans chlore associé. L'ensemble des résultats suggère que la capacité de sécrétion rénale de potassium en soi n'est pas altérée mais limitée en présence de chlore. Pour ces auteurs, l'anomalie primitive serait donc un « shunt au chlore ».

Gordon, auteur de multiples articles sur ce syndrome qui portera son nom, publie en 1986 la synthèse des vingt-huit cas rapportés dans sept pays à cette date du « syndrome of hypertension and hyperkaliemia » et en discute les hypothèses physiopathologiques [2]. Dix-sept des 28 patients décrits appartiennent à 5 familles, ce qui permet d'identifier un mode de transmission autosomique dominant. L'auteur réfute le mécanisme proposé par Schambelan, [7] où le shunt au chlore entraîne une hyperkaliémie qui résiste aux minéralocorticoides, car, selon lui, dans la plupart des cas on ne retrouve pas cette résistance puisque les minéralocorticoïdes sont normaux ou bas. Il conteste également la dénomination de « pseudohypoaldostéronisme » : il s'agit selon lui d'une vrai hypoaldostéronisme. Pour Gordon, toutes les anomalies observées résultent d'une réabsorption rénale de sodium augmentée, sans anomalie primitive de la kaliurèse. Son hypothèse physiopathologique est la suivante : une augmentation de la réabsorption de sodium au niveau rénal entraîne une hypertension à rénine et aldostérone basses. L'aldostérone basse entraîne alors à son tour l'hyperkaliémie et l'acidose.

Une équipe japonaise en 1991 est la première à émettre clairement l'hypothèse physiopathologique d'une hyperactivation d'un co-transporteur sodium-chlore comme anomalie primitive de la maladie [8]. Cette hypothèse est avancée à partir de trois cas (un père et deux de ses 3 enfants), que les auteurs soumettent à diverses explorations fonctionnelles, dont la perfusion de chlorure de sodium, sulfate de sodium et bicarbonate de sodium pour tenter de reproduire les résultats de Schambelan [7]. L'excrétion urinaire de potassium augmente dans tous les cas chez les sujets contrôles et seulement dans les deux derniers cas chez les patients, c'est-à-dire qu'elle n'augmente pas en cas de perfusion de chlorure de sodium. De plus, un traitement par hydrochlorothiazide à la dose de 25mg/j pendant 3 semaines corrige entièrement les anomalies chez une patiente. Sur la base de ces résultats, qui ne font que confirmer ceux de Schambelan, les auteurs émettent l'hypothèse que l'anomalie primitive dont souffrent les patients est une réabsorption augmentée de sodium et de chlore (« sodium chloride shunting »), et ce, dans le segment tubulaire sensible aux thiazidiques. Ceci entraînerait un moindre apport sodé aux tubules en aval et donc une moindre excrétion potassique. Il convient de souligner la finesse de l'analyse physiologique de cette équipe, qui avait donc proposé dix ans avant la découverte des WNKs sur la base d'explorations physiologiques que l'anomalie principale dans cette maladie est une « réabsorption anormalement élevée de sodium et de chlore dans le segment néphronique sensible aux thiazidiques».

2. L'HHF est liée à des mutations des kinases WNK

Il est décrit dès 1997 que la maladie est liée à la mutation de différents gènes [9]. En effet, l'étude de 8 familles atteintes de syndrome de Gordon montre qu'il y a une hétérogénéité de *loci* pour cette maladie, avec au moins deux *loci* impliqués : un sur le

chromosome 1 et l'autre sur le chromosome 17. Trois ans plus tard est identifié un troisième *locus* sur le chromosome 12 à partir de l'étude d'une nouvelle famille comprenant 12 membres atteints sur 3 générations [3]. Un quatrième locus est identifié peu après [10], mais sans être localisé. Ces *loci* sont nommés PHA2 A, B, C et D (Figure 1).

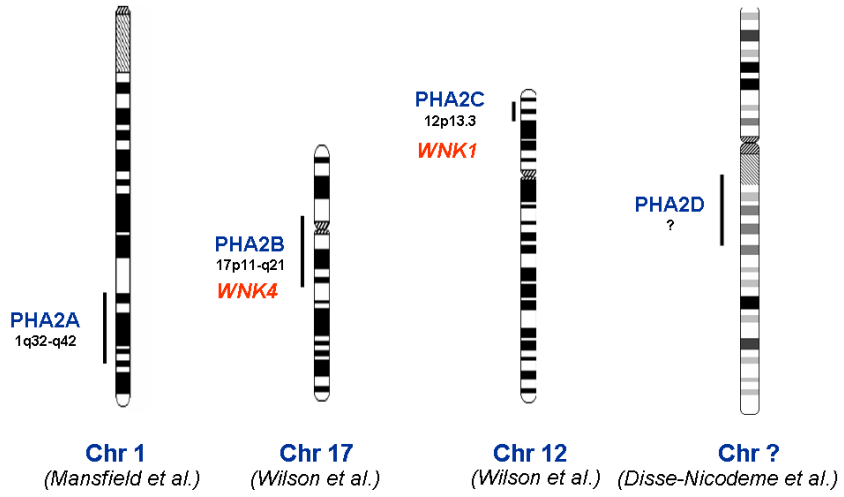


Figure 1 : Hétérogénéité génétique de l'HHF en 2001. Au minimum quatre *loci* HHF existent : PHA2A, B, C et D. Les gènes correspondant aux loci PHA2B et C sont *WNK4* et *WNK1* respectivement. Les autres gènes restent à l'époque à identifier.

Un tournant majeur survient en 2001 lorsqu'une collaboration entre les laboratoires du Pr Jeunemaitre en France et du Pr Lifton aux Etats-Unis conduit à l'indentification des deux gènes correspondant aux *loci* PHA2C et PHA2B, à savoir *PRKWNK1* et *PRKWNK4* codant respectivement les protéines WNK1 et WNK4 [11], membres d'une nouvelle famille de sérine-thréonine kinases décrite juste un an auparavant [12]. Grâce à l'étude de deux familles, les auteurs mettent d'abord en évidence une mutation de *PRKWNK1* sur le chromosome 12. Le gène *PRKWNK1* humain est un gène de 156 kb contenant 28 exons et la mutation identifiée dans une famille américaine est une délétion de 41 kb dans le premier intron qui en fait 60. Les auteurs identifient dans une autre famille, française, une délétion de 22 kb du

même intron, entièrement inclue dans le segment de 41 kb identifié dans la première famille. Les taux de transcrits WNK1 dans les leucocytes de sujets atteints sont 5 fois supérieurs à ceux des sujets contrôles, suggérant que la mutation conduit à une surexpression de *WNK1*.

A partir de ces résultats, des paralogues de *PRKWNK1* ont été recherchés, permettant de mettre en évidence *PRKWNK2* sur le chromosome 9, *PRKWNK3* sur le chromosome X et *PRKWNK4* sur le chromosome 17. *PRKWNK4* correspond au locus PHA2B identifié sur le chromosome 17. Le séquençage de *PRKWNK4* a permis de retrouver 4 mutations faux-sens chez les patients. Trois de ces mutations sont localisées dans un segment de 10 acides aminés « EPEEPEADQH » chargé négativement, situé juste en aval d'un domaine coiled-coil, et appelé motif acide. Ce motif est très conservé entre les membres de la famille WNK chez l'homme, la souris et le rat. La quatrième mutation se trouve juste en aval du deuxième domaine coiled-coil putatif et change également la charge d'un acide aminé au sein d'une séquence hautement conservée de 16 acides aminés (Figure 2).

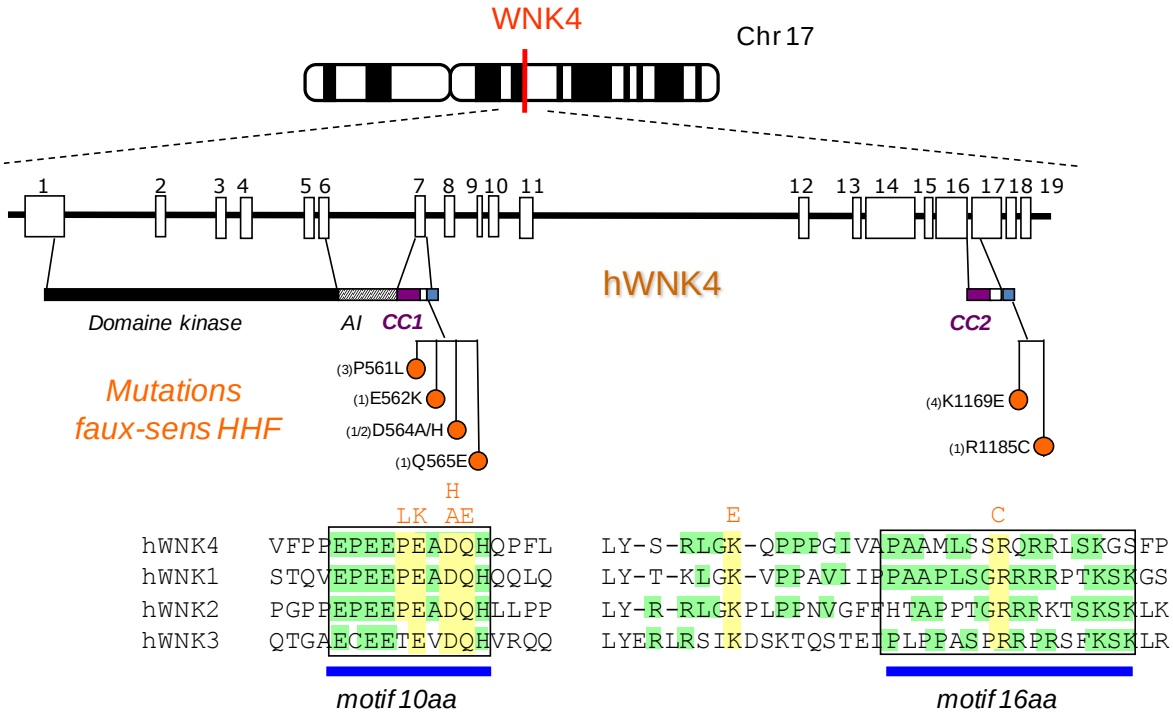


Figure 2 : Mutations de WNK4 à l'origine de l'HHF. La structure exon/intron du gène humain est schématisée en haut de la figure, ainsi que le domaine kinase, le domaine autoinhibiteur (AI) et les

domaines coiled-coil (CC1, 511-525 et CC2, 1137-1151). Les sept mutations faux-sens trouvées dans plusieurs familles atteintes d'HHF sont localisées au niveau de courts motifs conservés en aval des domaines coiled-coil. Chacune de ces mutations modifie un résidu conservé entre les quatre membres de la famille WNK. (1): [11] - (2): [13] - (3): [14] - (4): [15]

Une équipe de Cambridge [13] a identifié en 2005 une nouvelle mutation WNK4 D564H, elle aussi située dans le motif acide. Une sixième mutation, P561L, [14] et, plus récemment, une septième mutation, K1169E [15] ont été identifiées chez des patients chinois (figure 2). Le tableau 1 rassemble les différentes mutations HHF de *WNK4* et leur localisation, selon qu'il s'agit de la forme humaine ou murine de *WNK4*.

Mutation	**hWNK4**	**mWNK4**	**Localisation**
Pro561-Leu	P561L	P558L	Motif acide
Glu562-Lys	E562K	E559K	Motif acide
Asp564-Ala	D564A	D561A	Motif acide
Asp564-His	D564H	D561H	Motif acide
Gln565-Glu	Q565E	Q562E	Motif acide
Lys1169-Glu	K1169E	K1148E	Cter/2ème coiled-coil
Arg1185-Cys	R1185C	R1164C	Cter/2ème coiled-coil

Tableau 1 : Synthèse des différentes mutations WNK4 identifiées et leur dénomination courte, concernant la kinase humaine (hWNK4) et leur équivalent dans la kinase de souris (mWNK4). Les cinq premières mutations sont localisées dans le motif acide situé 32 à 41 acides aminés en aval du premier domaine coiled-coiled. Les deux dernières mutations sont situées respectivement 18 et 34 acides aminés en aval du deuxième domaine coiled-coil.

3. Description phénotypique des patients

La plupart des données récentes concernant les patients atteints d' HHF provient d'une large famille israélienne, porteuse de la mutation WNK4 Q565E [4,16,17,18,19]. Une étude

de 34 membres de la famille, dont 18 atteints de la mutation, montre que, par rapport aux sujets sains de la même famille, les sujets mutés ont une hyperkaliémie (5,5 ± 0,2 mmol/L *vs* 4,2 ± 0,2 mmol/l), une hyperchlorémie, des bicarbonates plus bas, une aldostérone plus élevée et une rénine plus basse [4]. Treize des 18 patients sont hypertendus, et l'HTA apparaît en moyenne 13 ans après l'hyperkaliémie, soit à un âge de 31 ± 12 ans. Par ailleurs, les hommes voient leur HTA apparaître 12 ans avant les femmes [17]. Les patients ont une sensibilité aux thiazidiques multipliée par six par rapport à ce que l'on peut attendre dans l'HTA essentielle [19]. Ainsi, chez 8 patients, une dose moyenne de 20 mg/j d'hydrochlorothiazide a fait diminuer les pressions artérielles systolique et diastolique de 54 et 26 mmHg respectivement. L'évolution pendant la grossesse a été décrite chez 2 patientes de la même famille ayant chacune eu deux grossesses [18]. D'après ces cas, la pression artérielle se normalise en *per partum* tandis que persistent les troubles métaboliques.

Les patients portant la mutation WNK4 Q565E ont une densité minérale osseuse diminuée [4] et une hypercalciurie. L'hypercalciurie apparaît en même temps que l'hyperkaliémie. L'hypercalciurie n'a pas été retrouvée dans la famille française porteuse de la mutation dans le gène *WNK1*, qui présente d'ailleurs une HTA moins sévère et d'apparition plus tardive [20]. Cependant les explorations des familles WNK1 concernant le métabolisme du calcium demandent à être approfondies.

La publication la plus récente concernant cette famille israëlienne [16], qui comprenait alors 57 membres dont 30 atteints, apporte deux précisions : l'hyperkaliémie est plus sévère chez les enfants que chez les adultes et, contrairement à ce qui est parfois évoqué, la petite taille ne fait pas partie du syndrome, puisqu'elle ne concerne qu'une branche de la famille.

4. Découverte récente de nouvelles mutations HHF

Depuis 2001, plusieurs équipes poursuivaient les recherches de nouveaux gènes impliqués dans l'HHF puisque les mutations de WNK ne permettaient d'expliquer qu'une minorité de cas. Une approche nouvelle par la technique de séquençage d'exome a récemment permis une avancée considérable dans le domaine en faisant découvrir de nouvelles mutations dans les gènes *KLHL3* (Kelch-like 3) et *CUL3* (cullin 3) dans plus de la moitié des familles étudiées [21,22]. Ces deux protéines jouent un rôle dans l'ubiquitination : KLHL3 permet le rapprochement du substrat et de la cullin 3 (figure 3). Outre l'adressage des protéines vers le protéasome où elles sont dégradées, l'ubiquitination peut également réguler l'activité ou la localisation de certaines protéines. Les premières études *in vitro* suggèrent que KLHL3 est un inhibiteur de l'expression membranaire du co-transporteur Na^+-Cl^- NCC, exprimé spécifiquement dans le Tubule Contourné Distal (DCT) et cible des diurétiques thiazidiques. La découverte de ces mutations ouvre un nouveau champ de recherche sur la régulation de NCC.

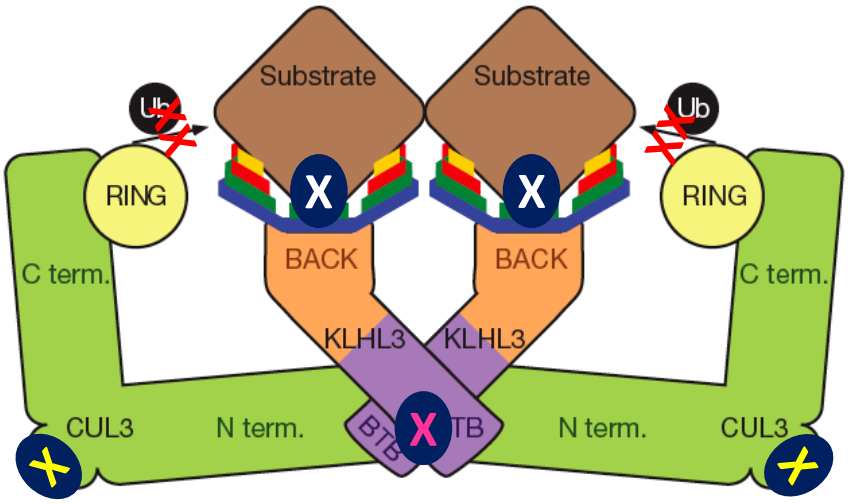


Figure 3: Représentation schématique du complexe KLHL3/CUL3. Les mutations au sein de *CUL3* (croix jaune) et celles de *KLHL3* dans le domaine BTB (croix rose) ou les domaines Kelch (croix blanches) empêchent l'interaction correcte entre CUL3 et KLHL3 ou la liaison du substrat. Les

mutations empêchent ainsi l'ubiquitination et donc la dégradation du substrat. Un des substrats putatifs est le co-transporteur Na+-Cl- NCC.

II. WNK : une nouvelle famille de sérine-thréonine kinases

1. Un domaine catalytique unique qui explique leur nom

La superfamille des kinases est codée par un total de 518 gènes chez l'homme. Dans tous les cas, on retrouve un noyau catalytique de 300 acides aminés environ organisé en sous-domaines. Le sous-domaine I est toujours formé de deux feuillets β séparés par une boucle constituée de résidus glycine invariants. Cette chaîne de glycines sert à ancrer le résidu phosphate non transférable de l'ATP (adénosine triphosphate). Une lysine du sous-domaine II, dans le troisième feuillet β, (par exemple la lysine 72 de la protéine kinase A) sert quant à elle à ancrer et orienter les groupements phosphate α et β de l'ATP. Cette lysine est hautement conservée ; elle est d'ailleurs classiquement mutée pour obtenir un modèle expérimental de kinase non fonctionnelle.

Les kinases WNK ont été identifiées pour la première fois en 2000 par l'équipe de Mélanie Cobb au Texas [12]. En tentant d'isoler de nouveaux membres de la famille des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases à partir de cerveau de rat, ces auteurs font la découverte d'une nouvelle famille de sérine-thréonine kinases, qu'ils nomment WNK (With No lysine (K)). Leur nom vient du fait que la lysine catalytique habituellement retrouvée dans le sous-domaine II des kinases est remplacée par une cystéine. La kinase identifiée par les auteurs est nommée WNK1. Des clones très proches sont retrouvés chez le rat, et des homologues sont retrouvés dans de nombreuses autres espèces y compris l'homme. Dans la

même publication, les auteurs ont étudié le retentissement fonctionnel de l'absence de la lysine dans le sous-domaine II. Il est ainsi montré que la lysine 233, qui remplace une glycine dans la chaîne de glycines du sous-domaine I, est cruciale pour l'activité kinase de WNK1. Ce résidu est d'ailleurs conservé parmi tous les homologues de WNK1. Dans les kinases WNK, la lysine absente du sous-domaine II se trouve donc dans le sous-domaine I.

La kinase WNK1 humaine, hWNK1, dont le gène est situé sur le chromosome 12, est isolée pour la première fois à partir de cellules de cancer colorectal [23]. Elle présente 86% d'identité avec la kinase WNK1 décrite chez le rat. La protéine WNK1 comprend 2382 et 2377 acides aminés chez l'homme et la souris respectivement, avec un poids moléculaire prédit de 251 kDa.

Des kinases homologues ont pu être identifiées dans de nombreuses espèces, surtout dans des organismes pluricellulaires mais également dans certains organismes unicellulaires tels que *Giardia lamblia*. Le nombre de gènes *WNK* dans une espèce donnée va de un chez *Caenorhabditis elegans* à quatre chez les mammifères. WNK se retrouve aussi chez les plantes, avec un maximum de neuf WNKs chez *Arabidopsis thaliana*. On trouve parmi tous ces homologues 11 résidus invariants dont la lysine catalytique du sous-domaine I décrite par Xu *et al.* [12].

L'analyse de la séquence codante de *hWNK1* révèle un domaine kinase entre les résidus 221 et 479 (figure 3) [23]. Le domaine kinase est la région la plus conservée entre les 4 membres de la famille WNK. Le domaine kinase de WNK1 est actif *in vitro* et capable d'autophosphorylation [12]. Son activité est régulée par la phosphorylation de deux sérines, les sérines 378 et 382 [24]. Si l'on mute la sérine 378, on perd 50% de l'activité kinase de WNK1. Si l'on mute la sérine 382 ou les deux résidus, on perd la totalité de l'activité kinase [25] De plus, deux résidus hydrophobes valine 318 et alanine 448 contribuent à la spécificité de substrat [24].

Min *et al.* [26] ont décrit en 2004 la structure cristallographique du domaine kinase de WNK1, dans une forme peu active car porteuse de la mutation S382A. D'après ces auteurs, le plus proche homologue du domaine kinase de WNK1 est celui de Ste20, qui montre 29% d'identité de séquence avec WNK1. Cependant, seul le domaine kinase de WNK1 a été cristallisé, et la connaissance de la structure tridimensionnelle des WNK est actuellement très limitée en raison de la difficulté à exprimer la protéine entière dans les modèles de bactéries ou d'insectes utilisés pour la cristallisation [27].

2. Autres domaines protéiques

a) Domaines régulateurs de l'activité kinase

WNK1 présente un domaine auto-inhibiteur de l'activité kinase, situé à proximité de ce dernier du côté C-terminal entre les résidus 485 et 555 (figure 3). Xu *et al.* [24] ont montré *in vitro* que le fragment WNK1 (485-555) réduit l'activité kinase de WNK1 de manière dose-dépendante. Dans cette région hautement conservée, on note en particulier deux résidus phénylalanine 524 et 526 (chez le rat) qui, remplacés par des résidus alanine, font perdre la quasi-totalité de la capacité inhibitrice de l'activité kinase de WNK1. Ces deux résidus sont conservés dans les 4 membres de la famille WNK. La fonctionnalité de ce domaine auto-inhibiteur a été confirmée par une autre équipe [28].

b) Les autres domaines de la protéine WNK1

On retrouve dans la protéine telle que la séquence codante la prédit trois possibles domaines coiled-coil (figure 4). Les domaines coiled-coil jouent un rôle majeur dans les

interactions protéiques [29], et pourraient en particulier avoir une importance fonctionnelle pour les interactions entre kinases WNKs. L'analyse de la séquence de WNK1 révèle aussi 4 régions riches en proline qui peuvent également participer aux interactions protéiques [30], une région riche en glutamine (résidus 571-812), deux régions riches en serine (résidus 1404-1562 et 2027-2065), des motifs RFXV qui permettent l'interaction avec l'extrémité C-terminale de son substrat SPAK (Sterile 20/SPS21-related Proline/Alanine-rich Kinase, cf plus loin), 33 motifs PXXP reconnus par des domaines SH3 (Src-homology 3), et un possible signal de localisation nucléaire (567-584), se superposant au deuxième domaine coiled-coil [23]. L'équipe de Mélanie Cobb, qui a étudié de manière très détaillée les propriétés biochimiques de WNK1 *in vitro* [31], suggère que la protéine s'oligomérise en tétramères. L'interaction entre les molécules WNK1 semble se faire entre WNK1 (1-222) et WNK1 (481-660), et pourrait faire intervenir les deux premiers domaines coiled-coil.

Notons enfin que la séquence protéique spécifique de KS-WNK1, codée par l'exon 4a, est riche en cystéine. L'importance fonctionnelle de cette séquence n'a cependant pas été étudiée.

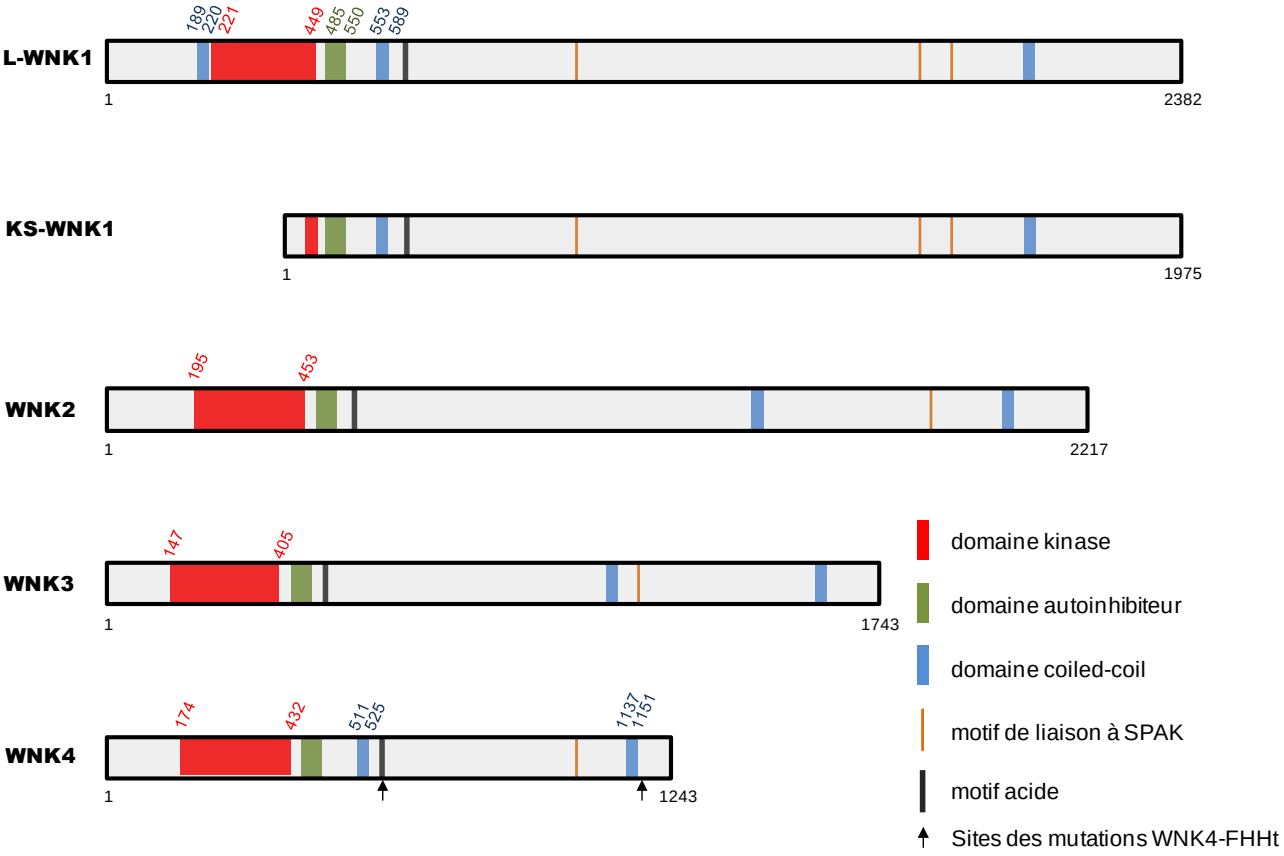


Figure 4 : Représentation schématiques des sérine-thréonine kinases WNK2-3-4 et des deux isoformes principales de WNK1. Toutes les WNKs ont en commun un domaine kinase (en rouge), à l'exception de KS-WNK1 dont le domaine kinase est amputé de sa plus grande partie donc non fonctionnel, un domaine inhibiteur de l'activité kinase (en vert), deux à trois domaines coiled-coil (en bleu), un motif acide (en noir) et des motifs potentiels de liaison à SPAK (orange). Les flèches indiquent les deux sites des mutations WNK4-HHF, situés 20 à 40 résidus en aval de chaque domaine coiled-coil. Les localisations des domaines et les longueurs des protéines sont données pour les séquences humaines.

3. Analyse génomique : WNK1 et ses transcrits

Le gène *WNK1* humain est situé sur le chromosome 12. Il s'étend sur 160 kb d'ADN génomique et comprend 28 exons. La séquence codante s'étend sur 7149 nucléotides et code pour une protéine de 2382 acides aminés, soit 251 kDa [23]. Le gène *WNK1* de la souris, situé

sur le chromosome 6, s'étend sur plus de 100kb. La région codante est identique à 86% avec celle de l'homme. Dans les deux espèces, le gène *WNK1* donne naissance à de multiples isoformes.

a) Région 5' non traduite

Concernant le site d'initiation de la transcription, les données sont rares et divergentes. La seule étude expérimentale [32] évoque chez l'humain l'existence de deux promoteurs P1 et P2 correspondant à deux ATG au sein de l'exon 1, séparés par 640 nucléotides. Par extension d'amorce et 5'RACE à partir d'ARN de leucocytes et de rein humain, ces auteurs mettent en évidence plusieurs sites d'initiation de la transcription. Les sites d'initiation de la transcription pour le premier promoteur, P1, sont situés aux nucléotides -179 et – 219 par rapport au premier codon ATG, tandis que l'analyse de la base de données EST (Expressed Sequence Tag) humaine identifie 4 sites potentiels d'initiation de la transcription aux nucléotides -206, -251, -404 et -644 par rapport au premier ATG [23]. La conservation de séquences suggère que ce promoteur P1 existe aussi chez la souris (86% d'identité). Il n'a pas de TATA box, mais il contient des sites de liaison pour les éléments initiateurs de transcription (Sp-1, Oct-1 et HES-1). Il contient aussi un élément répresseur CUP. La région qui s'étend de -1453 à +166 par rapport au premier ATG est riche en îlots CpG. Dans l'exon 1, 481 à 623 pb après le premier ATG se trouvent les sites d'initiation de la transcription d'un autre promoteur, P2, présentant 83% d'identité avec la souris, avec un ATG situé en + 640. Notons que le transcrit provenant de P2 contient aussi l'intégralité du domaine kinase, dont le premier acide aminé est codé par le 4ème codon de ce transcrit tronqué. Ces deux promoteurs proximaux sont actifs *in vitro* dans différentes lignées cellulaires [32]. Chez la souris, l'existence éventuelle de P2 n'a pas été étudiée.

b) Région 3’ non traduite

Chez l’homme, l’analyse de la région 3’UTR (3’Untranslated Region) montre deux sites de polyadénylation « AATAAA » situés respectivement à 823-829 nucléotides et 2636-2641 nucléotides en aval du codon stop. L’étude par *northern blot* avec une sonde complémentaire des exons 3 à 7 de hWNK1 révèle deux transcrits de 8,5 et 10 kb, expliqués par l’existence de ces deux sites de polyadénylation [23]. Chez la souris, l’isoforme qui se termine au deuxième signal de polyadénylation est en revanche considérée comme prédominante voire exclusive puisque seule l’isoforme la plus longue est visible par *northern blot* [32,33].

c) Les variants d’épissage de WNK1

WNK1 fait de plus l’objet d’un épissage alternatif complexe, tissu-spécifique et partiellement conservé entre les espèces.

- ***Isoforme rénale : KS-WNK1***

En 2002, par une analyse informatisée du génome basée sur les *Expressed Sequence Tags* (ESTs), un groupe américain découvre une isoforme de WNK1 spécifique du rein, qui est amputée de sa partie N-terminale [34]. Un nouvel exon, qu’ils nomment 4a, remplace les 4 premiers exons, codant donc pour une protéine où les 437 acides aminés N-terminaux sont remplacés par 30 autres acides aminés.

Deux groupes [32,33] confirment cette donnée *in vivo* un an plus tard en mettant en évidence un transcrit court de WNK1 dépourvu de domaine kinase, exprimé dans le néphron distal, tandis que la forme complète de la kinase est ubiquitaire (figure 5). Ces deux groupes

ont effectué des *northern blots* avec des sondes complémentaires des exons 1, 2, 3, 4, et 5 sur tissus humains et murins : en accord avec l'étude *in silico*, l'isoforme rénale courte n'apparait qu'à partir de l'exon 5 et ne contient pas les 4 premiers exons, remplacés par l'exon 4a qui est absent de la forme longue. Delaloy *et al.* [32] ont complété l'étude de cette isoforme rénale en mettant en évidence un troisième promoteur (appelé rP pour « renal promoter »), 251 pb en amont du codon ATG de l'exon 4a et un enhancer de ce rP uniquement dans les cellules épithéliales rénales. L'exon 4a présente 90% d'identité entre l'humain, la souris et le rat, et contient une région riche en cystéine. Cette isoforme exprimée uniquement dans le rein chez la souris comme chez l'homme est appelée KS-WNK1 (pour « kidney-specific »). L'autre isoforme, sous le contrôle des promoteurs proximaux P1 ou P2, prend le nom de L-WNK1 (« long-WNK1 »).

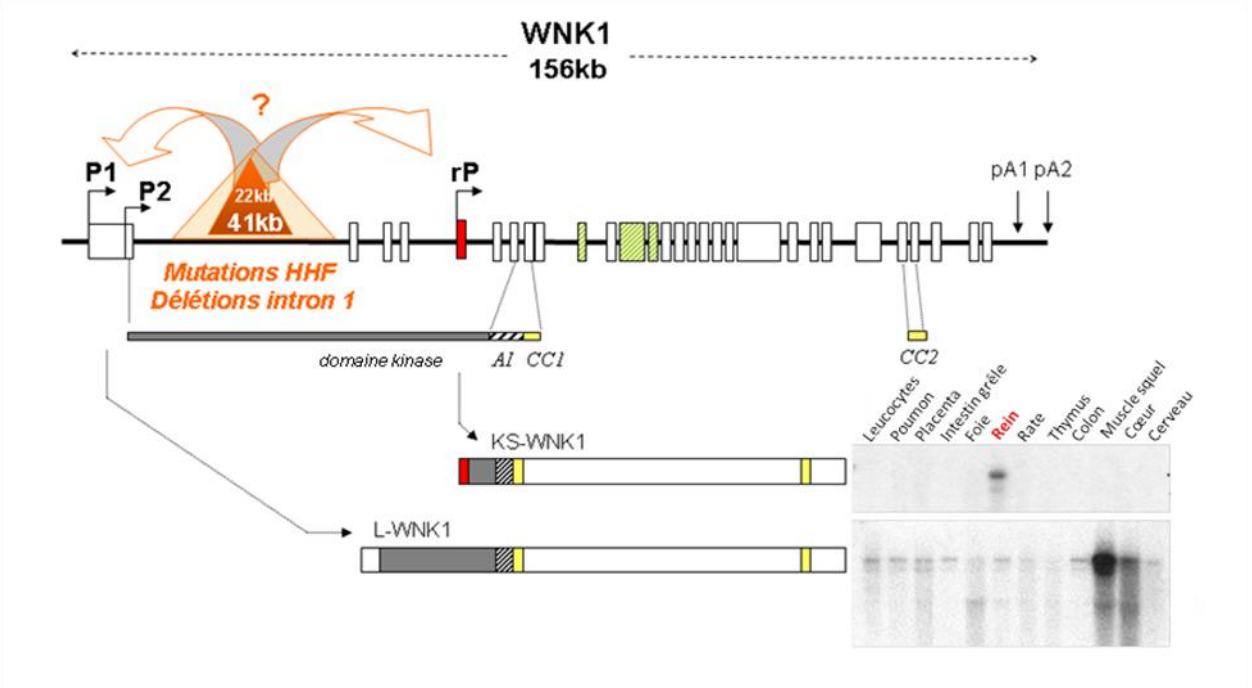


Figure 5 : Structure du gène *WNK1* et des deux isoformes L- et KS-WNK1. Les rectangles représentent les 28 exons. En vert sont indiqués les exons alternatifs au moins chez l'homme (9, 11 et 12). L'exon 4a, spécifique de KS-WNK1, est représenté en rouge. P1 et P2 indiquent les deux promoteurs proximaux qui contrôlent l'expression de L-WNK1 (ubiquitaire, comme illustré par le

northern blot). rP indique le promoteur rénal qui contrôle l'expression de KS-WNK1 (exprimé uniquement dans le rein, comme illustré par le *northern blot*). Les mutations WNK1-HHF, qui sont de larges délétions au sein du premier intron, sont indiquées en orange.

- ***Autres épissages alternatifs***

Outre l'exon 4a, Xu *et al.* [24] avaient aussi identifié les exons 9, 11 et 12 et 26 comme potentiels exons « alternatifs » de WNK1 par leur analyse informatisée des ESTs. Ces variants d'épissage ont été étudiés *in vivo* par plusieurs équipes [23,32,33].

Selon ces différentes études, l'exon 9 est absent d'environ la moitié des transcrits chez l'homme dans le rein, le cœur, le muscle et le colon; en revanche, il semble toujours présent dans ces mêmes tissus chez la souris. L'exon 11 semble absent des deux isoformes (L- et KS-WNK1) dans le rein mais également dans le muscle et le cœur chez l'homme et la souris et dans le placenta chez la souris. Il est présent dans le testicule chez la souris adulte, et dans certaines parties du système nerveux central chez l'embryon de souris. L'exon 12 semble être sujet à épissage alternatif dans le cœur, le muscle squelettique et le rein chez l'homme comme chez la souris. Selon les études, il est dit toujours épissé avec l'exon 11 [32,33] ou bien parfois seul [23]. Notons à ce sujet que l'ADNc cloné chez le rat décrit par Xu *et al.* [12] ne contient pas les exons 11 et 12. Aucune étude expérimentale n'a étudié l'éventuel épissage de l'exon 26.

Les exons 9, 11 et 12 codent pour des parties de la protéine situées entre les deux domaines coiled-coil et sont conservés à plus de 80% entre l'homme, la souris et le rat. L'importance fonctionnelle de ces exons n'est pas connue, mais les exons 11 et 12 codent une séquence protéique riche en proline, compatible avec un potentiel domaine transmembranaire ou un domaine d'interaction protéique [33].

Il convient pour être exhaustif de signaler l'existence d'isoformes plus rares dont la signification biologique reste à établir. Ainsi Delaloy *et al.* [32] ont identifié un transcrit très minoritaire résultant d'un site accepteur alternatif situé 83 nucléotides en amont du site accepteur de l'exon 4. L'éventuelle protéine qui résulterait de cet épissage rare serait tronquée dans le domaine kinase car un codon stop survient dans le cadre de lecture peu après ce site accepteur alternatif. Il existe également un exon 4b entre les exons 4 et 5, mais les transcrits qui le contiennent semblent rares en hybridation *in situ* sur le rein [35].

- ***L'isoforme WNK1/HSN2***

Récemment, un autre variant d'épissage de *WNK1*, d'une importance clinique particulière, appelé WNK1/HSN2, a été mis en évidence.

La Neuropathie Héréditaire Sensitive et Autonomique de type II (HSANII) est une insensibilité congénitale à la douleur de transmission autosomique récessive [36]. Depuis 2004, il était décrit que des mutations de *HSN2* (Hereditary Sensory Neuropathy type 2), jusqu'alors considéré comme une phase ouverte de lecture à un seul exon située dans l'intron 8 de *WNK1*, pouvaient en être responsables. Une équipe canadienne a récemment diagnostiqué chez une jeune femme atteinte de la maladie une mutation hétérozygote composite : un allèle, transmis par son père, porte une mutation dans *HSN2*. L'autre allèle *HSN2* ne présente pas de mutation mais il existe une délétion dans l'exon 6 de *WNK1*, qui génère un codon STOP prématuré [37]. Ces auteurs ont donc testé chez la souris l'hypothèse que *HSN2* serait un exon alternativement épissé de *WNK1*. Un *northern blot* réalisé avec une sonde dirigée contre la région codante de *HSN2* reconnait une isoforme légèrement supérieure à 10kb, uniquement dans les tissus nerveux (cerveau, moelle épinière, ganglions de la racine dorsale). Par RT-PCR, les auteurs mettent en évidence que les exons adjacents à *HSN2* sont les exons 8 et 9 de *WNK1* avec parfois cependant l'ajout d'un exon 8b (258 nucléotides) entre

l'exon 8 de *WNK1* et *HSN2*. HSN2 est donc selon ces auteurs un exon de *WNK1* spécifique du système nerveux, de 1236 nucléotides et l'isoforme qui le contient est appelée WNK1/HSN2. En immunohistochimie, la protéine WNK1/HSN2 est détectée principalement dans les cellules de Schwann qui entourent les neurones sensitifs mais aussi dans les axones. L'analyse informatique de l'exon 8b et de HSN2 ne fait pas ressortir de motif particulier permettant de prédire le rôle de la protéine qui les inclut. Notons par ailleurs que la mère de la patiente, qui ne porte que la mutation dans l'exon 6, et la patiente elle-même ont une pression artérielle dite normale sans plus de précision.

Cette observation est complétée un an plus tard par une étude des sujets hétérozygotes pour la mutation du gène *WNK1/HSN2* [38]. Ces derniers ont une sensibilité accrue au froid et au chaud, qui de surcroît ne diminue pas avec l'âge contrairement aux sujets contrôles. Selon les auteurs, ceci pourrait être un avantage adaptatif aux environnements très froids et expliquer la grande fréquence de ces mutations dans le nord du Canada. Reste à comprendre comment une mutation hétérozygote augmente la perception sensitive aux stimuli thermiques tandis que la mutation homozygote l'abolit.

Remarquons qu'une étude sur une lignée de progéniteurs neuronaux montre un rôle clé de *WNK1* dans la prolifération, la migration et la différentiation cellulaire [39]. De plus, *WNK1* est fortement exprimé dans le cervelet des souris adultes [35]. La description de cette nouvelle isoforme ouvre des perspectives très intéressantes sur le rôle de *WNK1* dans le système nerveux.

4. Spécificités des autres WNKs

a) WNK2

Le gène *WNK2* humain s'étend sur 130kb et contient 30 exons qui codent pour une protéine de 2297 acides aminés [40]. WNK2, peu étudiée jusqu'à récemment, suscite actuellement un intérêt grandissant car elle a une fonction suppresseur de tumeur. En effet, des modifications épigénétiques de *WNK2* sont impliquées dans les gliomes infiltratifs de l'adulte [40,41].

b) WNK3

Le gène *WNK3* humain est situé sur le chromosome X et s'étend sur 165kb. Il a été cloné pour la première fois à partir de tissu cérébral fœtal [42]. Son transcrit contient 24 exons et code une protéine de 1743 acides aminés. L'exon 18 a deux sites donneurs d'épissage, se traduisant par deux exons de 163pb (exon 18a) ou 304 pb (exon 18b). L'exon 18a s'exprime dans la majorité des tissus où s'exprime WNK3 tandis que 18b est exprimé exclusivement dans le cerveau fœtal et adulte. De même, l'exon 22 fait l'objet d'un épissage alternatif : il est présent dans le cerveau mais absent du rein[43].

Le poids moléculaire prédit de la protéine est de 192 kDa. Le domaine kinase présente 93% d'identité avec celui de WNK1 et 81% d'identité avec celui de WNK4. Le reste de la protéine a peu d'homologie avec les autres WNKs, en dehors d'un équivalent du motif acide de WNK4, entre les résidus 537 et 546, et de deux autres régions, dont celle située entre les résidus 1471 et 1546 qui contient un domaine coiled-coil [44] (figure 4).

c) WNK4

Le gène *WNK4* humain, situé sur le chromosome 17, est le plus petit de la famille puisqu'il contient 19 exons contenus dans 16 kb d'ADN génomique [11]. Il n'a pas été décrit de variant d'épissage en dehors d'une isoforme cérébrale différant par son extrémité 3' [45]. La protéine WNK4 contient 1243 acides aminés.

L'activité kinase de WNK4 a été plus difficile à mettre en évidence que pour WNK1 mais elle est bien réelle, au moins sur les substrats SPAK (STE20-related Proline/Alanine-rich Kinase) et OSR1 (Oxidative Stress Responsive kinase-1) [46,47]. La phosphorylation d'autres substrats, comme la claudine 4 [48], est contestée [47]. De plus, il a été montré que le domaine auto-inhibiteur de WNK4 peut inhiber l'activité kinase de WNK1 [28].

Le motif acide est une séquence de 10 acides aminés hautement conservés, chargés négativement en majorité. Ce motif est le siège de 5 des 7 mutations HHF identifiées à ce jour (voir figure 2 et tableau 1). Le fait que la structure tridimensionnelle des WNKs n'ait pu être résolue en dehors du domaine kinase limite les connaissances sur le rôle du motif acide dont on ne connaît pas la topologie dans une molécule WNK4 intacte. Ce motif est retrouvé avec 100% d'identité dans les kinases WNK1 et WNK2, et 70% d'identité dans la kinase WNK3. Notons que ce motif acide est situé à proximité immédiate de motifs PXXP, impliqués dans les interactions avec des domaines SH3. Il est possible que cette proximité avec des domaines d'interaction protéique explique l'importance fonctionnelle des mutations de cette région.

5. Profil d'expression des kinases WNK

a) WNK1

- ***Rein***

Comme mentionné plus haut, l'isoforme KS-WNK1 est exprimée uniquement dans le rein chez l'adulte [32,33]. Par hybridation *in situ* sur rein de souris adultes [32,33], il a été montré que L-WNK1 est présent à faible niveau dans l'ensemble du néphron tandis que KS-WNK1 est exprimé fortement, uniquement dans le cortex, à un niveau particulièrement élevé au niveau du tubule contourné distal.

- ***Autres organes***

Par *northern blot* sur différents tissus de souris [33,49] et d'humain [23,50], plusieurs équipes ont montré une très large distribution du transcrit L-WNK1. Son expression est très forte dans le testicule, le cœur, le poumon, le rein, le placenta, le muscle squelettique et le cerveau, et faible un peu partout ailleurs. Choate *et al.* [49] ont étudié la localisation de WNK1 par immunohistofluorescence. La protéine est retrouvée au niveau de nombreux épithelia polarisés, notamment dans les voies biliaires intra- et extra-hépatiques (sur les membranes latérales), dans l'épithélium bordant la lumière de la vésicule biliaire où elle est cytoplasmique, dans les cellules épithéliales des canaux pancréatiques (principaux et interlobulaires, à la membrane latérale), dans l'épididyme (au niveau des jonctions intercellulaires apicales), dans l'œsophage (en cytoplasmique dans les couches basales mais associé à la membrane dans les couches superficielles). WNK1 est donc cytoplasmique dans certaines cellules, sur la membrane latérale dans d'autres cellules. Il est frappant que ces

épithelia sont connus pour leur rôle majeur dans le flux de chlore. Cette localisation a amené les auteurs à rechercher la présence de WNK1 dans les tissus humains impliqués dans la mucoviscidose que sont les glandes sudorales et le colon : la protéine y est retrouvée, de localisation cytoplasmique. Il faut cependant considérer ces résultats avec prudence puisqu'ils ont été obtenus avec un anticorps dirigé contre une portion de la protéine codée par l'exon 12, sujet à épissage alternatif.

Chez l'embryon de souris de 16,5 jours [33], L-WNK1 est exprimé de manière quasi-ubiquitaire, tandis que KS-WNK1 est exprimé aussi mais plus faiblement, dans l'épithélium nasal, le cerveau antérieur, le thymus et le rein. L'expression de L-WNK1 pendant le développement [35] a été étudiée dans notre laboratoire par des souris transgéniques exprimant un BAC (chromosome artificiel de bactérie) contenant le gène rapporteur *nlacZ* dans l'exon 2 de *WNK1* et un codon stop dans l'exon 4a. Cette construction permet de visualiser l'expression de L-WNK1. Le résultat le plus notable est l'expression très forte de L-WNK1 dans l'ensemble du système cardiovasculaire très tôt dans le développement embryonnaire. A l'âge adulte, outre le profil d'expression ubiquitaire attendu, on note une expression forte de L-WNK1 dans le cervelet (figure 6).

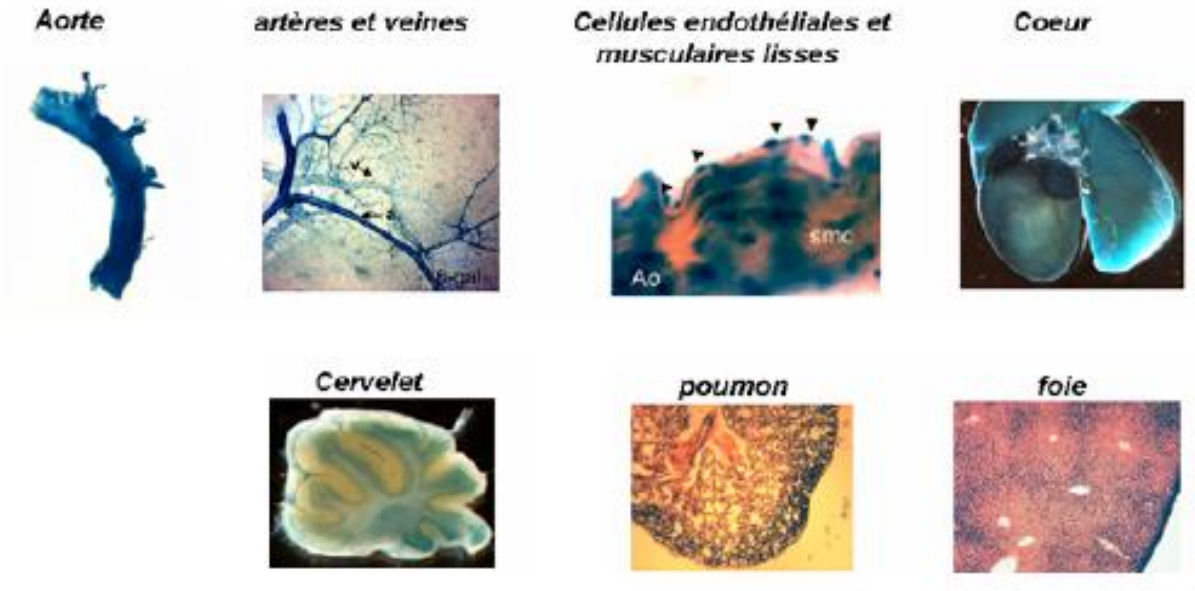


Figure 6: L-WNK1 est exprimé de manière ubiquitaire. Profil d'expression de L-WNK1 obtenu grâce à un modèle transgénique exprimant le gène rapporteur β-galactosidase sous le contrôle du promoteur proximal pP. La coloration bleue indique l'expression ubiquitaire de L-WNK1, en particulier dans le système cardio-vasculaire, mais aussi dans le cervelet, les cellules épithéliales pulmonaires, le foie [35].

b) WNK4

La protéine WNK4 a d'abord été localisée dans le rein, au niveau du néphron distal, dans le tubule contourné distal (DCT) et le tubule connecteur (CNT), surtout au niveau des jonctions serrées, mais également dans le cytoplasme des cellules du canal collecteur chez la souris comme chez l'homme [11 ,51]. Cette localisation a récemment été remise en question par l'équipe d'Uchida [52] qui a développé un nouvel anticorps dirigé contre la portion N-terminale de la protéine. Cet anticorps localise WNK4 au niveau du glomérule dans les podocytes, dans la branche ascendante large corticale (cTAL) de l'anse de Henlé et le DCT dans la partie sous-apicale du cytoplasme, et dans le canal collecteur de façon plus diffuse dans le cytoplasme. WNK4 n'est cette fois jamais localisé au niveau des jonctions intercellulaires. La localisation intrarénale de WNK4 demande donc à être confirmée par de nouvelles études.

Kahle *et al.* [51] font en 2004 la démonstration de l'expression de WNK4 en dehors du rein. Un *northern blot* sur des tissus de souris et d'humain permet en effet de retrouver un transcrit de 5,5 kb très abondant dans le rein, mais détectable également dans le cœur et le testicule. Par RT-PCR sur tissus de souris, WNK4 est détectable dans tous les tissus étudiés sauf le muscle squelettique. De manière concordante, par *western blot* sur des lysats de tissus de souris ou d'humain, la protéine est elle aussi retrouvée dans l'ensemble des tissus étudiés. En immunohistochimie, l'expression de WNK4 est largement préférentielle au niveau des

épithélia polarisés, le plus souvent au niveau des jonctions intercellulaires, aussi bien dans les jonctions serrées que dans les membranes latérales, en particulier dans les canaux pancréatiques, les voies biliaires, l'épididyme, les tubules séminifères, le colon, les glandes salivaires, ainsi que dans l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique. Les localisations de WNK1 et WNK4 se superposent donc largement.

c) WNK2 et WNK3

WNK2 est principalement exprimé dans le cœur, le cerveau et le colon [23].

Les transcrits WNK3 sont retrouvés par RT-PCR dans l'intégralité des tissus étudiés chez l'homme [42]. En particulier, WNK3 est présent dans le système nerveux central, l'hippocampe, le cervelet, le cortex cérébral et la formation réticulée activatrice ainsi que dans les cellules épithéliales de divers organes notamment dans le tube digestif (estomac, intestin, pancréas, voies biliaires) [53]. Au niveau rénal, WNK3 est localisée dans l'ensemble du néphron, avec une expression particulièrement importante dans le tube contourné proximal et la branche ascendante large de l'anse de Henlé et une expression plus faible dans le DCT et le canal collecteur [54].

III. Rôles et mécanismes d'action des WNKs

1. Transports ioniques dans le néphron distal : études *in vitro*

a) Le néphron distal sensible à l'aldostérone ; les cibles théoriques

Le néphron distal joue un rôle-clé dans la régulation de la pression artérielle. En effet, si la majorité du sodium filtré est réabsorbée au niveau du tubule proximal et de l'anse de Henlé, c'est au niveau du néphron distal, en particulier du DCT et du CNT, qu'a lieu la régulation fine de la quantité de sodium présent dans l'urine définitive. La figure 7 schématise les sites de transport de sodium le long du néphron et leurs inhibiteurs pharmacologiques, qui sont mentionnés dans la suite du manuscrit.

Le néphron distal joue également un rôle majeur dans la régulation de la kaliémie puisque la sécrétion régulée de potassium y est assurée par le canal ROMK (Renal Outer Medullary K+ channel). Le néphron distal participe également à l'homéostasie acido-basique en assurant une sécrétion nette de protons conjointement à la régénération de bicarbonates au niveau des cellules intercalaires α. Etant donné le phénotype de l'HHF qui associe des perturbations de l'homéostasie hydrosodée (hypertension), potassique (hyperkaliémie) et acido-basique (acidose métabolique hyperchlorémique), l'immense majorité des études sur le rôle des kinases WNK a porté sur le néphron distal.

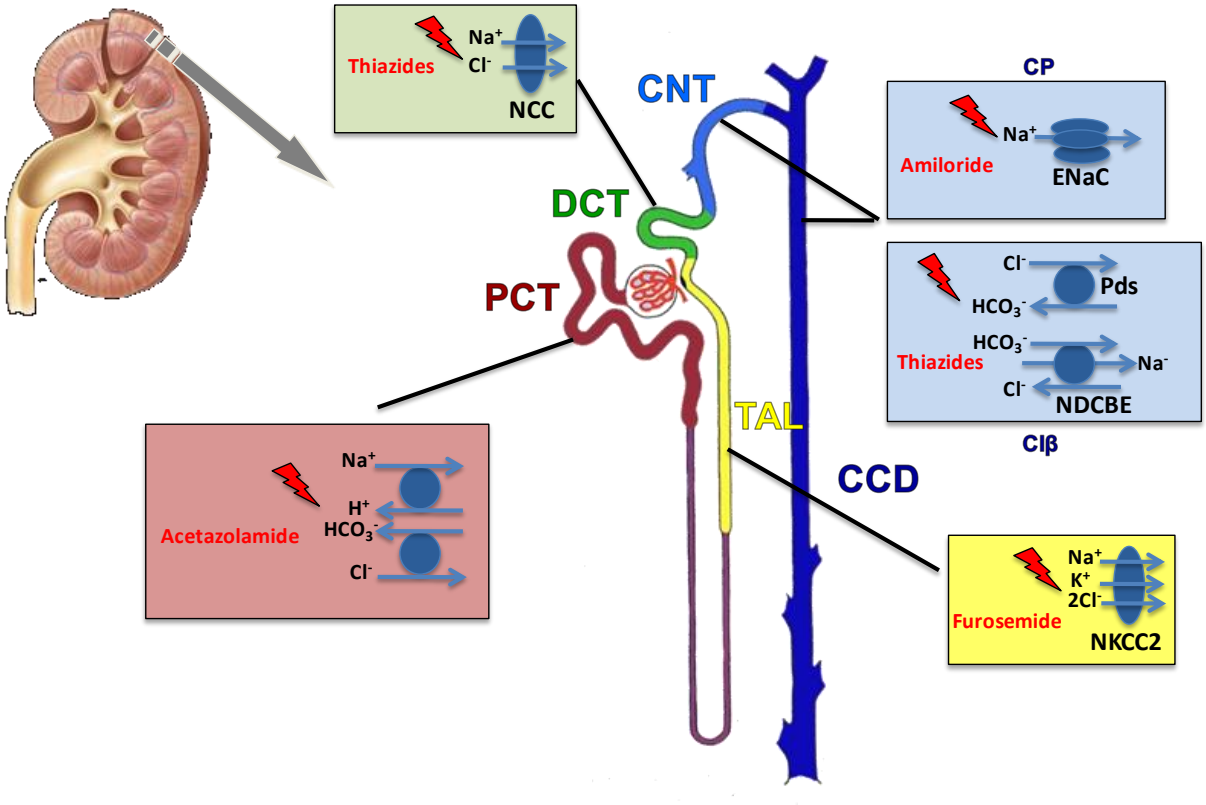


Figure 7 : schéma des principaux sites de transports de sodium le long le néphron et de leurs inhibiteurs pharmacologiques. On estime qu'en conditions normales environ 60% du sodium filtré est réabsorbé dans le tubule proximal (encadré rose), 30% dans l'anse de Henlé (encadré jaune), 7% dans le tubule contourné distal (encadré vert) et 2% dans le tubuleconnecteur (encadrés bleus). En régime normosodé le canal collecteur ne réabsorbe pas de sel. CP : cellules principales ; CIβ : cellules intercalaires de type b ; Pds : pendrine, NDCBE : sodium-driven chloride/bicarbonate exchanger.

Le néphron distal sensible à l'aldostérone est composé de 4 segments: le tubule contourné distal (DCT), lui-même subdivisé en DCT 1 et 2 (ou "early" et "late"), le tubule connecteur (CNT) et le canal collecteur (CCD) [55]. La figure 8 schématise le profil d'expression des principales molécules d'intérêt pour notre problématique dans ces segments.

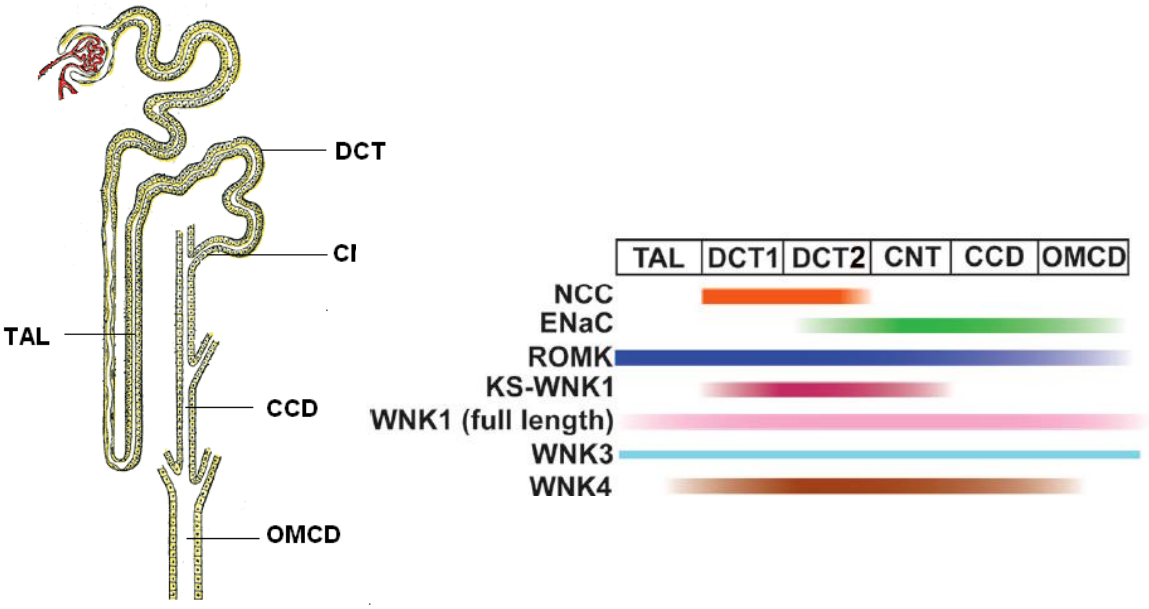


Figure 8 : **Profil d'expression des principaux transporteurs et canaux et des kinases WNK dans le néphron distal.** D'après McCormick *et al.* [56].

- ***Le co-transporteur sodium-chlore (NCC)***

NCC est exprimé spécifiquement dans les cellules du DCT. Si NCC n'est responsable que d'une faible portion (5 à 8%) de la réabsorption du sodium filtré, son importance physiologique est majeure, comme en témoignent l'hypotension des patients atteints du syndrome de Gitelman, où NCC est non fonctionnel, et l'efficacité des diurétiques thiazidiques, traitements anti-hypertenseurs de première ligne.

La régulation de l'activité de ce transporteur, cloné pour la première fois en 1994 [57], est complexe et encore incomplètement élucidée. NCC peut être activé par deux mécanismes : sa phosphorylation dans le domaine cytoplasmique N-terminal et l'augmentation de son expression à la membrane [58]. Sa régulation physiologique peut être résumée ainsi : l'apport alimentaire de sel [59 ,60] et de potassium [60,61,62] régulent négativement NCC. L'angiotensine II et l'aldostérone stimulent l'activité du co-transporteur[63 ,64]

NCC est apparu d'emblée comme une cible théoriquement idéale des kinases WNKs pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le syndrome de Gitelman, dû à une mutation inactivatrice de NCC [65], qui entraîne hypotension artérielle, hypokaliémie, alcalose métabolique et hypocalciurie, est le miroir de l'HHF. De plus, les diurétiques thiazidiques, qui inhibent NCC, corrigent les anomalies de l'HHF.

Pour certains, une augmentation de l'activité de NCC pourrait à elle seule expliquer le phénotype de l'HHF. Le mécanisme avancé est le suivant : une réabsorption de sel augmentée au niveau du DCT diminue la quantité de sel délivrée aux segments en aval. L'activité d'ENaC, et par conséquent du canal ROMK et de la pompe à protons qui assurent respectivement la sécrétion d'ions K^+ et H^+ dans la lumière tubulaire, est alors diminuée.

En accord avec cette hypothèse, Mayan et al [66] ont montré que le taux de NCC dans les urines, supposé refléter son abondance dans l'épithélium du tubule distal, est quatre fois supérieur chez les patients HHF avec une mutation de WNK4 par rapport au taux trouvé chez les apparentés non mutés. De plus, la même équipe a montré une diminution de la pression artérielle en réponse aux diurétiques thiazidiques particulièrement importante chez les patients atteints d'HHF par mutation de WNK4 [19].

- ***Le canal sodium épithélial (ENaC)***

Le canal sodium épithélial (ENaC), assure la réabsorption de sodium dans les segments où il est exprimé, à savoir le DCT2, le CNT et le CCD [55]. La régulation physiologique de son activité est mieux connue que celle de NCC. ENaC est sous le contrôle positif de l'aldostérone, qui induit rapidement et fortement l'expression de SGK1 (Serum and Glucocorticoid activated kinase). SGK1 phosphoryle alors Nedd4-2, qui sous sa forme phosphorylée ne peut plus assurer l'ubiquitination et donc la dégradation de ENaC [67]. L'aldostérone augmente ainsi l'expression d'ENaC à la surface cellulaire. Un régime pauvre

en sodium augmente aussi l'expression d'ENaC surtout au niveau du DCT2 et du CNT. Le CCD n'est concerné par cette augmentation d'expression que pour une teneur extrêmement pauvre en sodium de l'alimentation [55].

Une activité augmentée d'ENaC pourrait en théorie participer à générer l'hypertension par rétention hydrosodée observée dans l'HHF. En revanche elle ne peut en aucun cas expliquer à elle-seule le phénotype puisqu'une activation isolée d'ENaC entraînerait une hypokaliémie.

- ***Le canal potassique ROMK***

ROMK assure la sécrétion de potassium dans la lumière tubulaire et est exprimé à la membrane apicale des quatre segments du néphron distal. Il joue un rôle majeur dans l'homéostasie potassique. Son activité, qui semble dépendre de l'état de phosphorylation de sa partie C-terminale et de son abondance à la membrane [55], est régulée positivement par la teneur alimentaire en potassium avec un rôle permissif de l'aldostérone sur ce phénomène. L'activité de ROMK pourrait aussi être modifiée dans l'HHF, dont le trait le plus constant et le plus précoce est l'altération de la sécrétion rénale de potassium. Rappelons à cet effet que l'hyperkaliémie précède l'apparition de l'hypertension de plusieurs années [4].Les WNKs pourraient donc agir directement sur ROMK en inhibant sa fonction. Même si les souris ayant une inactivation constitutive de ROMK ne présentent pas d'hyperkaliémie [68], une inactivation sélective dans le tubule distal devrait entraîner un phénotype très différent d'une inactivation globale puisqu'elle n'est pas associée à une perte de sel avec augmentation du flux de sodium en distalité.

- ***Réabsorption de chlore***

L'hypothèse d'un shunt du chlore comme anomalie primitive à l'origine de l'HHF a été émise très tôt [7]. En effet, une réabsorption augmentée du chlore augmenterait celle de sodium et inhiberait la sécrétion de potassium *via* une moindre électronégativité luminale. On aurait une hyperkaliémie en miroir du phénomène bien connu qu'est l'hypokaliémie entraînée par la perfusion d'anions non réabsorbables [69]. En faveur de cette hypothèse, plusieurs auteurs ont montré chez les patients HHF le rétablissement d'une kaliurèse adaptée suite à la perfusion de sels sans chlore associé [7,8,70], ce qui montre que la capacité intrinsèque du rein à sécréter du potassium n'est pas altérée. Cette hypothèse est d'autant plus difficile à étayer que les mécanismes du transport du chlore dans le tubule distal sont encore mal connus.

b) Les effets montrés *in vitro*

- ***NCC***

Les deux isoformes de WNK1 ainsi que WNK3, et WNK4 sont coexprimées dans le DCT où elles interagissent pour réguler NCC.

➢ *WNK4 et NCC :*

Les études *in vitro* sur l'interaction entre WNK4 et NCC ont été réalisées le plus souvent dans l'œuf de Xénope ou parfois dans des lignées cellulaires de mammifères. Toutes les publications, quel que soit le modèle choisi, ont montré que WNK4 inhibe l'activité de NCC, en diminuant son expression à la membrane [50,71,72,73,74].

L'interaction fonctionnelle entre les kinases WNK4 présentant une mutation HHF et NCC est en revanche moins claire. La majorité des auteurs a trouvé que les mutants WNK4 perdent au moins en partie la capacité d'inhiber NCC [13,50,71]. En revanche, l'équipe

d'Ellison [73] trouve des résultats divergents selon les mutants : le mutant Q565E a un effet inhibiteur moindre que la forme sauvage tandis que les autres mutants testés ont une action superposable à WNK4 sauvage. L'équipe d'Uchida trouve également que le mutant WNK4 D564A inhibe NCC de la même manière que WNK4 sauvage [74]. Notons cependant qu'il s'agit d'un mutant qui n'a pas été testé par les équipes qui trouvent que les mutants WNK4-HHF perdent leur capacité à inhiber NCC.

De même, la nécessité d'un domaine kinase fonctionnel pour l'effet de WNK4 sur NCC est controversée. L'approche la plus classique consiste à tester l'effet d'un mutant D321A (D318A chez la souris), supposé être dépourvu d'activité kinase. Dans la majorité des études [50,71,72,75], ce mutant perd la capacité d'inhiber NCC, ce qui suggère un rôle clé du domaine catalytique dans l'interaction fonctionnelle entre WNK4 et NCC. Pour l'équipe d'Ellison en revanche [76], ce mutant conserve son action inhibitrice sur NCC. Notons cependant que cette dernière équipe a utilisé un mutant D/A particulier tronqué de ses 167 acides aminés N-terminaux.

Une approche complémentaire consiste à tester l'effet de protéines tronquées incluant ou non le domaine kinase. Ainsi, pour l'équipe d'Ellison [76], WNK4 (1-608) qui inclut le domaine kinase et le motif acide n'a aucun effet sur NCC tandis que la partie C-terminale seule de WNK4 suffit à inhiber NCC. Ces auteurs montrent également que les deux protéines interagissent via leur extrémité C-terminale. Des résultats strictement opposés sont retrouvés par l'équipe de O'Shaughnessy [72] qui montre que WNK4 (1-620) inhibe NCC de la même manière que la protéine sauvage tandis que WNK4 (620-CT) est sans effet. Malgré de multiples essais de pull-down, cette équipe ne parvient pas à mettre en évidence d'interaction directe entre WNK4 et NCC. Des résultats encore différents sont publiés par l'équipe de Gamba [75] : les 173 acides aminés N-terminaux de WNK4, excluant donc le domaine kinase, joueraient un rôle essentiel pour inhiber NCC. Ces résultats divergents pourraient être

expliqués par un effet dominant négatif des protéines WNK4 tronquées ou mutantes exogènes sur la protéine WNK4 endogène.

Si les domaines de WNK4 nécessaires à son activité sur NCC ne sont pas consensuels, le mécanisme par lequel WNK4 diminue l'expression de NCC à la membrane est en voie d'élucidation. Sur un plan théorique, deux possibilités sont à évoquer : soit le ciblage du transporteur à la membrane (transport antérograde) est diminué, soit son retrait de la membrane par endocytose est augmenté. Un dominant négatif de la dynamine (K44A), qui bloque l'endocytose médiée par les clathrines, n'affecte pas l'action de WNK4 sur NCC [71,72]. A l'inverse, la bafilomycine A1, un inhibiteur de la pompe à protons, antagonise partiellement l'effet de WNK4 sur NCC, suggérant une dégradation augmentée par le lysosome [71]. Une diminution du trafic antérograde vers la membrane paraît donc plus probable. Cette hypothèse a été confortée et précisée par une étude récente sur des cellules HEK293 et Cos-7 [77]. Ces auteurs montrent que le mécanisme par lequel WNK4 diminue l'expression de NCC à la membrane est une inhibition du transport antérograde de NCC depuis l'appareil de Golgi, en le détournant vers le lysosome *via* une interaction augmentée avec le complexe AP-3. La sortiline semble également jouer un rôle dans l'adressage de NCC vers le lysosome [78].

WNK4 peut également réguler NCC par un mécanisme indirect. La voie faisant intervenir la kinase SPAK est discutée en détails plus loin. Une autre voie indirecte a été mise en évidence dans une publication récente [79] et montre sur des cellules mDCT, issues de DCT de souris, que WNK4 inhibe NCC en activant ERK1/2, propriété qui est perdue par la mutants HHF.

- *WNK3 et NCC :*

Contrairement à WNK4, WNK3 est un activateur de NCC, par augmentation de l'expression du transporteur à la surface cellulaire [54,80]. Le mutant D924A, dont le

domaine kinase est inactif, perd cette activité [75,81]. Cependant le domaine kinase seul ne suffit pas à activer NCC puisque qu'une forme tronquée de WNK3 (2-420) est sans effet sur NCC [81]. La situation est plus complexe encore, et comme pour WNK4, différentes équipes trouvent des résultats contradictoires. Ainsi, l'équipe d'Ellison [81] a montré qu'une portion C-terminale de la protéine n'incluant pas le domaine kinase active NCC comme la protéine sauvage tandis que, pour l'équipe de Gamba [75], l'effet activateur de WNK3 est médié par les 146 résidus N-terminaux.

WNK3 et WNK4 interagissent également pour réguler NCC [75,81] En effet, WNK3 et WNK4 s'associent dans un complexe protéique, en interagissant par leurs domaines C-terminaux, et chacun inhibe l'action de l'autre de manière dose-dépendante. Par contre, le mutant WNK4-Q562E perd complètement la faculté de bloquer l'activation de NCC par WNK3. Plus précisément, WNK4 mutant inhibe l'action de WNK4 sauvage de manière dose-dépendante : il en est donc un dominant négatif. La co-expression *in vitro* de WNK3 et WNK4 élargit considérablement l'échelle d'activité possible de NCC par rapport à l'expression de chacun seul, depuis une activité négligeable quand il y a beaucoup plus de WNK4 que de WNK3 jusqu'à très élevée quand c'est l'inverse. Quand le mutant WNK4 HHF est présent, l'activité de WNK4 sauvage est bloquée, laissant WNK3 exercer son effet stimulant de NCC sans opposition. Ce modèle permettrait de comprendre comment un seul allèle muté de *WNK4* entraîne une activation de NCC.

- *L- et KS-WNK1*

L-WNK1 et KS-WNK1 n'ont pas d'effet direct sur NCC. En revanche, L-WNK1 peut activer indirectement le co-transporteur, soit en antagonisant l'effet inhibiteur de WNK4 sur NCC [72,73,76], soit en phosphorylant SPAK qui à son tour phosphoryle et active NCC [47,82,83]. La nécessité d'un domaine catalytique fonctionnel pour la régulation de WNK4

par WNK1 est, encore une fois, controversée [72,76]. KS-WNK1 agit quant à lui comme un dominant-négatif de L-WNK1 : il diminue l'activité de NCC en inhibant L-WNK1.

- ***ROMK***

Toutes les études *in vitro* sur l'œuf de Xénope ou les cellules HEK293 montrent que WNK1 [84,85,86], comme WNK4 [13,27,87,88], diminuent l'activité de ROMK. Cet effet ne résulte pas de la modification de l'activité intrinsèque du canal [89] mais d'une diminution de son expression à la membrane [13,84,85,86,88,89]. Pour WNK1 [84] comme WNK4 [88], le mécanisme de cette moindre expression à la membrane est une augmentation de l'endocytose médiée par les clathrines. Les deux kinases interagissent avec l'intersectine et cette interaction joue un rôle crucial dans l'augmentation de l'endocytose [87].

L'augmentation de l'endocytose ne semble pas dépendre de l'activité kinase de WNK4 puisque le mutant dont le domaine kinase est déficient, WNK4 D318A [88] ou encore WNK4 amputé de son domaine kinase [88], ont la même activité que la protéine sauvage. Concernant WNK1, les auteurs sont moins unanimes puisque pour certains le domaine kinase de WNK1 est essentiel pour augmenter l'endocytose de ROMK [85,86] tandis que pour d'autres la mutant kinase inactif WNK1 D368A a la même activité que la protéine sauvage, démontrant que l'activité kinase n'est pas nécessaire [84].Une étude plus récente surmonte ces contradictions apparentes en suggérant que ce n'est pas l'activité kinase en elle-même qui est importante, mais le repliement correct de la protéine, lui-même dépendant des charges d'acides aminés conservés du domaine kinase [90]. De ce fait, une activité non catalytique de WNK1 peut malgré tout nécessiter la présence d'un domaine kinase intact.

Le motif acide de WNK4 semble essentiel à son action sur ROMK [27]. WNK4 interagit avec l'extrémité C-terminale de ROMK [88]. ROMK contient, à proximité de l'extrémité C-terminale, un domaine NPXY-like. Ce domaine est commun à de nombreuses

protéines membranaires et est impliqué dans le processus d'endocytose médié par les clathrines [91]. Ce domaine est indispensable à la modulation de ROMK par WNK4. En effet, l'effet inhibiteur de WNK4 sur ROMK est perdu lorsque le domaine NPXY-like est délété ou muté [88]. Enfin, les mutants WNK4 HHF montrent une plus forte inhibition de ROMK que WNK4 sauvage [13,87,88], possiblement par une interaction renforcée avec l'intersectine [87].

Pour WNK1, les données sont contradictoires puisque l'équipe de Dallas [85] attribue un rôle clé au domaine N-terminal, en particulier aux motifs riches en proline qui permettent l'interaction avec l'intersectine, tandis que l'équipe de Cambridge [84] trouve qu'une construction WNK1 (502-1100), qui contient en particulier le motif acide, a le même effet que la protéine sauvage. Ces résultats apparemment contradictoires sur la régulation de ROMK par WNK1 reposent sur l'utilisation de fragments tronqués de WNK1. La réalité mécanistique de la régulation de l'endocytose de ROMK par WNK1 paraît de fait extrêmement complexe et fait intervenir de multiples interactions inter-ou intramoléculaires entre différents domaines de WNK1 [90]. Notons enfin que l'inhibition de ROMK par WNK1 est synergique mais non dépendante de WNK4. KS-WNK1 n'a pas d'effet direct sur ROMK mais agit comme un dominant négatif de L-WNK1, dont il antagonise l'effet inhibiteur [85,86,92]. Deux domaines de KS-WNK1 semblent lui conférer cette propriété : les 30 acides aminés codés par l'exon 4a et le domaine équivalent du domaine auto-inhibiteur de WNK1 [92].

WNK3, comme WNK1 et WNK4, inhibe l'activité de ROMK par diminution de son expression à la surface membranaire, ce de manière indépendante de l'activité kinase. L'extrémité C-terminale semble médier l'effet de WNK3 sur ROMK puisque une forme tronquée WNK3 (418-1742) a le même effet que la forme sauvage [89].

- ***ENaC***

Xu *et al.* [93] montrent par des expériences de transfection dans des cellules HEK293 et CHO que WNK1 active ENaC via SGK1. En effet, SGK1 phosphorylé par L-WNK1 phosphoryle à son tour Nedd4-2, ce qui diminue l'interaction de ce dernier avec ENaC et donc l'endocytose du canal.

De manière surprenante, une étude a montré que KS-WNK1 pourrait également être un régulateur positif d'ENaC. En effet, l'expression de KS-WNK1 dans une lignée de CCD de souris augmente l'activité d'ENaC. De même, dans des cellules thyroïdiennes de rat dans lesquelles les trois sous-unités d'ENaC sont transfectées, l'expression ectopique de KS-WNK1 augmente le courant sodium sensible à l'amiloride [94]. Cette régulation dépend de la présence des motifs PY situés dans la partie C-terminale de chaque sous-unité d'ENaC, sites de liaison de Nedd4-2. En effet KS-WNK1 n'entraîne plus d'activation des courants sodiques lorsque ces motifs PY sont mutés.

WNK4 sauvage inhibe l'activité d'ENaC par un mécanisme indépendant de son activité kinase dans l'œuf de Xénope [95]. Cette inhibition requiert là aussi des motifs PY intacts dans les extrémités C-terminales des sous-unités β et γ d'ENaC. Les mutants WNK4 HHF perdent cet effet inhibiteur.

- ***Réabsorption de chlore***

Deux groupes indépendants [48,96] ont montré la même année par des expériences d'électrophysiologie sur des cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) que WNK4 et WNK1 augmentent le flux paracellulaire de chlore [48,96,97] et que les mutants WNK4 HHF entraînent un effet plus marqué. Le mécanisme serait dépendant de l'activité kinase puisque le mutant WNK4-D318A perd cette activité [96]. Cet effet s'accompagne d'une phosphorylation des claudines 1-4 sur leur domaine C-terminal, phosphorylation qui est plus marquée avec les mutants HHF [48,97]. Une troisième étude a confirmé que WNK4, et plus encore un mutant

HHF, augmente la perméabilité paracellulaire au chlore et a identifié la claudine-7 comme autre substrat de la kinase au niveau des jonctions serrées [98]. Le tableau 2 et la figure 9 résument les principaux effets des kinases WNKs dans le tubule distal démontrés in vitro.

A	L-WNK1 ⊣ KS-WNK1
NCC	↑
ROMK	↓
Cl paracellulaire	↑
ENaC	↑

B	WNK4 sauvage	WNK4 PHA2
NCC	↓	↑
ROMK	↓	↓↓
Cl paracellulaire	↑	↑
ENaC	↓	↑

Tableau 2 : résumé des effets de L-WNK1 et KS-WNK1 (A) et de WNK4 sauvage ou mutant HHF (B) sur les principaux canaux et transporteurs ioniques du tubule distal

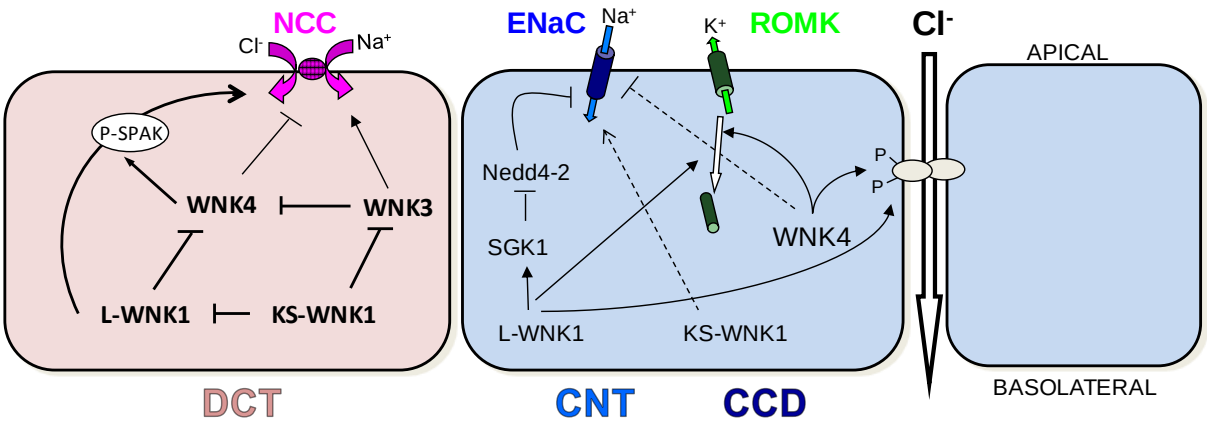


Figure 9: Récapitulatif des principaux effets des WNKs dans le tubule distal démontrés *in vitro*. Sont représentées schématiquement une cellule du DCT, caractérisée par l'expression de NCC et une cellule principale ou CNT ou du CCD, caractérisée par l'expression de ENaC et ROMK. La lumière tubulaire est en haut, du côté de la membrane apicale.

- ***Autres transporteurs :***

➢ *KCC*

Les mammifères ont 4 isoformes de co-transporteurs potassium-chlore (KCC), qui permettent l'efflux de chlore de la cellule et sont inactivés par phophorylation [99]. KCC1, 3 et 4 sont exprimés, entre autres, dans le rein tandis que KCC2 est spécifique des neurones (pour revue, voir [100]). Dans l'œuf de Xénope, WNK4 inhibe l'activité de KCC1, 3 et 4 [101], et KCC2 [45], effet qui nécessite un domaine catalytique fonctionnel. Les mutants WNK4-HHF ont le même effet inhibiteur que WNK4 sauvage. WNK3 inhibe également fortement l'activation des co-transporteurs KCC [53,102].

➢ *NKCC1 et 2*

NKCC1 et 2 appartiennent aux co-transporteurs cation-chlore. Ils ont de longues extrémités intracellulaires N- et C-terminales et 12 domaines transmembranaires [103].

NKCC1 est ubiquitaire tandis que NKCC2, cible des diurétiques de l'anse, est exprimé à la membrane apicale de la branche ascendante large de Henlé où son inactivation est responsable du syndrome de Bartter.

Concernant la régulation de NKCC1 par WNK4, les résultats sont contradictoires. Kahle *et al*. [51] ont montré sur l'œuf de Xénope que WNK4 est un puissant inhibiteur de NKCC1, par diminution de l'expression à la membrane du co-transporteur sans modification de la quantité totale de la protéine. Pour Gagnon *et al.*, au contraire, WNK4 active NKCC1, à condition que SPAK soit co-exprimé et que les domaines kinases des deux protéines soient fonctionnels [45].

Dans l'œuf de Xénope, WNK3 active NKCC1 et NKCC2 [53 ,104]. Cette action combinée à son inhibition de KCC1-2 confère à WNK3 un rôle essentiel dans la protection des cellules vis-à-vis d'un stress osmotique en maintenant le volume intracellulaire par adaptation de la concentration intracellulaire en chlore à l'osmolarité extracellulaire.

- *TRPV4, 5 et 6*

La famille des canaux TRP (transient receptor potential) est une large famille de canaux cationiques. Fu *et al.* [105] ont montré par des études de cotransfection dans des cellules HEK293 que WNK1 et WNK4 inhibent TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4, transporteur cationique non sélectif impliqué dans la régulation osmotique systémique et cellulaire) en diminuant son expression à la surface cellulaire. Les mutants WNK4-HHF ont un effet moindre mais non nul.

TRPV5 (transient receptor potential vanilloid 5), est un canal calcique de l'épithélium rénal, exprimé uniquement dans le DCT et le CNT, responsable de la réabsorption active de calcium. WNK4 augmente le flux de calcium médié par TRPV5 en augmentant son expression à la surface cellulaire [106,107]. WNK3 augmente l'activité de TRPV5, et de son homologue intestinal TRPV6 dans l'œuf de Xénope [108]. Cet effet nécessite un domaine

kinase fonctionnel puisqu'il est perdu par un mutant WNK3 D294A. L'activation de TRPV5 est pour ces auteurs en rapport avec une augmentation de son transport vers la membrane depuis les stocks intracellulaires.

- ***Rôle central des kinases SPAK et OSR1***

SPAK (Sterile 20/SPS21-related Proline/Alanine-rich Kinase) et OSR1 (Oxidative Stress-Responsive Kinase-1) sont deux kinases très proches de la sous-famille des kinases STE20, qui ont en commun un motif sérine et un domaine C-terminal conservé. SPAK et OSR1 ont un domaine kinase en N-terminal et une extrémité C-terminale de 92 acides aminés qui sert d'ancrage à d'autres protéines [109]. Elles ont initialement été identifiées comme les kinases activatrices du co-transporteur NKCC1. Si OSR1 est exprimé à des taux comparables dans l'ensemble des tissus, et au niveau du rein tout le long du néphron [110], l'expression de SPAK est plus variable, avec une expression assez faible dans le rein total, où elle est spécifiquement détectable dans la branche ascendante large de l'anse de Henlé et dans le DCT [111], et faiblement présente aussi dans le CNT et le CCD.

De nombreuses études *in vitro* ont permis de disséquer les différentes étapes de la cascade permettant la régulation de NCC, KCC1-4 et NKCC1-2 par les kinases SPAK et OSR1[25 ,45,47,82,83,104,109,112,113,114,115,116,117].

Le stimulus mettant en jeu cette cascade est toujours un stress osmotique par déplétion du milieu en chlore [25 ,45 ,83 ,104 ,109 ,115]. Dans ces conditions [25,83,104,109,113,115], les co-transporteurs NKCC1-2, NCC et KCC1-4 sont phosphorylés, ce qui conduit à l'activation des trois premiers et à l'inactivation du dernier [45], l'ensemble permettant de conserver le chlore à l'intérieur de la cellule. Rappelons en effet que NKCC1-2 et NCC sont activés par phosphorylation au niveau de leur extrémité N-terminale

[104,109,115], tandis que KCC, co-transporteur potassium-chlore qui fait sortir ces deux ions hors de la cellule, est inactivé par phosphorylation [53].

Dans cette cascade, les kinases WNK1 [47,82,83], WNK4 [45,47] et WNK3 [104] se situent en amont de SPAK/OSR1, qu'elles activent en les phosphorylant. Notons que WNK1 phosphoryle SPAK et OSR1 de manière beaucoup plus importante que WNK4 [82]. Cette phosphorylation de SPAK et OSR1 augmente nettement leur activité, estimée par la phosphorylation de l'extrémité N-terminale de NKCC1 [47]. Cette activation de SPAK/OSR1 par les WNKs nécessite une interaction entre les kinases. Cette interaction a été montrée pour WNK1 [82,109] comme pour WNK4 [45] et WNK3 [104], et se fait entre un motif RFXV/I (Arg-Phe-X-Val/Ile) des WNKs et l'extrémité C-terminale de SPAK et OSR1 [45,109,112]. Ainsi le mutant WNK4 F997A, qui n'interagit plus avec SPAK, entraîne non plus une activation mais une légère inhibition de NKCC1 [45]. De même, la mutation de l'unique domaine de liaison à SPAK dans WNK3 empêche l'activation de NKCC2 par la baisse du chlore intracellulaire [104].

L'activation de SPAK/OSR1 par les WNKs nécessite de plus que le domaine kinase des WNKs soit fonctionnel. Ainsi, des mutants dont le domaine kinase est déficient (WNK1 D368A [47], WNK4 K183M, K186A ou D321A [45,47], ou WNK3 D294A [104]) perdent la capacité de phosphoryler SPAK et OSR1. L'activation de SPAK et OSR1 repose sur la phosphorylation d'une thréonine du domaine catalytique [113] (thréonine 233 pour SPAK et 185 pour OSR1 [47]), et d'une sérine de l'extrémité C-terminale (sérine 373 pour SPAK et 325 pour OSR1 [47,83]). Si l'on mute la thréonine 185 d'OSR1 pour une alanine (non phosphorylable), OSR1 n'est plus activable. En revanche, si l'on mute ce résidu pour l'acide glutamique, qui mime sa phosphorylation, alors l'activité d'OSR1 est multipliée par 20 et devient non stimulable par WNK1 [47]. Le rôle de la sérine est moins clairement élucidé. En accord avec ces résultats, l'activité kinase d'OSR1 est diminuée suite à l'inhibition de WNK1

par ARN interférence. De plus, la déplétion de WNK1 ou d'OSR1 par la même technique diminue l'activité des co-transporteurs NKCC1-2 [25,82].

Récemment, les isoformes α et β de la protéine MO25 (Mouse protein-25) ont été identifiées comme de nouveaux activateurs très puissants de l'activité kinase de SPAK et OSR1 sur les substrats NKCC1, 2 et NCC [118]. MO25 est une protéine hautement conservée, d'expression ubiquitaire mais en particulier fortement exprimée dans le rein, qui jusque là était surtout connue comme nécessaire à l'activation du suppresseur de tumeurs LKB1 via la liaison avec la pseudokinase STRAD (STE20 Related Adaptor). Or STRAD appartient à la famille de protéine kinases Ste 20, et les membres de cette famille qui en sont le plus proches sont les kinases SPAK et OSR1. MO25 interagit avec SPAK et OSR1 et augmente leur activité kinase d'un facteur 100, à condition que ces dernières soient phosphorylées sur la théronine de leur domaine catalytique par WNK1.

SPAK et OSR1 interagissent *via* leur extrémité C-terminale avec NKCC1-2 et NCC. Ce domaine C-terminal de 92 acides aminés de SPAK et OSR1 parait donc être un point d'ancrage à la fois pour ses activateurs WNK1 et WNK4 et pour ses substrats. L'interaction se fait avec des motifs N-terminaux RFXV sur NKCC1-2 [109,117] et RFXI sur NCC [115]. Un peptide contenant le motif RFXV permet d'ailleurs de purifier SPAK et OSR1 à partir d'un lysat cellulaire [109]. Les résidus du domaine conservé C-terminal de SPAK et OSR1 qui interagissent avec ce motif ont été identifiés et leur mutation bloque la phosphorylation de NKCC1. De même, la mutation des deux sites de liaison à SPAK sur NKCC1 empêche son activation [45] et la phosphorylation de NCC dépend de l'interaction avec SPAK et OSR1 *via* son motif RFXI [115].

La situation est possiblement plus complexe qu'initialement décrit. Certains contestent en effet que l'interaction entre SPAK et le co-transporteur cible et la phosphorylation du co-transporteur soient directement liés [114]. SPAK pourrait servir de *scaffolding protein*

permettant à NKCC1 d'être phosphorylé par une autre kinase impliquée dans la réponse cellulaire au stress. A l'inverse certains pensent que SPAK pourrait activer sa cible sans interagir directement avec elle. Ainsi, récemment, un nouvel acteur important pour la phorphorylation de NCC, la γ-adducine, a été identifié [119]. Cette protéine, identifiée par *pull down* avec l'extrémité N-terminale de NCC dans du lysat de rein de souris combiné à la spectroscopie de masse, active le transporteur *in vitro* dans l'œuf de xénope et protège NCC de l'action inhibitrice de WNK4. Les auteurs suggèrent que la γ-adducine, qui n'est pas elle-même une kinase, permettrait l'ancrage d'une kinase telle SPAK ou OSR1 au transporteur non phosphorylé. NCC serait alors phosphorylé, puis la γ-adducine se détacherait du transporteur. Ces études qui contredisent le schéma généralement retenu selon lequel SPAK interagit directement avec sa cible et la phosphoryle demandent à être confirmées.

Les résidus phosphorylés de NKCC1 sont les thréonines 203, 207 et 212 [109]. Pour NKCC2, les kinases SPAK et OSR1 phosphorylent les thréonines 95, 100 et 105 et possiblement la serine 91. La sérine 130 est également phosphorylée en réponse à un stress osmotique mais par une voie indépendante de SPAK/OSR1 [117]. La région N-terminale régulatrice de NCC est également phosphorylée sur trois résidus thréonine (46, 55 et 60), la thréonine 60 jouant un rôle crucial pour l'activité du transporteur. La mutation de la Thréonine 60 en Alanine inhibe la phosphorylation des deux autres thréonines et l'activation de NCC dans des cellules HEK293 soumises à un stress osmotique [115]. De plus, la mutation humaine de la thréonine 60 pour une méthionine est responsable d'un syndrome de Gitelman [120]. En présence de MO25 [118], les transporteurs sont phosphorylés sur les mêmes résidus que décrits plus haut, mais des sites additionnels sont identifiés (la sérine 73 dans le cas de NCC).

Notons enfin que l'importance fonctionnelle de cette cascade est soulignée par sa conservation entre les espèces. Ainsi, cette voie de signalisation a été étudiée chez le

nématode *Caenorhabditis elegans* [112]. Dans cet organisme, l'invalidation de WNK1 comme celle de GCK-3 (Germinal Centre Kinase 3 ; équivalent de SPAK et OSR1) empêche le rétablissement du volume initial et la survie après réduction de volume par stress hypertonique. WNK1 et GCK-3 semblent fonctionner dans la même voie, le premier en amont du second de manière similaire à ce qui a été décrit chez les mammifères. L'activation de GCK-3 par WNK1 semble inactiver un canal chlore, CLH-3, qui est impliqué dans la formation des canaux excréteurs [121]. Une analyse phylogénétique suggère que l'interaction entre les deux kinases WNK et SPAK est apparue chez les premiers métazoaires et a coïncidé avec la nécessité pour les organismes pluricellulaires de réguler les transports transépithéliaux pour maintenir l'homéostasie osmotique [112].

- ***Limites des modèles in vitro***

L'œuf de Xénope est un modèle éloigné de la physiologie du néphron distal. Même si certains de ces travaux ont été réalisés sur des cellules épithéliales rénales, comme les cellules MDCK, présentant des jonctions serrées, et où WNK4 est exprimé *in vivo*, leur interprétation est limitée en l'absence de confrontation à des modèles *in vivo*. Les limites de ces modèles sont évidentes lorsque l'on voit les résultats discordants parfois même contradictoires selon les équipes. Ainsi, le fait que toutes les mutations WNK4 n'entraînent pas les mêmes conséquences limite la validité des résultats obtenus *in vitro*, qui doivent être interprétés avec prudence [122]. De même, Yang et al [74] ont montré dans des cellules MDCKII que la localisation apicale de deux autres transporteurs qui n'ont aucun lien avec l'HHF, BAT1 (sodium-independent amino acid transporter) et Bsep (bile salt export pump), tous deux localisés à la membrane apicale aussi bien *in vivo* que dans les cellules MDCKII, est elle aussi inhibée par WNK4 sauvage ou muté. L'inhibition des différents transporteurs par WNK4 observée *in vitro* pourrait donc être un phénomène tout à fait aspécifique.

On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer les résultats parfois contradictoires des études *in vitro*. La plus évidente est l'éventuel effet dominant négatif de certaines protéines tronquées sur des protéines endogènes. On peut également rappeler ici les travaux de l'équipe de Huang (Wang, liu, Huang, AJPRP 2008) qui montrent qu'outre leur activité catalytique, les résidus conservés des domaines kinases, souvent mutés pour tester le rôle de l'activité kinase dans la fonction d'une protéine, jouent également un rôle important dans le repliement et la conformation tridimensionnelle de la protéine, si bien qu'un activité non catalytique peut nécessiter la présence d'un domaine kinase intact. Rappelons enfin que certains effets attribués à l'activité kinase de WNK4 pourraient être le fait de kinases plus petites co-purifiées avec WNK4 [46].

Même si elles peuvent trouver diverses explications, ces contradictions posent la question de la pertinence physiopathologique de ces résultats *in vitro*. Devant ces limites, plusieurs équipes ont généré des modèles animaux génétiquement modifiés pour étudier les kinases WNK.

2. Apport des modèles animaux

a) L-WNK1

Des souris *WNK1*$^{+/-}$ [123] ont été générées par « gene-trap ». Le vecteur rétroviral s'est inséré dans l'intron 1 de *WNK1*, ce qui a pour conséquence la diminution de moitié de l'expression de L-WNK1 sans altération de l'expression de KS-WNK1 [124]. La pression artérielle des souris *WNK1*$^{+/-}$ a été initialement retrouvée diminuée en comparaison aux souris sauvages par sphygmomanométrie (*tail-cuff*) chez des souris qui étaient encore sur fond génétique mixte 129/SvEvBrd et C57BL/6J. Plus récemment, notre équipe a mesuré la

pression artérielle par télémétrie chez des souris sur fond pur C57BL/6N, et n'a retrouvé aucune différence entre les deux groupes d'animaux. Les ionogrammes sanguin et urinaire ne sont pas modifiés. Le phénotype rénal reste à explorer, car si les souris ont été soumises à un régime pauvre en sel pendant 3 semaines, elles n'ont été placées en cages à métabolisme que la troisième semaine, ce qui ne permet pas de mettre en évidence un retard de freination de la natriurèse. En effet, à la 3ème semaine d'une modification de régime, il n'est pas surprenant que les souris aient atteint un état d'équilibre avec une natriurèse égale aux apports. En revanche, le phénotype vasculaire a été étudié en détail : les souris *L-WNK1*$^{+/-}$ ont une altération de la contractilité vasculaire en réponse à la stimulation de la voie α-adrénergique, avec une moindre phosphorylation de SPAK et NKCC1 dans les vaisseaux (voir paragraphe 3-a).

L'inactivation de *WNK1* à l'état homozygote [123,125] est quant à elle létale *in utéro* entre 10,5 et 12,5 jours de vie embryonnaire [125] par anomalies de développement du système cardiovasculaire.

b) KS-WNK1

Liu *et al.* [92] ont généré des souris transgéniques surexprimant la portion 1-253 de KS-WNK1 sous le contrôle d'un promoteur spécifique du rein. Le transgène s'exprime de la branche ascendante large de Henlé au canal collecteur. Cette forme tronquée de KS-WNK1, qui contient entre autres les 30 premiers acides aminés codés par l'exon 4a et domaine auto-inhibiteur, suffit à inhiber L-WNK1 *in vitro*. Ces souris ont une kaliémie inférieure (3,9 *vs* 4,9 mmol/l) et une fraction d'excrétion urinaire de potassium supérieure aux souris sauvages (11,5 *vs* 5,1 %). De plus, elles ont une plus grande abondance de ROMK à la membrane apicale du néphron distal. Dans une publication ultérieure [126], les auteurs rapportent que les souris transgéniques ont une Pression Artérielle Systolique (PAS) mesurée par *tail-cuff*

légèrement inférieure à celle de souris sauvages et une aldostérone plasmatique deux fois plus élevée malgré l'hypokaliémie. Lors du passage d'un régime normosodé à un régime sans sel, la natriurèse des souris transgéniques chute moins rapidement que celle des souris sauvages, l'ensemble permettant de conclure à une tendance à la perte de sel chez ces souris. En accord avec ce phénotype, l'expression et la phosphorylation de NCC et NKCC2 sont diminuées chez les souris transgéniques par rapport aux souris sauvages.

Récemment, deux modèles de souris *KS-WNK1*$^{-/-}$ ont été générés [126,127]. De manière surprenante, ces souris n'ont que peu de différence phénotypique avec les souris contrôles alors que la très forte expression de KS-WNK1 dans le DCT laissait présager un rôle physiologique majeur de cette isoforme. Les souris *KS-WNK1*$^{-/-}$ ont une expression et une phosphorylation de NCC [126,127] et NKCC2 [126] augmentées, avec une réabsorption sodée augmentée comme en témoigne une aldostéronurie diminuée [127]. La Pression Artérielle Diastolique (PAD), mesurée par télémétrie, est légèrement supérieure chez les souris *KS-WNK1*$^{-/-}$. La PAS pourrait être légèrement supérieure après deux semaines de régime riche en sel [126], mais dans cette expérience la pression artérielle a été mesurée par *tail-cuff* et augmente même chez les souris contrôles, ce qui est surprenant après seulement deux semaines de régime modérément hypersodée (4% NaCl). L'expression membranaire de la forme clivée de αEnaC et γENaC ainsi que de la forme non clivée de αEnaC est diminuée. En accord avec ce résultat, les souris *KS-WNK1*$^{-/-}$ ont réponse diurétique et natriurétique à l'amiloride abolie. Malgré l'activation de NCC et l'inhibition de ENaC, les souris ne sont pas hyperkaliémiques, ce qui est peut-être à rapporter à l'expression apicale augmentée de ROMK dans le DCT et le CNT [127].

c) WNK4

Les modèles animaux destinés à étudier WNK4 sont plus nombreux.

L'équipe de Lifton [128] a généré des souris transgéniques exprimant soit deux copies supplémentaires du gène *WNK4* sauvage (*TgWnk4*^{WT}) soit deux copies supplémentaires du même gène présentant la mutation Q562E (*TgWnk4*^{PHAII}). Les souris *TgWnk4*^{WT} ont une pression artérielle plus faible, une kaliémie et réserve alcaline similaires et une chlorémie légèrement plus faible que celles des souris sauvages. Les souris *TgWnk4*^{PHAII} ont une pression artérielle plus élevée (en télémétrie comme en *tail-cuff*), une kaliémie plus élevée (5,2 vs 4,5 mmol/l) sans augmentation de la kaliurèse, une réserve alcaline plus faible, une chlorémie plus élevée, une calcémie similaire avec une nette augmentation de la calciurie par rapport aux souris sauvages. Sous régime riche en potassium, les souris *TgWnk4*^{PHAII} augmentent leur kaliémie jusqu'au décès sans aucune adaptation rénale. Sous régime pauvre en potassium, les souris *TgWnk4*^{WT} diminuent leur kaliémie.

Les souris *TgWnk4*^{PHAII} ont une hyperplasie du DCT avec un très fort immunomarquage pour NCC. On note un profil inverse chez les souris *TgWnk4*^{WT}, qui ont également un niveau d'expression transcriptionnelle de ROMK plus élevé. L'inactivation génique ou pharmacologique de NCC corrige l'ensemble des anomalies des souris *TgWnk4*^{PHAII}, suggérant que le phénotype observé est entièrement dépendant de l'activité de NCC. Ce modèle animal vient donc conforter les résultats obtenus *in vitro* selon lesquels WNK4 sauvage inhibe NCC tandis que le mutant l'active. Les souris *TgWnk4*^{WT} ont un niveau d'expression de ROMK plus élevé que les sauvages. Selon les auteurs, la régulation de la kaliémie doit être interprétée comme une conséquence des modifications de NCC et non comme un effet direct de la surexpression de WNK4 sauvage ou muté sur ROMK. L'hypertension semble aussi être la conséquence de la seule activation de NCC; cependant le canal ENaC pourrait lui être intrinsèquement activé chez les souris *TgWnk4*^{PHAII} puisque l'épithélium du colon des souris mutées a un flux de sodium sensible à l'amiloride augmenté [95].

Pour éviter les biais de la transgenèse, des souris porteuses de la mutation D561A à l'état hétérozygote ont été générées par la technique de *knock-in* [129]. La localisation et le niveau d'expression de l'allèle *WNK4* muté sont par conséquent similaires à la forme sauvage. Par rapport aux souris sauvages, les souris mutées ont une hyperkaliémie modérée dès 1,5 mois (4,2 *vs* 3,9 mmol/L) puis plus sévère à 3,5 mois (4,9 *vs* 4 mmol/l) avec une fraction d'excrétion urinaire de potassium plus faible (9% *vs* 12%) et une acidose métabolique. A 3,5 mois, elles présentent une hypertension très marquée (PAS: 142 mmHg *vs* 119 mmHg). Le phénotype est corrigé partiellement ou complètement par l'injection intra-péritonéale de 5 ou 50 mg/kg/j d'hydrochlorothiazide, respectivement. Au niveau moléculaire, l'expression membranaire de NCC et de sa forme phosphorylée (pNCC) est supérieure chez les souris mutées. De plus, on note une augmentation des formes phosphorylées de SPAK et OSR1. L'expression protéique des sous-unités α et β de ENaC ainsi que de leur forme clivée est également augmentée, en accord avec des expériences de microperfusion de CCD qui suggèrent une activité augmentée d'ENaC, sans augmentation de la perméabilité au chlore. L'expression de ROMK est inchangée tandis que celle de la sous-unité α du canal potassique BKCa (Ca^{2+}-dependent K^+ channel) est augmentée. Enfin, la modulation de la cascade SPAK/OSR1/NCC par la teneur en sel dans l'alimentation, observée chez les souris sauvages, est perdue chez les souris mutées [130]. Les auteurs concluent que la physiopathologie de l'HHF par mutation de WNK4 repose sur l'augmentation de l'activité de NCC suite à la phosphorylation de SPAK/OSR1. Pour eux l'activation d'ENaC serait un phénomène secondaire à l'activation de NCC. Cependant, d'une part l'activation est à confirmer, et d'autre part une activation d'ENaC n'est pas en théorie attendue en réaction à une activation de la réabsorption de sel par le segment d'amont, ce point reste donc à explorer plus avant.

La même équipe a généré des souris « hypomorphes » WNK4. Dans ce modèle, *WNK4* présente une délétion des exons 7 et 8 (qui incluent le premier domaine coiled-coil et

le motif acide), ce qui lui confère une activité kinase, évaluée par la phoshorylation de SPAK, diminuée. Les souris obtenues ne présentent ni hypokaliémie ni alcalose métabolique mais ont une pression artérielle diminuée, avec une expression diminuée des formes phosphorylées de SPAK/OSR1 et NCC, et une tendance à la perte de sel sous régime pauvre en sodium. Les canaux potassiques ROMK et BKCa ne sont pas affectés. ENaC est activé, sans doute en réponse à la moindre activité de NCC. Pour ces auteurs, WNK4 est donc bien un régulateur positif de la cascade OSR1/SPAK–NCC. Cependant, l'interprétation de cette étude est limitée par le modèle, puisque ce mutant dit hypomorphe peut aussi avoir des interactions modifiées avec ses partenaires.

L'équipe de Gamba a récemment publié un modèle de souris *knock out WNK4*$^{-/-}$ ayant une inactivation constitutive de WNK4 [131]. Ces souris sont viables, naissent dans les proportions mendéliennes attendues et ont un développement normal. Elles ont un phénotype discret de type « Gitelman », à savoir une pression artérielle normale au prix d'une rénine élevée, une tendance hypokaliémique et une alcalose métabolique hypochlorémique. L'expression de NCC est diminuée et celle de sa forme phosphorylée est pratiquement indétectable.

d) SPAK/OSR1

Afin d'étudier le rôle de SPAK et OSR1 *in vivo*, des modèles très élégants de souris knock-in homozygotes dans lesquelles la thréonine de la boucle T de SPAK ou OSR1 est remplacée par une alanine, rendant la kinase insensible à l'action des WNKs, ont été générés [111]. Les souris *OSR1*$^{185A/185A}$ ne sont pas viables et meurent in utéro à 17,5 jours de vie embryonnaire. Les souris *SPAK*$^{243A/243A}$ sont viables et ont une pression artérielle légèrement moindre que celle des souris contrôles, avec une expression diminuée des formes totales et phosphorylées de NCC et NKCC2. En revanche, l'expression protéique des trois sous-unités

d'ENaC est augmentée chez les souris *SPAK*$^{243A/243A}$. Au niveau biologique, on note en régime normal une hypomagnésémie et une hypocalciurie modérées chez les souris *SPAK*$^{243A/243A}$. Après 14 jours de régime pauvre en sel, la kaliémie des souris *SPAK*$^{243A/243A}$ devient moindre que celle des contrôles. Cette étude montre que SPAK joue un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle, en régulant la phosphorylation et donc l'activité des co-transporteurs NKCC2 et NCC.

Deux modèles murins complémentaires présentant un *knock-out* de SPAK ou OSR1 par délétion ciblée des exons 9 et 10 des deux kinases [110] ont également été générés. Les souris *OSR1*$^{-/-}$ meurent *in utero*, de même que les souris *OSR1*$^{185A/185A}$. Les souris *SPAK*$^{+/-}$ et *SPAK*$^{-/-}$ ont une croissance et une fertilité normale. Les homozygotes ont une perte totale de l'expression protéique de SPAK (il n'est pas retrouvé de forme tronquée). Les souris *SPAK*$^{+/-}$ ont seulement une hypotension modérée sans autre différence phénotypique avec les souris contrôles. Les souris *SPAK*$^{-/-}$ ont une hypotension artérielle (PAS: 93 vs 109 mmHg, mesurée par *tail-cuff*), et un hyperaldostéronisme, avec une hypokaliémie (3,6 vs 4,2 mmol/L), une hypochlorémie (109 vs 114 mmol/L), une hypomagnésémie ainsi qu'une hypocalciurie. Au niveau protéique, l'expression et la phosphorylation de NCC sont diminuées. A la différence des souris *SPAK*$^{243A/243A}$, l'expression et la phosphorylation de NKCC2 augmentent, ce qui pourrait être expliqué, selon les auteurs, par l'augmentation de la phosphorylation de OSR1 dans l'ensemble du néphron. De façon concordante, les souris *SPAK*$^{-/-}$ montrent une réponse diminuée à l'hydrochlorothiazide et une réponse conservée à l'injection de furosémide. Par ailleurs, les auteurs suggèrent qu'une hypocontractilité vasculaire pourrait participer au phénotype, puisque la phosphorylation de NKCC1 est diminuée dans l'aorte et que la contraction d'anneaux aortiques après stimulation par la phénylephrine est moindre chez les souris *SPAK*$^{-/-}$ et n'est pas plus réduite par l'ajout de bumétanide, un antagoniste de NKCC1, contrairement aux souris sauvages.

L'apparente contradiction entre les deux modèles sus-cités concernant la phosphorylation de NKCC2, diminuée chez les souris *SPAK*$^{243A/243A}$ alors qu'elle est augmentée chez les souris *SPAK*$^{-/-}$, peut trouver son explication dans l'identification récente d'une isoforme de SPAK exprimée uniquement dans le rein, dépourvue d'activité kinase puisque les 5 premiers exons sont remplacés par l'exon 5a situé dans l'intro 5-6 [132]. Cette isoforme, exprimée spécifiquement dans le rein et en particulier dans la TAL, exerce un effet dominant négatif sur l'isoforme longue et a donc une activité inhibitrice sur NKCC2 en empêchant sa phosphorylation [132]. De ce fait, en cas d'absence complète de SPAK, le tonus inhibiteur exercé par KS-SPAK sur NKCC2 est levé, et la phosphorylation de la kinase est augmentée en raison l'augmentation compensatoire de OSR1 dans ce modèle. Cela suggère qu'à l'état basal, KS-SPAK exerce un effet dominant négatif sur OSR1, ce qui est effectivement confirmé *in vitro*.

Enfin, tout récemment, une étude a permis de déterminer le rôle-clé de la cascade WNK-SPAK/OSR1-NCC dans le phénotype de l'HHF consécutive à la mutation de *WNK4* [133]. En effet, outre la voie SPAK/OSR1, d'autres mécanismes ont été évoqués comme pouvant participer au phénotype de la HHF, comme par exemple l'inhibition directe de ROMK par le mutant WNK4, ainsi que l'inhibition de NCC et ENaC par WNK4 sauvage qui serait levée par la forme mutante de WNK4. Afin de déterminer la part de la voie WNK-SPAK/OSR1-NCC dans le phénotype de l'HHF, les auteurs ont croisé les souris *WNK4*$^{D561A/+}$ avec les souris *SPAK*$^{243A/+}$ et les souris *OSR1*$^{185A/+}$ pour générer des triples *knock-in*. L'augmentation de pNCC est confirmée chez les souris *WNK4*$^{D561A/+}$, et ce niveau de phosphorylation diminue proportionnellement au nombre d'allèles de SPAK/OSR1 mutés de l'animal. On note en particulier que la phosphorylation de NCC est quasi-abolie chez les animaux *WNK4*$^{D561A/+}$*;SPAK*$^{243A/243A}$*;OSR1*$^{185A/+}$, de manière plus marquée que les animaux *SPAK*$^{243A/243A}$ ou *SPAK*$^{-/-}$ (Yang 2010), ce qui montre que OSR1 participe aussi *in vivo* à la

phosphorylation de NCC. En accord avec la correction du niveau de phosphorylation de NCC, l'hypertension artérielle, l'hyperkaliémie et l'acidose métabolique sont corrigées chez les souris *WNK4*$^{D561A/+}$*;SPAK*$^{243A/243A}$*;OSR1*$^{185A/+}$, comme chez les souris *WNK4*$^{D561A/+}$*;SPAK*$^{243A/+}$ *;OSR1*$^{185A/+}$.

Cette démonstration, combinée à la correction du phénotype par les thiazidiques et par le croisement avec des souris *NCC*$^{-/-}$ [128], suggère que les effets de WNK4 indépendants de SPAK/OSR1 montrés *in vitro* n'ont qu'un rôle mineur *in vivo*. Ainsi, les modifications d'activité de ROMK et d'ENaC ne seraient que des conséquences indirectes de l'activation de NCC.

Lignée	Phénotype			
	PA	**Ionogramme P/U**	**Transporteurs**	**Etudes fonctionnelles**
***L-WNK1*$^{+/-}$** [123,124]	↓ ou ↔	**P** ↔ **U** ↔	**Exp** ND **Act** ND	hypocontractilité vasculaire
***TgKS-WNK1*$_{1-253}$** [92,126]	~↓	**P** ↓ [K^+] **U** ↑FeK^+	**Exp** ↑ ROMK - ↓ NCC-pNCC-NKCC2-pNKCC2 **Act** ND	tendance perte de sel
***KS-WNK1*$^{-/-}$** [126,127]	PAD ~↑	**P** ↑ [Na^+] **U** ↑ [Ca^{2+}]	**Exp** ↑ NCC-pNCC-NKCC2-pNKCC2-ROMK - ↓ENaC **Act** ↓ ENaC (amiloride)	régime riche en NaCl : PA ~↑
***TgWnk4*^{WT}** [128]	~↓	**P** ↓[Cl^-] **U** ↓[Ca^{2+}]	**Exp** ↓ NCC (hypoplasie DCT) - ↑ROMK - ↔ βENaC **Act** ND	régime pauvre en K : ↓ [K^+]
***TgWnk4*^{PHAII}** [128]	↑	**P** ↑[K^+]-[Cl^-] - ↓[$HCO3^-$] **U** ↑[Ca^{2+}]-↓FeK^+	**Exp** ↑NCC (hyperplasie DCT) - ↔ROMK-βENaC **Act** ↑ENaC (colon)	régime riche en K : ↑↑[K^+](P) HCTZ : correction phénotype
***WNK4*$^{D561A/+}$** [129,134]	↑↑	**P** ↑[K^+]-[Cl^-] - ↓[$HCO3^-$] **U** ↑[Ca^{2+}]	**Exp** ↑NCC-pNCC-pSPAK-pOSR1-ENaC(α-β)-αBKCa - ↔ROMK **Act** ↑ENaC (microperfusion)	HCTZ : correction phénotype
WNK4 ***« hypomorphe »*** [135]	↓ nuit	**P** ↔ **U** ↔	**Exp** ↓pOSR1-pNCC - ↑ENaC (α, β, γ) - ↔ROMK, BKCa **Act** ND	régime pauvre en NaCl : tendance perte de sel
***WNN4*$^{-/-}$** *[131]*	↔	**P** ↓[K^+]-[Cl^-][Mg^{2+}]↑[$HCO3^-$] **U** ↔	**Exp** ↓NCC ↓↓pNCC - ↔ SPAK-pSPAK-OSR1-NKCC2-$NEDD_{4-2}$ **Act** ↓NCC (HCTZ)	régime pauvre en NaCl ou AngII : ↔pSPAK-pNCC
***SPAK*$^{243A/243A}$** [111]	~↓	**P** ↓[Mg^{2+}] **U** ↓[Ca^{2+}]	**Exp** ↓NCC-pNCC-NKCC2-pNKCC2 - ↑α,β,γENaC **Act** ND	régime pauvre en NaCl ↓[K^+]
***SPAK*$^{-/-}$** [136]	↓	**P** : ↓[K^+]-[Cl^-]-[Mg^{2+}] **U** ↓[Ca^{2+}]	**Exp** ↓NCC-pNCC - ↑ NKCC2-pNKCC2 **Act** ↓NCC (HCTZ) ↔NKCC2(furosémide)	hypocontractilité vasculaire ↓NKCC1 aorte

Tableau 3 : Phénotype des principaux modèles animaux générés pour étudier WNK1/4 et SPAK

Ionogramme P/U : ionogramme plasmatique et urinaire ; **PA** : Pression Artérielle
Transporteurs : évaluation de l'expression (**Exp**) protéique en western blot ou immunohistochimie et de l'**activité (Act)** des différents transporteurs rénaux
Etudes fonctionnelles : réponses à différents régimes ou tests pharmacologiques ; étude de la contractilité vasculaire
↑ augmentation, ↓ diminution, ↔ non modifié, **~** phénotype discret, **Fe** : fraction d'excrétion
HCTZ : traitement par hydrochlorothiazide

3. Régulation des kinases WNK

a) Osmolarité

Pour l'équipe qui a découvert la famille WNK [12], les seules conditions qui entraînent une augmentation de la phosphorylation de WNK1 sont les variations osmotiques. Ils suggèrent dès cette première publication que WNK1 puisse jouer un rôle dans la sensibilité osmotique. Plusieurs équipes ont confirmé par la suite qu'un stress osmotique active WNK1 en augmentant sa phosphorylation sur plusieurs résidus dont la sérine 382 [25,31]. Dans la plupart des études, les auteurs utilisent un milieu hypotonique pauvre en chlore pour activer WNK1. Récemment, l'équipe d'Uchida a cherché à déterminer quel facteur précis jouait un rôle-clé, entre l'osmolarité, la teneur en sodium, potassium ou chlore, et a conclu qu'un milieu appauvri en chlore ou en potassium, mais pas en sodium suffisait à activer WNK1 [137]. En outre, un stress osmotique induit une redistribution rapide de WNK1 du cytosol vers des structures vésiculaires qui colocalisent avec la clathrine et AP-1 (Adaptor Protein complex 1) [25].

La cascade de signalisation qui conduit d'un stress osmotique à l'activation des co-transporteurs NKCC1, NKCC2 et NCC et à l'inactivation de KCC via les kinases WNK, SPAK et OSR1 est à présent bien élucidée et détaillée plus haut.

b) Teneur en sodium et en potassium dans l'alimentation

L'apport sodé ne semble pas modifier la transcription de L-WNK1 tandis que des souris soumises à un régime hyposodé ont une expression de KS-WNK1 légèrement plus faible que des souris soumises à un régime hypersodé [138].

Des rats soumis à un régime pauvre en potassium voient la transcription de L-WNK1 augmenter et celle de KS-WNK1 diminuer [85]. Il a été montré de même chez des souris qu'un régime pauvre en potassium diminue l'expression de KS-WNK1, sans modifier WNK4. A l'inverse, un régime riche en potassium augmente l'expression de KS-WNK1 et de WNK4 dans le rein de souris et de rat [86,138 ,139]. En conclusion, le potassium alimentaire régule négativement KS-WNK1 et WNK4. Notons que la transcription de KS-WNK1 est régulée de manière beaucoup plus importante par un régime riche en potassium que par une déplétion sodée.

c) Aldostérone

L'aldostérone est l'hormone jouant le rôle le plus important dans la régulation du transport de sodium par le néphron distal. L'ensemble DCT-CNT-CCD est pour cela souvent dénommé ASDN pour « Aldosterone-Sensitive Distal Nephron ». L'aldostérone stimule la réabsorption de sel dans ces segments en régulant positivement NCC dans les deux parties du DCT [140] et ENaC dans le DCT2, le CNT et CCD [141]. Plusieurs études montrent que les kinases WNK1 et 4, toutes deux exprimées dans l'ASDN, peuvent jouer un rôle dans les voies activées par l'aldostérone.

- ***Aldostérone et WNK1:***

Dans un modèle de cellules du canal collecteur exprimant le récepteur aux minéralocorticoïdes, l'aldostérone induit rapidement l'expression de KS-WNK1, mais n'induit aucune modification de l'expression de L-WNK1 [94]. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, car un traitement par aldostérone chez la souris augmente l'expression de KS-WNK1 sans modifier L-WNK1 ou WNK4 [138]. Il est intéressant de rappeler que le promoteur de KS-WNK1 contient un GRE (« glucocorticoid responsive element ») putatif, contrairement à celui de L-WNK1. Il est possible que le mécanisme de cette induction rapide de KS-WNK1 par l'aldostérone provienne d'une liaison du récepteur minéralocorticoïde au GRE.

- ***Aldostérone et WNK4***

L'aldostérone active la kinase SGK1 (serum and glucocorticoid induced kinase 1), ce qui a pour effet de stimuler le transport de sodium par le néphron distal en augmentant l'expression de ENaC à la membrane. En effet, SGK1 phosphoryle Nedd4-2 (neural precursor cell-expressed developmentally downregulated protein4-2), ce qui diminue l'interaction de ce dernier avec ENaC (via les domaines PY de ENaC) et donc l'endocytose de ENaC. L'équipe de Lifton a montré dans des lignées cellulaires de mammifères et l'œuf de Xénope que WNK4, phosphorylé par SGK1 sur sa sérine 1169, augmente l'activité de ENaC mais également celle de ROMK [142]. Rappelons que la forme sauvage non phosphorylée inhibe les deux canaux, et que la forme mutée HHF augmente ENaC et inhibe ROMK.

Par ailleurs, l'aldostérone stimule l'activité de NCC et son expression à la membrane, mais la voie de transduction impliquée n'était pas connue jusqu'à peu. L'équipe d'Ellison [143] a identifié une nouvelle voie de signalisation qui médie l'activation de NCC par l'aldostérone, via SGK1 et WNK4. Dans l'œuf de Xénope, SGK1 atténue l'effet inhibiteur de WNK4 sur NCC. SGK1 se lie à WNK4 et le phosphoryle, sur deux sérines (S1169 et S1196).

La mutation de ces sérines pour des résidus aspartate, qui miment leur phosphorylation constitutive, atténue l'effet de WNK4 sur l'activité de NCC.

En résumé, SGK1, activé par l'aldostérone, phosphoryle WNK4, ce qui induit une activation d'ENaC, de ROMK et de NCC (figure 10). WNK4 non activé par SGK1 inhibe au contraire ces trois transporteurs.

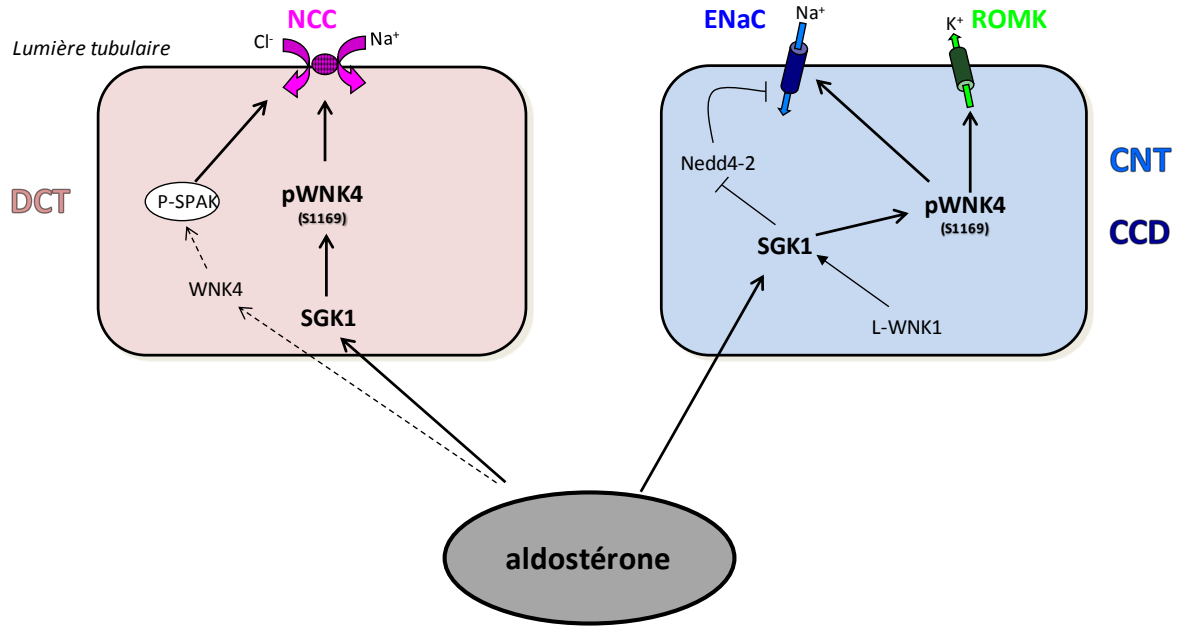


Figure 10 : WNK4, phosphorylé par SGK1, active NCC, ENaC et ROMK. Ce schéma montre comment l'aldostérone active la kinase SGK1, qui conduit à une activation de la rébsorption sodée via Nedd4-2 ou *via* la phosphorylation de WNK4 sur la sérine 1169. L'aldostérone active également SPAK, ce qui doit participer à l'activation de NCC, mais la voie d'activation de SPAK, possiblement *via* WNK4, est incomplètement élucidée. La forme ainsi activée de WNK4, contrairement à la forme sauvage et à la forme mutée HHF, active également ROMK. Les flèches symbolisent une régulation positive.

Les kinases SPAK et OSR1 sont également impliquées dans l'activation de NCC par l'aldostérone. En effet, *in vivo*, la phosphorylation de SPAK/OSR1 et NCC observée en réponse à un régime pauvre en sel est inhibée par la spironolactone et, à l'inverse, peut être obtenue par l'injection d'aldostérone [130].

L'ensemble de ces résultats montrent que les kinases WNK, SPAK et OSR1 sont de nouveau effecteur de l'action rénale de l'aldostérone dans le DCT. Il a de plus été récemment montré que l'activation de WNK4, SPAK et NCC par l'infusion d'aldostérone chez des rats ayant subi une surrénalectomie ne nécessite pas la présence simultanée d'angiotensine II puisqu'elle persiste en présence de losartan, un inhibiteur pharmacologqiue des récepteurs AT1 de l'angiotensine II [140].

d) Angiotensine II

A la différence de l'aldostérone, il est classiquement retenu que le site principal de régulation du transport de sodium par l'angiotensine II dans le néphron est le tubule proximal, par activation de l'échangeur Na^+-H^+ NHE3 [144]. Depuis quelques années a été également mise en évidence une régulation de l'activité de NCC par l'angiotensine II, y compris en l'absence d'aldostérone [63,145,146]. Les kinases WNK semblent être impliquées dans cette régulation.

San-Cristobal *et al.* ont ainsi montré dans l'œuf de Xénope et dans des cellules tubulaires rénales (mpkDCT) que l'angiotensine II augmente l'activité de NCC en réprimant l'effet inhibiteur de WNK4 [145]. Cette action est inhibée par le losartan. En présence des mutants WNK4 HHF, l'activité de NCC est augmentée à son niveau maximal -c'est-à-dire que l'angiotensine II n'a pas d'effet supplémentaire-. Pour ces auteurs, les mutants WNK4 HHF provoqueraient donc une activation constitutive de la voie entre le récepteur AT1 et NCC. En revanche, l'angiotensine II ne modifie pas l'action de WNK4 sur ROMK. WNK4, activé par l'angiotensine II, pourrait donc jouer un rôle clé pour maximiser la réabsorption de sel tout en évitant la sécrétion concomitante de potassium (figure 11). Ces résultats ont un intérêt physiologique majeur puisqu'ils permettraient de comprendre comment WNK4 oriente la régulation différentielle entre hypovolémie et hyperkaliémie via le signal hormonal qui est

spécifique du premier cas, à savoir l'angiotensine II. Cette théorie nécessite des explorations supplémentaire puisqu'une autre équipe [147] a également montré *in vitro* et *in vivo* que l'angiotensine II augmente la phosphorylation de OSR1 et NCC, mais si cet effet parait à court terme médié par le récepteur à l'angiotensine II, à long terme c'est l'aldostérone qui en serait le responsable.

Récemment, l'équipe de Gamba a pu confirmer *in vivo* l'implication de WNK4 dans la phosphorylation de SPAK et NCC par l'angiotensine II. En effet, la perfusion d'angiotensine II à des souris *WNK4*$^{-/-}$ n'entraîne pas de phosphorylation de SPAK et NCC, contrairement à ce qui est observé chez des souris sauvages [131].

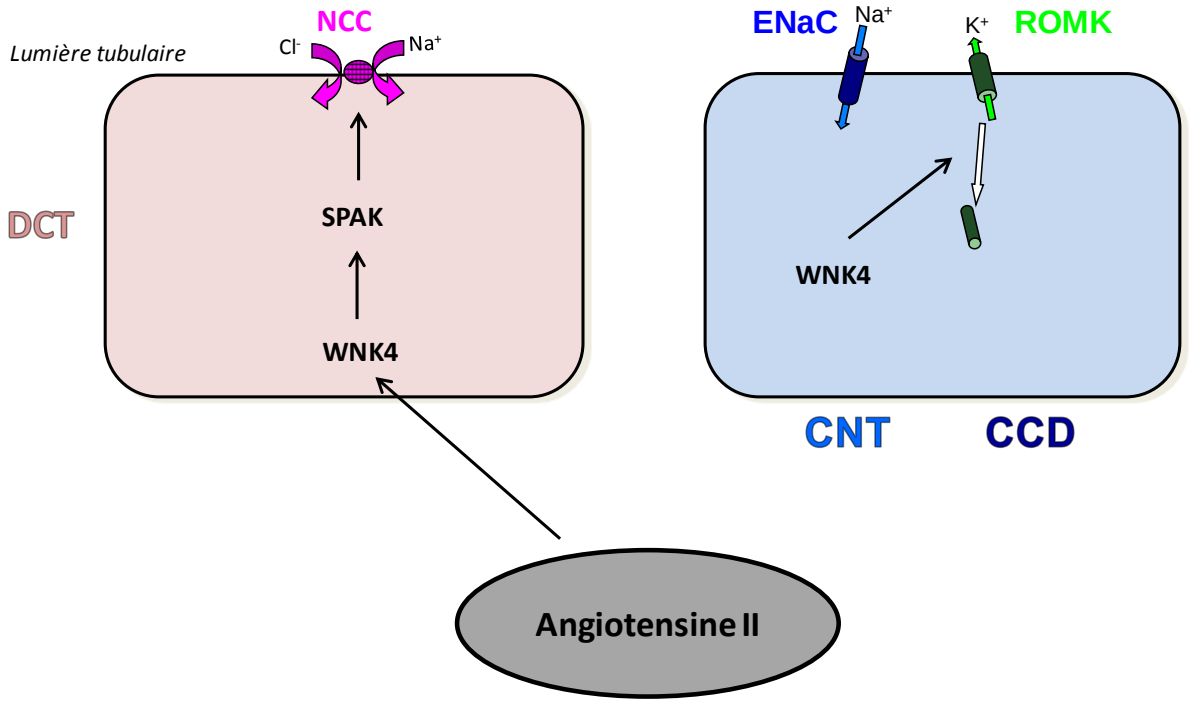


Figure 11 : l'angiotensine 2 active NCC *via* WNK4 et SPAK mais ne modifie par l'activité inhibitrice de WNK4 sur ROMK. Les flèches symbolisent une régulation positive. L'activation de NCC par l'angiotensine II est au moins en partie indépendante de la présence d'aldostérone.

e) Insuline

WNK1 fait partie des protéines activées par la voie PI3-kinase - Akt/PKB. Ainsi Vitari et al. [148] ont montré que l'IGF1 induit la phosphorylation de WNK1 dans des cellules HEK, sur la thréonine 60, via la voie de la PI-3K - PKB/Akt. Jiang et al. [149] ont montré que l'insuline induit la même phosphorylation de WNK1 dans des adipocytes en culture via la même voie PI-3K et PKB/Akt.

WNK1 est nécessaire à l'activation de SGK1 par l'IGF-1. En effet, l'équipe de Mélanie Cobb [93,150] a montré dans des cellules HEK293 et CHO que WNK1 active SGK1. WNK1 et SGK1 interagissent dans un même complexe protéique. Cependant, la phosphorylation de SGK1 par WNK1 est indirecte, et son mécanisme exact reste à élucider. Ni l'activité catalytique ni le domaine kinase de WNK1 ne sont nécessaires à cette activation, pour laquelle les 220 acides aminés N-terminaux de WNK1 suffisent [150]. Un inhibiteur de la PI-3 kinase empêche l'activation de SGK1 par WNK1. L'activation maximale de SGK1 est obtenue par la forme de WNK1 phosphorylée sur sa thréonine 60.

Dans une publication plus récente, Cheng et al [151] placent au contraire WNK1 en aval de SGK1 dans la voie qui conduit à l'inhibition de ROMK par l'insuline ou l'IGF1. Les auteurs montrent en effet sur des cellules HEK que l'ajout d'insuline ou d'IGF1 inhibe ROMK en diminuant son abondance à la membrane de manière PI3-K-dépendante. L'insuline augmente la phosphorylation d'Akt1 et de SGK1 et la phosphorylation de WNK1 sur la thréonine 60 (T58 chez le rat), effet également PI3-K-dépendant. L'inhibition de ROMK par l'insuline est perdue en présence d'un siRNA contre WNK1, ou en présence d'un mutant exogène de WNK1 T58A, donc la phosphorylation de WNK1 sur la T58 est importante pour l'inhibition de ROMK par les hormones ou facteurs de croissance qui activent la PI3-kinase. Les auteurs montrent de plus que Akt1 et SGK1 phosphorylent WNK1 sur la T58 de manière synergique, et que cette phosphorylation est nécessaire à l'inhibition de ROMK. Enfin les

auteurs montrent que KS-WNK1 bloque l'effet inhibiteur de SGK1 sur ROMK, sans empêcher la phosphorylation de WNK1 donc plutôt en inhibant l'interaction de L-WNK1 avec ses effecteurs d'aval.

La voie WNK4/ENaC-NCC qui est activée par l'aldostérone semble également pouvoir être activée par l'insuline via la PI3-kinase. En accord avec ce résultat, l'infusion chronique d'insuline chez le rat diminue l'expression de WNK4, augmente l'activité de ENaC et de NCC ; et donc la pression artérielle [152].

f) Activité sympathique et WNK4

Dans un modèle de rat d'hypertension sensible au sel avec activation sympathique, la charge en sel, via l'activité sympathique et les récepteurs β2-adrénergiques, diminue l'expression de WNK4 dans le rein et active NCC [153]. Pour les auteurs, le mécanisme sous-jacent serait une modulation épigénétique de WNK4 : la stimulation β2-adrénergique augmente l'acétylation de l'histone (en inhibant l'histone déacetylase-8 par la voie de l'AMPc), ce qui induit la liaison du récepteur glucocorticoïde à un GRE négatif dans la région promotrice de WNK4 [154].

4. Peut-on expliquer l'HHF à ce jour ?

a) Physiopathologie de l'HHF par mutations de WNK1

Les mutations de *WNK1* responsable de l'HHF ne concernent pas la portion codante du gène mais sont de grandes délétions du premier intron. Delaloy *et al*. [155] ont généré des souris transgéniques permettant d'étudier les conséquences de la délétion de l'intron 1 de

WNK1 sur le profil d'expression de L- et KS-WNK1. Le transgène comprend, outre un système « Cre-Lox » pour déléter l'intron 1, les gènes rapporteurs *luciférase* et *nLacZ* dans l'exon 2 et l'exon 4a respectivement. Les auteurs confirment d'abord chez les souris *Tgi1* (intron 1 non délété) le profil d'expression normal de L- et KS-WNK1, à savoir que le premier est ubiquitaire, fortement exprimé en particulier dans le système cardiovasculaire, et le second est exprimé uniquement dans le rein. Après délétion de l'intron 1, l'expression de L-WNK1 dans les tissus extra-rénaux n'est pas modifiée contrairement à l'expression de KS-WNK1 qui devient ubiquitaire, exprimée en particulier dans le muscle squelettique, le cœur et le cervelet. Notons aussi que l'expression de KS-WNK1 est augmentée sans modification de L-WNK1 dans les leucocytes, ce qui suggère que l'augmentation d'expression de WNK1 chez les patients HHF serait uniquement attribuable à une augmentation de KS-WNK1. Dans le néphron, la délétion de l'intron 1 entraîne une augmentation de L-WNK1 d'un facteur 3 dans le DCT, et aucune modification dans les autres segments du néphron. Ces résultats suggèrent l'existence dans l'intron 1 d'au moins un répresseur (qui freine l'expression de KS-WNK1 dans les tissus extrarénaux et celle des deux isoformes dans le DCT) et/ou d'un insulateur dont la délétion expliquerait l'expression ubiquitaire de KS-WNK1 et la surexpression de L-WNK1 dans le DCT chez les souris mutées. En accord avec cette hypothèse, les auteurs retrouvent l'existence dans la partie délétée de l'intron 1 d'un répresseur et d'un insulateur.

Ce modèle a permis de caractériser les conséquences de la délétion de premier intron de *WNK1* sur l'expression des deux isoformes du gène mais présente les limites inhérentes à l'expression d'un transgène. De plus, ces animaux ne sont pas un modèle d'HHF puisque le gène *WNK1* endogène n'est pas modifié. La génération d'animaux porteurs d'une délétion hétérogygote du premier intron de *WNK1* est l'objectif de mon travail de thèse (cf plus loin), mais on peut supposer à partir de ce travail et des études *in vitro* que L-WNK1 active

indirectement NCC et sa surexpression rénale expliquerait le phénotype de la maladie chez les patients présentant une délétion de l'intron 1

b) Physiopathologie de l'HHF par mutations de WNK4

Le rôle physiologique de WNK4 reste débattu, puisque les modèles murins montrent que la surexpression de WNK4 entraîne une inhibition de NCC [128] mais que la diminution d'activité kinase de WNK4 [135] et l'inactivation homozygote de WNK4 [131] conduisent également à une diminution du niveau de phosphorylation de NCC. En revanche, l'ensemble des études permet de conclure qu'une mutation HHF de WNK4 entraîne une activation du co-transporteur NCC. Cet aspect a été présenté en détails puisque deux modèles animaux d'HHF par mutation de WNK4 ont été publiés.

c) Physiopathologie de l'HHF : l'activation de NCC est-elle suffisante

Un point reste à élucider : si une activation de NCC est le seul élément permettant d'expliquer le phénotype de l'HHF, alors comment comprendre les modèles murins qui présentent une activation bien documentée de NCC sans hypertension hyperkaliémique ? C'est par exemple le cas des souris ayant une absence complète de KS-WNK1 dont l'activation de NCC est très clairement démontrée [126,127]. De même, les souris *KIR5.1*$^{-/-}$ déficientes pour le canal potassique KIR5.1 (inwardly rectifying K+ channel), dont l'activité de NCC est augmentée, ont une acidose métabolique mais pas d'hypertension ni d'hyperkaliémie. Elles ont même au contraire une hypokaliémie.

On peut imaginer que dans ces deux modèles, une voie indépendante, modifiée chez les souris mutées, vienne contre-réguler les effets médiés par NCC. Alternativement, on peut proposer que dans ces deux modèles, NCC soit en fait activé en réaction aux modifications

métaboliques induites par la mutation. En particulier, les souris *KIR5.1*$^{-/-}$ sont hypokaliémiques et les souris KS-WNK1$^{-/-}$ ont également une tendance hypokaliémique, démasquée paraxalement sous régime riche en potassium (données non publiées de notre laboratoire). L'activation de NCC pourrait donc dans ces modèles être secondaire, destinée à protéger de la tendance hypokaliémique.

Une autre possibilité est que les mutations de *WNK1* et *WNK4* aient une action sur d'autres transporteurs que NCC, nécessaires à l'apparition des troubles métaboliques.

Ainsi une activation d'ENaC pourrait participer à générer l'hypertension. En effet, alors que les souris *KS-WNK1*$^{-/-}$ ont une inhibition de ENaC [127], les modèles d'HHF par mutation de WNK4 ont au contraire une activation d'ENaC [128,129]. Une autre hypothèse à explorer est que le système NDBE/pendrine participe aux troubles métaboliques de l'HHF ; en effet, ce système décrit il y a deux ans [156] assure un transport electro-neutre de NaCl sensible aux diurétiques thiazidiques. Cette dernière propriété en fait en théorie un candidat potentiel de transporteur en cause dans l'HHF. De même pour expliquer l'hyperkaliémie, l'hypothèse classiquement évoquée est que les mutations de WNK1 et WNK4 aient une action inhibitrice directe sur ROMK.

Cette hypothèse d'une dysrégulation d'un ou plusieurs transporteurs autre que NCC qui serait nécessaire à l'apparition de l'hypertension hyperkaliémique perd de son crédit à la lumière des publications récentes sur les nouvelles mutations responsables d'HHF [21,22]. Il faudrait en effet imaginer que les mutations *KLHL3* et *CUL3* entraînent elles-aussi les mêmes effets métaboliques indépendants NCC.

d) Physiopathologie de l'HHF : comprendre l'hyperkaliémie

L'hyperkaliémie est un trouble métabolique de l'HHF particulièrement complexe à appréhender. Il parait en effet surprenant que le modèle *KS-WNK1*$^{-/-}$ n'ait pas d'hyperkaliémie

[127] malgré l'inhibition d'ENaC alors que les souris ayant une activation d'ENaC ont au contraire une hyperkaliémie [128,129]. Il faut admettre que, dans ces différents modèles, les activités d'ENaC et de ROMK sont découplées. En d'autres termes dans les deux modèles présentant une hypertension et une hyperkaliémie ainsi que chez les patients, ROMK serait au moins inadapté à l'hyperkaliémie. L'expression de ROMK est comparable aux contrôles chez les souris *TgWnk4* ^{PHAII} [128] et les souris *WNK4*$^{D561A/+}$ [129] et l'activité de ROMK sur tubules collecteurs microperfusés des souris *WNK4*$^{D561A/+}$ est également conservée. Cependant, étant donnée l'hyperkaliémie, on devrait observer une augmentation d'expression et d'activité de ROMK dans ces deux modèles si la régulation du transporteur n'était pas altérée. On peut donc penser qu'une inhibition relative de ROMK participe à l'hyperkaliémie dans l'HHF par mutation de ROMK. La kaliurèse induite par la perfusion de sels non chlorés pourrait s'expliquer par l'activation flux-dépendante des canaux BKCa. Cependant la correction de l'hyperkaliémie par les thiazidiques évoque plutôt que l'hyperkaliémie serait secondaire à l'activation de NCC. Des études complémentaires restent donc nécessaires pour comprendre l'ensemble des anomalies de l'HHF.

IV. Au-delà de l'HHF : apport des WNKs en physiopathologie rénale

1. WNKs et pression artérielle

a) Régulation à long terme de la pression artérielle

Bien que la pression artérielle réponde à une équation simple (la pression artérielle moyenne est égale au débit cardiaque multiplié par les résistances artérielles systémiques, plus la pression veineuse centrale, en général négligeable), son niveau est régulé par l'interaction de multiples systèmes.

Ainsi le baroréflexe artériel, qui corrige en quelques secondes à minutes une variation de PA en agissant sur fréquence cardiaque et résistances artériolaires, et le système rénine-angiotensine-aldostérone, qui intervient dans les minutes et heures qui suivent une perturbation et modifie les résistances artériolaires ainsi que l'homéostasie hydrosodée, sont parmi les mieux décrits. Les peptides natriurétiques produits par le cerveau et le cœur, le système kinine-kallicréine, le système adrénergique ainsi que différents agents vasoactifs comme le monoxyde d'azote ou l'endothéline jouent également des rôles importants pour la régulation de la pression artérielle. Cependant, aucun de ces systèmes n'a un gain infini, c'est-à-dire la capacité de corriger à 100% une modification de la PA [157].

Par une modélisation informatique de l'ensemble des systèmes participant à l'homéostasie pressive [158], Guyton avait prédit dès les années 1970 que le rein, par la relation de pression-natriurèse, était le seul organe permettant de corriger la pression artérielle avec un gain infini, même s'il est le plus long à se mettre en place après une perturbation.

Selon lui, l'hypertension traduit nécessairement une altération de la relation pression-natriurèse (excrétion urinaire de sodium en fonction de la pression de perfusion rénale). Plus de 40 ans après la première publication de ce modèle, toutes les mutations identifiées responsables d'hypotension ou d'hypertension affectent le contrôle rénal de l'excrétion et de la réabsorption de sodium [159,160], donnant *a posteriori* un fort crédit aux conclusions de Guyton, même si certains auteurs débattent encore la place centrale donnée au rein[161].

L'Hypertension Hyperkaliémique Familiale est la dernière forme d'hypertension mendélienne pour laquelle des gènes en cause ont été identifiés. Tous ces gènes (*WNK1, WNK4, CUL3, KLHL3*) codent pour des protéines qui semblent réguler l'activité du co-transporteur NCC. Cette maladie génétique vient donc comme toutes les précédentes conforter l'hypothèse de Guyton plaçant le rein et l'homéostasie hydrosodée au cœur du contrôle à long terme du niveau de pression artérielle.

b) HTA et apports alimentaires en sodium et potassium

On estime que l'apport de sodium est aujourd'hui en moyenne de 150-200 meq/j et celui de potassium d'environ 70 meq/j dans notre alimentation. Il y a plus de dix-mille ans, les hommes avaient au contraire un régime pauvre en sodium (1-10meq/j) et riche en potassium (250-300 meq/j) [55], avec de ce fait une priorité fonctionnelle adaptative pour le néphron de parvenir à retenir le sel en cas de forte chaleur.

Aujourd'hui, la nécessité pour le néphron de réabsorber du sodium et de sécréter du potassium est devenue moindre et peut en particulier être effectuée la plupart du temps sans le recours au CCD, qui en revanche était certainement plus utile en conditions de régime pauvre en sodium. Cette transition des mœurs a été trop rapide pour s'être accompagnée d'une évolution génétique. Notre capital génétique est donc adapté à la nécessité de réabsorber de fortes quantités de sodium à partir de l'urine primitive. Cet écart entre nos gènes et nos mœurs

pourrait expliquer le développement si important de l'hypertension dans nos sociétés modernes, et les WNKs en seraient un support.

Il est en effet tentant de résoudre un mystère de la physiologie grâce aux WNKs : l'effet hypotenseur d'un régime riche en potassium, phénomène bien décrit mais inexpliqué. A l'inverse, un régime pauvre en potassium entraîne une élévation tensionnelle par rétention sodée, mais le mécanisme sous-jacent est inconnu. Certains auteurs pensent d'ailleurs que la carence potassique alimentaire pourrait être une des causes de la rétention sodée excessive dans l'HTA essentielle à rénine basse [162]. On peut émettre l'hypothèse qu'une excrétion augmentée de potassium en réponse à un régime riche en potassium s'accompagnerait, via les WNKs, d'une réabsorption de sodium diminuée et inversement [163]. Dans ce phénomène, WNK1 jouerait un rôle-clé. *In vitro*, L- WNK1 inhibe ROMK et KS-WNK1 entraîne l'effet inverse. Or il a été montré [85,86] qu'un régime pauvre en potassium augmente le *ratio* L-WNK1/KS-WNK1. Ceci diminuerait la sécrétion rénale de potassium tout en augmentant la réabsorption de sodium et apparaît comme un mécanisme possible de l'hypertension induite par une carence potassique. Par ce *ratio* L-/KS-WNK1 augmenté, le rein retient à la fois le sel et le potassium. Ce mécanisme couplant négativement sécrétion de potassium et réabsorption de sel pourrait être un avantage sélectionné par l'évolution dans le contexte d'une alimentation pauvre en sel et riche en potassium, et devenu inadapté à la société moderne.

c) WNKs et HTA essentielle

En dehors de la situation particulière de l'HHF, les kinases WNK1 et WNK4 apparaissent comme de nouveaux régulateurs physiologiques de la pression artérielle. De nombreux auteurs ont donc cherché à savoir si des variants de ces kinases pouvaient contribuer à l'hypertension essentielle ou à la sensibilité à l'apport alimentaire en sel. Cette possibilité a suscité d'autant plus d'intérêt que le mode d'apparition de l'hypertension dans

l'HHF est progressif et corrélé à l'âge, de manière similaire à ce que l'on observe dans l'HTA essentielle.

- ***WNK1***

Le gène *WNK1* humain a un haut niveau de polymorphisme avec plus de 100 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Newhouse *et al.* [164] ont recherché une association entre des variants de *WNK1* et l'HTA essentielle chez des patients de l'étude BRIGHT (British Genetics of HyperTension). Ils ont ainsi étudié 19 SNPs chez 181 adultes dont 105 hypertendus. Un SNP (rs1468326), situé à proximité du promoteur de *WNK1*, est associé à la sévérité de l'hypertension systolique et diastolique. De manière intéressante, ce polymorphisme de la région 5' du gène a été récemment retrouvé associé au risque d'hypertension dans deux populations chinoises indépendantes de 1592 et 602 sujets respectivement [165]. La même équipe a confirmé par la suite [166] sur 1700 hypertendus et 1700 contrôles normotendus de la même cohorte BRIGHT que de nombreux variants de *WNK1* sont associés à la PAS, à la PAD (Pression Artérielle Diastolique) ainsi qu'à la kaliurèse. L'effet le plus fort est retrouvé pour un SNP situé dans l'intron 1, rs765250, associé à la PAS, la PAD et à l'hypertension. Ce variant a été génotypé dans 6 populations indépendantes (soit 14451 sujets), et la méta-analyse confirme l'association à la PAS. Ce SNP de l'intron 1 avait déjà été retrouvé fortement associé au niveau de PAS nocturne dans une étude conduite chez 996 sujets hypertendus ou non de 250 familles blanches européennes [167]. Cette même étude avait de plus identifié deux SNPs, l'un dans l'intron 10 et l'autre dans l'intron 23, montrant une association hautement significative avec respectivement la PAS et la PAD. La même équipe a montré par la suite une association entre des SNPs situés dans les exons 4, 10 et 11 de *WNK1* et l'augmentation de la PAD avec l'âge [168]. Une autre étude de l'association entre les variations de pression artérielle selon les haplotypes de *WNK1*

chez 691 sujets japonais dont 97 hypertendus [169] a identifié un haplotype associé à un niveau supérieur de pression artérielle et un haplotype associé à une pression artérielle plus faible. En revanche, dans une autre population japonaise de 771 hypertendus et 1047 sujets contrôles [170], il n'est pas trouvé de lien entre les SNPs de *WNK1* et l'HTA essentielle, mais il est à noter que dans cette étude la pression artérielle n'était mesurée que par deux prises manuelles au brassard.

La majorité des études suggère donc que des variants communs de *WNK1* contribuent au niveau de pression artérielle dans la population générale. En outre, les polymorphismes de *WNK1* pourraient prédire la réponse à un traitement par hydrochlorothiazide [171], ou encore l'influence du régime alimentaire (rapport Na/K dans l'alimentation) sur le niveau de pression artérielle [169].

- ***WNK4***

Le chromosome 17q humain ayant été impliqué comme contenant un gène lié à l'HTA essentielle, *WNK4* était fortement suspect d'être le gène recherché. Une étude américaine [172] a retrouvé qu'un allèle rare de *WNK4* (SNP situé dans l'intron 10) semble plus fréquent chez les sujets blancs hypertendus que chez les sujets blancs normotendus. De même, Kokubo et al [170] ont montré que les génotypes CT ou TT en C14717T (intron 14) de WNK4 est associé à un odds ratio de 1,62 par rapport au génotype CC d'être hypertendu et que les patients présentant ce génotype ont une PAS supérieure aux autres de 3,1 mmHG. Dans une autre population japonaise, 3 SNPs localisés dans les exons 7 et 17 (exons porteurs des mutations HHF) sont associés à l'hypertension [173]. Dans une population isolée d'une région désertique chinoise avec un apport moyen en sel élevé et une prévalence élevée d'hypertension, le polymorphisme Ala589ser situé dans l'exon 8 de *WNK4* est fortement associé avec le niveau de PA systolique et diastolique [174]. Enfin, Han *et al.* [165] trouvent

une association entre le polymorphisme rs9916754 de *WNK4* et le risque d'hypertension dans deux populations indépendantes de 1592 et 602 sujets.

Cependant, l'implication de WNK4 dans l'HTA essentielle reste débattue puisque toutes les autres études ayant recherché un lien entre les polymorphismes de *WNK4* et l'HTA essentielle se sont révélées négatives [167 ,175,176,177].

- ***Partenaires des WNKs***

Manunta *et al*. [178] ont étudié l'influence des polymorphismes de l'*α-adducine,* de *WNK1* et de *NEDD4L* sur la réponse pressive à une charge sodée (344 sujets), sur la réponse pressive à un mois de traitement par diurétiques thiazidiques à la dose de 12,5 mg (193 sujets) et sur la pression artérielle par mesure ambulatoire sur 24H (690 sujets). Chaque polymorphisme pris individuellement a très peu d'influence sur ces paramètres. En revanche, combinés, ils ont une influence significative, qui est à rapporter à leur interaction physiologique connue.

Enfin, une étude a retrouvé une association entre des variants alléliques du gène *STK39*, qui code SPAK, et la pression artérielle dans plusieurs populations [179].

2. Le paradoxe de l'aldostérone

Les deux stimuli de la sécrétion d'aldostérone sont l'hypovolémie et l'hyperkaliémie, mais comment le rein distingue-t-il ces deux situations différentes, pour favoriser dans le premier cas la réabsorption de sodium et dans le second cas la sécrétion de potassium ? Cet état de faits difficilement explicable par les connaissances physiologiques actuelles est appelé « paradoxe de l'aldostérone ».

Les mécanismes par lesquels WNK4 inhibe NCC ou ROMK étant indépendants, cela permet en théorie une régulation différentielle de chaque fonction [163]. Pour cette raison, de nombreux auteurs considèrent WNK4 comme un candidat idéal pour être le facteur qui régulerait l'action préférentielle de l'aldostérone en fonction du contexte. WNK4 serait ainsi un effecteur à part entière du système rénine-angiotensine-aldostérone : elle jouerait le rôle d'interrupteur moléculaire qui orienterait l'effet de l'aldostérone plutôt vers une voie favorisant la réabsorption de sel ou une voie permettant la sécrétion de potassium.

Une différence importante entre l'hypovolémie et l'hyperkaliémie étant l'augmentation de l'angiotensine II dans le premier cas, on pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle l'angiotensine II modifie WNK4 de manière analogue aux mutations de l'HHF, permettant la réabsorption de sodium tout en freinant la sécrétion de potassium [96,180].

La découverte d'un état fonctionnel de WNK4 [142], phosphorylé par SGK1, qui augmente l'activité d'ENaC mais également celle de ROMK (voir figure 12) alors que la forme sauvage inhibe les deux et la forme mutée HHF augmente ENaC et inhibe ROMK, est venue conforter les potentielles capacités de régulateur différentiel de la kinase.

Le mécanisme par lequel l'angiotensine II pourrait être le signal privilégiant la réabsorption de sel en limitant la déplétion potassique *via* WNK4 commence à être élucidé. Nous avons vu que SGK1, en phosphorylant WNK4, atténue la capacité de WNK4 à inhiber ROMK, ce qui peut favoriser la sécrétion de potassium en cas d'hyperkaliémie ou de régime riche en potassium. Restait à expliquer cependant qu'une hypovolémie, qui pourtant active aussi SGK1, ne favorise pas la sécrétion de potassium. L'équipe de Wang [181,182] a montré que cette voie est modulée par un nouvel acteur, la « *src family protein tyrosine kinase* », c-Src, qui diminue la phosphorylation de WNK4 par SGK1. Or c-Src est diminuée par un régime riche en potassium et augmentée par un régime pauvre en potassium ainsi que par l'angiotensine II [182,183]. Ces données pourraient faire de c-Src le facteur qui module plus

ou moins la voie SGK1-WNK4-ROMK en fonction de la situation (figure 12). L'ensemble demande à être confronté à des études complémentaires mais permet d'élaborer une explication pour résoudre le paradoxe de l'aldostérone.

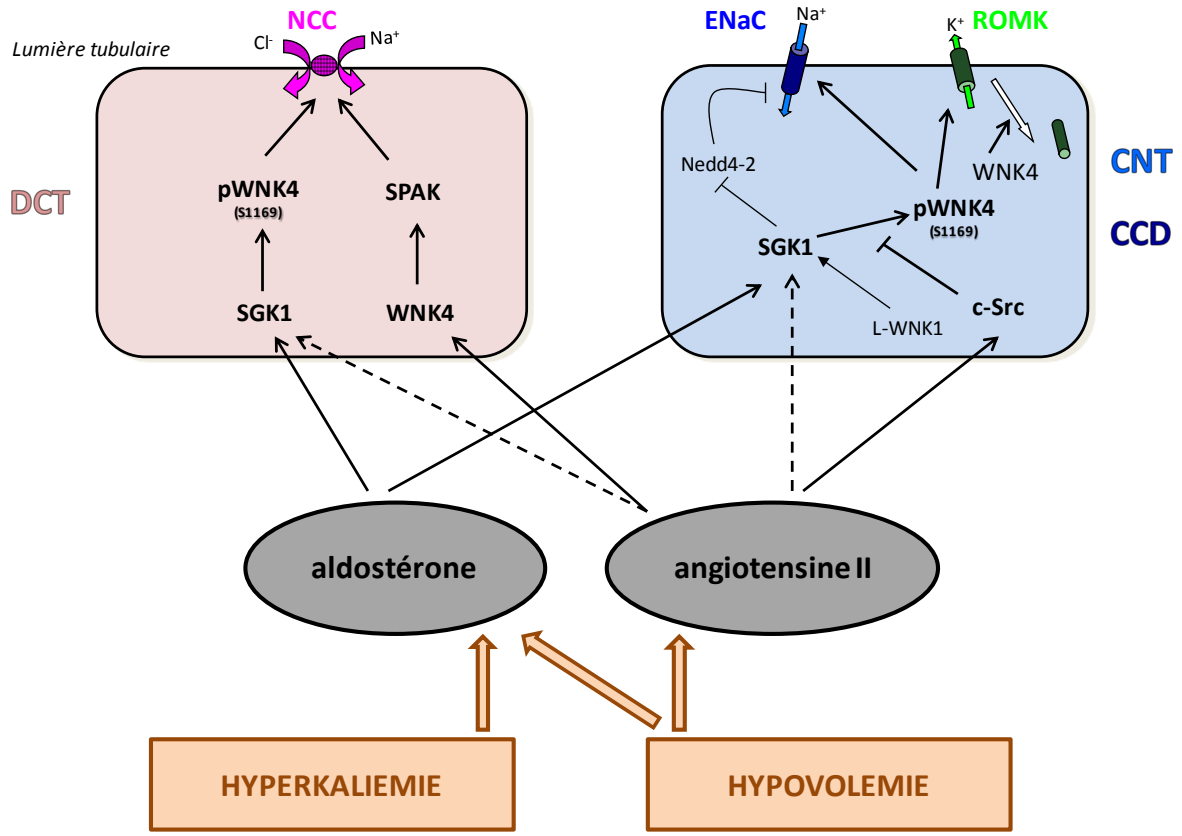


Figure 12 : Paradoxe de l'aldostérone : implication de WNK4 dans la réponse différentielle à une hyperkaliémie ou une hypovolémie. L'angiotensine II, qui n'est activée qu'en cas d'hypovolémie, active c-Src, qui inhibe la phosphorylation de WNK4 par SGK1, laissant ainsi place à l'inhibition basale de ROMK par WNK4. Ainsi, en cas d'hypovolémie, la réabsorption de sodium est stimulée en présence d'une inhibtion relative de la sécrétion de potassium. L'activation éventuelle de SGK1 par l'angiotensineII n'a pas été démontrée expérimentalement (pointillés). Les flèches symbolisent une régulation positive.

3. WNKs et inhibiteurs de calcineurine

Les inhibiteurs de calcineurine tels que la ciclosporine, traitements immunosuppresseurs fréquemment utilisés dans le cadre de la transplantation, entraînent des effets secondaires proches de ceux de l'HHF, à savoir hyperkaliémie, hypertension, hypercalciurie et acidose métabolique hyperchlorémique, le tableau pouvant être complet ou partiel [184]. L'équipe de Farfel [185] a étudié les modifications de WNK4 chez des rats traités par la ciclosporine (25 mg/kg en injection sous-cutanée pendant 14 jours). Les rats ainsi traités développent une hypertension, une hyperkaliémie et une hypercalciurie. L'expression protéique de WNK4 dans le rein augmente d'un facteur 4. De manière concordante, le niveau d'expression des transcrits et de la protéine WNK4 augmente dans les cellules mDCT en présence de ciclosporine. Une partie des effets secondaires de la ciclosporine pourrait donc être médiée par les kinases WNKs. Cette première étude a été confirmée récemment par des travaux réalisés à la fois chez l'homme et la souris [186]. Il a ainsi été montré que le tacrolimus augmente l'expression de NCC aussi bien chez l'homme que chez la souris. Des patients transplantés sous inhibiteurs de calcineurine semblent avoir une activité de NCC supérieure à des patients contrôles, jugée sur l'excrétion fractionnelle du chlore en réponse à une injection de thiazidique. Le tacrolimus n'entraîne pas d'HTA chez les souris *NCC*$^{-/-}$. Chez la souris, l'expression de WNK3, WNK4 et SPAK est également augmentée. L'ensemble de ces résultats impliquent l'activation du co-transporteur NCC, au moins en partie *via* WNK4, dans les effets métaboliques des inhibiteurs de calcineurine. De ce fait, on peut désormais recommander de traiter ces troubles, lorsque nécessaire, par les diurétiques thiazidiques.

Conclusion et objectifs du travail de thèse

Les kinases WNK, découvertes il y a 11 ans, ont depuis fait l'objet d'un nombre de publications en croissance exponentielle. Elles ont en effet permis de comprendre l'hypertension hyperkaliémique familiale, dont le phénotype était inexplicable avant la découverte de ces kinases. Elles ont en outre permis d'élucider certains mécanismes de régulation du co-transporteur NCC. Ces kinases sont également de nouveaux effecteurs de l'aldostérone et permettront peut-être de comprendre comment cette hormone peut privilégier la sécrétion de potassium ou la réabsorption de sel en fonction du contexte. Enfin, les variants de *WNK1* et *WNK4* pourraient participer à l'HTA essentielle. Les kinases WNKs et leur partenaires apparaissent clairement comme de nouvelles cibles d'intérêt pour la mise au point de traitements anti-hypertenseurs.

Mais en dehors de leur rôle dans la physiologie rénale, de nouvelles perspectives tout aussi passionnantes apparaissent à la lumière de quelques publications récentes. En effet, les WNK régulent la mitose et la différentiation cellulaire et semblent être impliquées dans la tumorigenèse de plusieurs cancers. De plus, elles ont un rôle certain, mais dont les mécanismes restent à découvrir, dans le système nerveux périphérique et central. Outre la perspective de nouveaux mécanismes physiopathologiques, on voit là-aussi se dessiner un enjeu pharmacologique majeur pour le futur.

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait pour objectif d'approfondir certains aspects encore mal explorés concernant la kinase WNK1. Un premier aspect consistait à caractériser les phénomènes d'épissage alternatif auxquels est soumis le gène *WNK1*, et qui avaient jusqu'à présent été étudiés de manière très incomplète. Il s'agissait de définir les différentes isoformes de WNK1, générées par épissage alternatif, et leur distribution

tissulaire. Cette étude nous paraissait en effet indispensable à une meilleure connaissance des fonctions de WNK1, dans le rein comme dans les autres organes. Parallèlement, un deuxième aspect concerne l'hypertension hyperkaliémique familiale par mutation de *WNK1*. En effet, si de nombreuses études et en particulier plusieurs modèles animaux ont permis de mieux comprendre le mécanisme de l'HHF par mutation de *WNK4*, la compréhension de la pathologie liée à la mutation de *WNK1* est quant à elle limitée par l'absence de modèle animal. Nous avons donc généré et caractérisé des souris porteuses d'une délétion constitutive du premier intron de *WNK1*.

Première partie : un épissage alternatif tissu-spécifique génère de multiples isoformes de *WNK1*

I. Introduction

1. Les isoformes de WNK1 : état des connaissances

Le gène *WNK1* est à l'origine de deux isoformes principales générées grâce à des promoteurs alternatifs : L- et KS-WNK1. La situation est cependant beaucoup plus complexe puisque le gène est également soumis à épissage alternatif. Avant ce travail, il avait été rapporté que les exons 11 et 12 chez l'homme et la souris et l'exon 9 chez l'homme étaient soumis à épissage alternatif, mais la fréquence et la distribution tissulaire de ce phénomène n'avaient jamais été étudiés (voir paragraphe II-3-c de l'introduction). De plus, une équipe canadienne avait rapporté l'existence de deux nouveaux exons, 8b et HSN2, au sein de l'intron 8 de *WNK1*, qui seraient spécifiquement exprimés dans le système nerveux central et impliqués dans la perception douloureuse. Depuis ces travaux, aucune étude ne s'est intéressée à ces deux nouveaux exons et à leur profil d'expression; en particulier, leur existence chez l'homme n'avait pas été mise en évidence. En contraste avec une littérature abondante sur WNK1, les données concernant les isoformes de la kinase restaient donc très parcellaires.

2. Les rôles extra-rénaux des kinases WNK

On peut prédire de sa longueur et du nombre de motifs PXXP, sites d'interaction avec les domaines SH3, que WNK1 interagit avec plus de 50 protéines [187]. De plus, le profil d'expression de WNK1 est très large et n'est pas restreint au rein. Il apparaît donc que le rôle

de la kinase dépasse sans doute largement la régulation de la pression artérielle. Nous résumons ici les connaissances émergentes sur les rôles de WNK1 en dehors du rein. C'est dans cette perspective que la description des isoformes extra-rénales de WNK1 prend tout son sens. En effet, outre son rôle de régulateur des échanges ioniques au niveau du néphron distal, WNK1 a de nombreuses autres fonctions qui sont très partiellement élucidées.

a) WNK1 et système cardiovasculaire

L'étude du développement des souris *knock-out* homozygotes pour *WNK1*, qui meurent *in utero* entre 10,5 et 12,5 jours de vie embryonnaire [123,125], a révélé un rôle majeur de WNK1 dans l'embryogenèse du système cardiovasculaire, en accord avec sa forte expression dans le système cardiovasculaire de l'embryon [35]. Le cœur des embryons *WNK1*$^{-/-}$ est plus petit que celui des embryons contrôles et on constate un défaut de remodelage vasculaire aussi bien dans l'embryon lui-même que dans le sac vitellin. Les marqueurs veineux se retrouvent exprimés au niveau artériel et réciproquement. L'inactivation de WNK1 spécifiquement dans les cellules endothéliales reproduit un phénotype identique, qui est restauré par un transgène permettant l'expression endothélium-spécifique de WNK1, suggérant que c'est WNK1 exprimée par l'endothélium qui joue un rôle fondamental dans le développement cardiovasculaire [125].

Chez la souris adulte, WNK1 est impliqué dans la vasoconstriction en réponse à une stimulation α1-adrénergique ainsi que dans le tonus myogénique, tous deux diminués chez les souris *WNK1*$^{+/-}$ [124]. Ceci pourrait faire intervenir la voie SPAK/NKCC1, dont la phosphorylation est diminuée dans les artères de souris *WNK1*$^{+/-}$ [124,188]. Ce résultat est à rapprocher de la moindre contraction d'anneaux aortiques en réponse à la phényléphrine chez les souris *knock-out SPAK*$^{-/-}$ [136].

b) Prolifération, migration, différentiation cellulaire

WNK1 participe aux fonctions de prolifération, de migration et de différentiation cellulaires. Ainsi, le gène codant pour la kinase WNK1 de la drosophile a été identifié comme un gène indispensable à la survie de cellules de drosophiles en culture [189]. De même, l'inhibition de l'expression de WNK1 par siRNA dans une lignée de progéniteurs neuronaux de souris entraîne une diminution de la prolifération, de la migration et de la différentiation cellulaires [39]. Enfin, WNK1 a été identifié dans des études de screening à large échelle parmi les gènes impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération [190,191]. Le rôle de WNK1 dans la mitose a récemment été mis en lumière par une étude du groupe de Mélanie Cobb [192], qui montre que si, WNK1 est localisée de manière diffuse et punctiforme dans le cytoplasme dans des cellules quiescentes, elle est localisée le long des fuseaux mitotiques des cellules en division. L'inhibition de l'expression de WNK1 par ARN interférence conduit à la désorganisation des fuseaux mitotiques, des erreurs de ségrégation mitotique et une survie cellulaire réduite.

Le domaine catalytique de WNK1 montre une forte homologie de séquence avec plusieurs membres de la famille des MAP kinases, qui jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire. Les kinases WNK, et en particulier WNK1, interagissent avec plusieurs cascades de MAPKs. Ainsi, WNK1 augmente l'activité de ERK5 *in vitro* [193]. Notons que ERK5 est impliqué dans les voies de signalisation de la prolifération cellulaire et dans le développement embryonnaire, en particulier dans le développement cardiovasculaire [194]. Pour Sun *et al.* [39], le rôle de WNK1 dans la prolifération, la migration et la différentiation de progéniteurs neuronaux en culture impliquerait aussi la voie des MAP kinases ERK1/2 et ERK5.

Cette connexion entre WNK1 et survie cellulaire est confortée par le fait que plusieurs auteurs ont trouvé un lien entre tumorigenèse et WNK1 ou ses orthologues WNK2, WNK3 et

WNK4 [195]. Ainsi, l'injection de cellules tumorales F-11 porteuses d'une inactivation de GD3 (ganglioside impliqué dans la croissance tumorale et les processus métastatiques) dans des souris *nude* est associée à une moindre croissance tumorale et à une diminution du nombre de métastases par rapport à celles observées suite à l'injection de cellules contrôles [196]. Or, l'inactivation de GD3 provoque une forte répression de l'expression de WNK1, suggérant un rôle potentiel de la kinase dans la malignité [197]. De plus, WNK1 pourrait jouer un rôle permissif dans l'adaptation des cellules malignes à leur métabolisme accéléré en favorisant la surexpression transporteur de glucose GLUT1 dans les cellules malignes [198].

Enfin, des études de séquençage à très large échelle ont mis en évidence un lien entre des mutations somatiques de *WNK1* et les cancers du sein et du colon [199,200], entre *WNK1* et *4* et diverses tumeurs solides [201] et entre *WNK2* et le cancer du poumon [202]. Deux études récentes ont également clairement identifié *WNK2* comme un gène suppresseur de tumeur [40,41], dont des modifications épigénétiques sont impliquées dans les gliomes infiltratifs de l'adulte

c) Rôle neurologique

Le rôle neurologique du variant d'épissage de WNK1/HSN2 a été présenté en détails dans l'introduction. Son inactivation à l'état homozygote est en effet responsable d'une abolition de la sensibilité thermo-algique. De nombreux transporteurs dont l'activité est modifiée par les WNKs ont aussi une expression neuronale, comme NKCC1, et il est possible que leur dérégulation en l'absence de WNK1/HSN2 soit impliquée dans la physiopathologie de l'HSAN2. De même, TRPV4, exprimé entre autres dans les ganglions de la racine dorsale, et inhibé par WNK1 [105], pourrait être impliqué dans l'HSAN2, d'autant qu'il est connu pour jouer un rôle dans la sensibilité thermo-algique [203]. De manière intéressante, il est possible que WNK3 puisse également jouer un rôle dans la sensibilité thermo-algique

puisqu'il a été décrit un seuil de perception douloureuse anormalement élevé chez des patients porteurs d'une délétion d'une région du chromosome X incluant 3 gènes dont *WNK3* [204].

WNK1 semble impliqué dans la myélinisation des axones et l'extension des neurites sur des cultures primaires de neurones corticaux [205]. De plus, WNK1 se lie à la synaptotagmine 2 (Syt2) et la phosphoryle au niveau du domaine de liaison au calcium C2, ce qui augmente la quantité de calcium nécessaire à la liaison de Syt2 au vésicules phospholipidiques. Or Syt2 régule l'exocytose dans les neurones et les cellules neuroendocrines en fonction de la présence de calcium.

L'ensemble de ces données est dispersé et incomplet mais oriente vers un rôle important de WNK1 dans le système nerveux. Ce champ d'investigation quasi-vierge est certainement un thème à explorer dans les années qui viennent.

3. Objectifs de l'étude

WNK1 est exprimé de manière ubiquitaire. L'exemple de HSN2 illustre bien comme un exon peut jouer un rôle-clé pour une fonction tissu-spécifique d'une protéine. A l'inverse, l'absence de HSN2 ne semble avoir aucun retentissement rénal.

Alors que les rôles extra-rénaux de WNK1 commencent tout juste à être élucidés et suscitent un intérêt croissant, connaitre les différentes isoformes du gène et leur profil d'expression tissulaire chez l'homme et la souris nous apparaissait être un pré-requis indispensable à l'étude des multiples fonctions de la kinase. De la même manière, au sein du rein, les profils d'expression de L et KS-WNK1 sont bien connus, mais les éventuels phénomènes d'épissage alternatif ne le sont pas, ce qui limite l'interprétation des différentes études *in vitro* sur le rôle de la kinase. Il nous paraissait donc important d'étudier le niveau d'expression des différents exons alternatifs dans le rein.

Le but de notre étude était donc de décrire les différentes isoformes de WNK1 générées par épissage alternatif et de quantifier leur expression respective dans un large panel de tissus humains et murins ainsi dans les segments du néphron microdisséqués de la souris.

4. Résumé de l'article

a) Les exons alternatifs de *WNK1*.

Nous avons tout d'abord recherché les exons de *WNK1* soumis à épissage alternatif en combinant trois approches : une revue de la littérature, une étude de la banque de données EST à la recherche de séquences suggérant l'absence ou l'ajout d'un exon, et la réalisation de RT-PCR dans de multiples tissus d'homme et de souris, amplifiant différentes régions du gène *WNK1*, à la recherche de produits dont la taille diffère de la taille attendue.

Nos résultats ont confirmé l'épissage alternatif des exons HSN2, 9, 11 et 12. Nous avons de plus mis en évidence la présence tout à fait inattendue de l'exon HSN2 dans de multiples tissus autres que le système nerveux. Nous avons cloné l'exon 8b murin (déposé dans Genbank) et montré que cet exon n'est pas exprimé chez l'homme. Nous avons enfin montré que l'exon 26 était soumis à épissage alternatif chez l'homme, mais pas chez la souris, et avons découvert deux nouveaux exons, 26a et 26b, exprimés spécifiquement dans les tissus nerveux chez l'homme comme chez la souris et conservés à 100% entre ces deux espèces. Dans les segments du néphron, l'isoforme longue de WNK1 est exprimée à quantité égale dans tous les segments tubulaires en dehors d'un taux deux fois plus important dans le glomérule et deux fois moindre dans le DCT. KS-WNK1 est exprimé très fortement dans le tubule contourné distal (DCT). Son expression est plus large qu'initialement décrit puisque l'exon 4a est également détecté dans le CNT et le TAL. Les exons alternatifs 11, 12, 8b et

HSN2 suivent le profil des deux isoformes avec une expression nettement augmentée dans le DCT, preuve que tous sont exprimés aussi bien par L-WNK1 que KS-WNK1.

b) Méthodologie

Outre cette description qualitative des différentes possibilités d'épissage de WNK1 et du profil d'expression de chaque exon, nous souhaitions également quantifier, au sein d'un tissu donné, les proportions respectives des différentes isoformes exprimées dans ce tissu. Un premier aspect de notre travail a consisté à établir une nouvelle méthodologie, dérivée de la RT-QPCR, afin de répondre à cette problématique.

En effet, la RT-QPCR est l'outil de choix pour déterminer le profil d'expression d'une isoforme ou d'un exon dans un panel de tissu ou différentes conditions. Cependant, une limitation intrinsèque de la méthode est que l'expression est arbitrairement fixée dans un tissu, ou une condition, qui sert de calibrateur. Si l'on prend l'exemple de la région 10-13, où les exons 11 et 12 peuvent être épissés, seuls ou séparément, une manière d'étudier ce phénomène dans un panel de tissus consiste à établir les profils d'expression des exons 11 et 12. Pour chacun, un tissu sera choisi comme calibrateur. En conséquence on pourra conclure que le niveau d'expression de l'exon 11 est 3 fois supérieur dans tel tissu par rapport à tel autre, mais on ne pourra dire si l'exon 11 est plus ou moins exprimé que l'exon 12 au sein d'un tissu donné. C'est pour contourner cette limitation que nous avons développé une nouvelle méthode d'analyse des résultats de RT-QPCR. Cette méthode nécessite le respect de trois conditions:

1/ il faut définir comme « gène de référence » une portion d'ARNm commune à l'ensemble des isoformes, c'est-à-dire jamais épissée,

2/ il faut établir des couples de primers qui reconnaissent spécifiquement des isoformes mutuellement exclusives dans une région donnée,

3/ la QPCR doit être réalisée dans au moins autant de tissus ou conditions qu'il y a d'isoformes différentes.

Ces conditions permettent d'écrire des équations dans chaque tissu, dont la résolution permet de définir le ratio réel du gène d'intérêt sur le gène de référence, sans recourir à un calibrateur. Le gène de référence étant une portion du gène présente dans toutes les isoformes et le gène d'intérêt étant l'une des isoformes de WNK1, ce ratio nous indique le pourcentage de l'isoforme reconnue par le couple de primers par rapport à l'ensemble des isoformes de WNK1.

c) Profil d'expression des isoformes de WNK1

L'application de cette méthodologie à un large panel de tissus humains et murins nous a permis d'établir les profils d'expression des différentes isoformes de la kinase, et au sein d'un tissu donné, les proportions respectives des différents variants d'épissage. L'application de notre méthodologie a mis en évidence une spécificité d'expression tissulaire des différentes isoformes, largement conservée entre l'homme et la souris. A titre d'exemple, nous avons ainsi pu montrer que dans le rein, chez l'homme comme chez la souris, l'isoforme largement majoritaire (environ 70%) est la « Δ11 », tandis que l'isoforme dont seul l'exon 12 est épissé n'est quasiment pas exprimée. Les données sont illustrées par les figures 2, 3 et 4 chez l'homme et les figures supplémentaires S2, S3 et S4 chez la souris. Les tableaux supplémentaires 1 et 2 rassemblent les pourcentages d'expression de chaque variant dans chaque tissu, pour les deux espèces.

II. Premier article

A New Methodology for Quantification of Alternatively Spliced Exons Reveals a Highly Tissue-Specific Expression Pattern of WNK1 Isoforms

Emmanuelle Vidal-Petiot[1,2], Lydie Cheval[2,3☯], Julie Faugeroux[1,2☯], Thierry Malard[4], Alain Doucet[2,3], Xavier Jeunemaitre[1,2,5], Juliette Hadchouel[1,2*]

PloS ONE, 2012

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

A New Methodology for Quantification of Alternatively Spliced Exons Reveals a Highly Tissue-Specific Expression Pattern of WNK1 Isoforms

Emmanuelle Vidal-Petiot[1,2], Lydie Cheval[2,3☯], Julie Faugeroux[1,2☯], Thierry Malard[4], Alain Doucet[2,3], Xavier Jeunemaitre[1,2,5], Juliette Hadchouel[1,2]*

1 INSERM UMR970 - Paris Cardiovascular Research Center - Paris, France, **2** University Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculty of Medicine, Paris, France, **3** UPMC Univ Paris 06 and INSERM UMRS 872 and CNRS ERL726 - Cordeliers Research Center - Paris, France, **4** CNRS, LCTS, UMR5801, Pessac, France, **5** AP-HP, Department of Genetics, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Abstract

Mutations in the *WNK1* gene, encoding a serine-threonine kinase of the WNK (With No lysine (K)) family, have been implicated in two rare human diseases, Familial Hyperkalemic Hypertension (FHHt) and Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy type 2 (HSAN2). Alternative promoters give rise to a ubiquitous isoform, L-WNK1, and a kidney-specific isoform, KS-WNK1. Several other isoforms are generated through alternative splicing of exons 9, 11 and 12 but their precise tissue distribution is not known. Two additional exons, 8b and HSN2, involved in HSAN2, are thought to be specifically expressed in the nervous system. The purpose of this study was to establish an exhaustive description of all WNK1 isoforms and to quantify their relative level of expression in a panel of human and mouse tissues and in mouse nephron segments. For the latter purpose, we developed a new methodology allowing the determination of the proportions of the different isoforms generated by alternative splicing. Our results evidenced a striking tissue-specific distribution of the different isoforms and the unexpected presence of exon HSN2 in many tissues other than the nervous system. We also found exon 26 to be alternatively spliced in human and identified two new exons, 26a and 26b, within intron 26, specifically expressed in nervous tissues both in humans and mice. *WNK1* should therefore no longer be designated as a 28- but as a 32-exon gene, with 8 of them - 8b, HSN2, 9, 11, 12, 26, 26a and 26b - alternatively spliced in a tissue-specific manner. These tissue-specific isoforms must be considered when studying the different roles of this ubiquitous kinase.

Citation: Vidal-Petiot E, Cheval L, Faugeroux J, Malard T, Doucet A, et al. (2012) A New Methodology for Quantification of Alternatively Spliced Exons Reveals a Highly Tissue-Specific Expression Pattern of WNK1 Isoforms. PLoS ONE 7(5): e37751. doi:10.1371/journal.pone.0037751

Editor: Eric Feraille, University of Geneva, Switzerland

Received January 23, 2012; **Accepted** April 27, 2012; **Published** May 31, 2012

Copyright: © 2012 Vidal-Petiot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by INSERM the European Community's 7th Framework Program (HEALTH-F2-2007-201590, EUNEFRON program), the Fondation Leducq Transatlantic Network on Hypertension, and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-05-MRAR-010-01). E.V-P. was a recipient of a "Poste d'accueil Inserm". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juliette.hadchouel@inserm.fr

☯ These authors contributed equally to this work.

Introduction

WNK1 (With No lysine (K) 1) is a serine threonine kinase of the WNK family, which comprises 4 members (WNK1 to WNK4). Large deletions of the first intron of the *WNK1* gene are implicated in Familial Hyperkaliemic Hypertension (FHHt), a rare autosomal dominant disease characterized by a dysfunction of the distal nephron [1]. The majority of studies conducted to date have focused on its role in the kidney [2]. However, WNK1 is ubiquitous and recent studies have started to highlight its functions in extrarenal tissues (for review, see [3]). WNK1 plays a major role in cardiovascular tissues both in the adult mouse, where it regulates vasoconstriction in response to α_1-adrenergic receptors [4], and in the mouse embryo, where it participates in arterio-venous specification [5,6]. In addition, *in vitro* studies clearly implicate WNK1 in cell migration, division and differentiation [7,8], possibly through the MAP kinase pathway [8,9], and large scale sequencing studies have shown a link between somatic mutations of *WNK1* and several types of cancer [10,11,12]. Finally, mutations in exon HSN2 of *WNK1*, located within intron 8, are responsible for a form of congenital insensitivity to pain, HSAN2 (Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy type 2) [13]. Exon HSN2 is described as being exclusively expressed in the nervous system, associated with another exon named 8b in some transcripts [13], but the role of the protein sequence encoded by 8b and HSN2 is unknown.

WNK1 is encoded by a very large gene located on human chromosome 12, which spans over 160 kb and has so far been considered as containing 28 exons. It gives rise to multiple isoforms that may explain the different roles of the kinase. Alternative promoters control the expression of L- and KS-WNK1 [14,15], which stand for Long and Kidney-Specific WNK1 respectively. L-WNK1, with its transcript starting at exon 1, is ubiquitously expressed under the control of proximal promoters [14]. KS-WNK1 is a shorter kinase-deficient isoform as its transcription starts at exon 4a, replacing the first 4 exons which encode most of the kinase domain. It is highly and specifically expressed in the Distal Convoluted Tubule (DCT) and Connecting Tubule (CNT)

of the nephron. The situation is much more complex than this as *WNK1* is also subjected to alternative splicing [3]. Exons 11 and 12 are alternatively spliced in human and mouse as well as exon 9 in human only [14,15,16], but the pattern of expression of the corresponding transcripts has not been examined in detail.

In this study, we first sought to identify all alternatively spliced exons of *WNK1*. We confirmed the splicing of exons 9, 11, 12, 8b and HSN2 and identified exon 26 and two new exons, 26a and 26b, as novel alternatively spliced exons of *WNK1*. We then established the pattern of expression of these 8 alternatively spliced exons in a panel of human and mouse tissues and developed a new methodology to quantify the proportion of each WNK1 isoform in each tissue of interest. We thus show that the different isoforms display a striking tissue-specificity, which is partially conserved between human and mouse. When investigating the multiple roles of WNK1 in the different tissues, it now appears that one must take into account the tissue-specific isoforms of the kinase.

Results

A new procedure for the quantification of WNK1 isoforms

The aim of our study was not only to define the pattern of expression of all WNK1 transcripts generated by alternative splicing but also to estimate precisely how much of each isoform is present in a given tissue. Relative quantification with Real Time Quantitative RT-PCR (RT-QPCR) using the classical $2^{-\Delta\Delta CT}$ method allows the determination of the pattern of expression of a given gene in a panel of tissues or the comparison of its level of expression between two conditions, with one tissue or condition used as a calibrator [17]. However, it does not allow the comparison of the level of expression of two transcripts in a given tissue or condition, in our case two WNK1 isoforms. In order to circumvent this limitation, we developed a new analytical procedure, described in detail in the Methods section, which allowed us to determine the relative proportions of each WNK1 isoform in a panel of human and mouse tissues using RT-QPCR. Briefly, we used a "never-spliced" exon of WNK1 as a reference, instead of a classical housekeeping gene. Then, following the simple principle that the sum of all WNK1 isoforms in a tissue equals the level of expression of a 'never-spliced' WNK1 exon, in our case exon 8, we wrote equations in order to determine the real proportions of WNK1 isoforms. The values obtained for all WNK1 isoforms in both human and mouse are given in the subsequent figures and Tables S1, S2, S3.

Pattern of expression of L-and KS-WNK1 in human and mouse

Most data about the pattern of expression of WNK1 come from northern blot analyses performed with commercial multi-tissues blots, including those identifying the ubiquitous distribution of L-WNK1 and the kidney specific expression of KS-WNK1 [14,15,16,18]. We further characterized the tissue distribution of these two isoforms by quantifying their expression using RT-QPCR on a large panel of human and mouse tissues (Figure 1A and B). Surprisingly, in both species, the strongest expression of L-WNK1 is seen in the spinal cord. In brain, cerebellum, dorsal root ganglia (DRG), skeletal muscle, heart, aorta and lung, the expression is fairly strong in both species. The expression of L-WNK1 is weaker in the kidney and diminishes further in the colon. In both species, the lowest expression of L-WNK1 is seen in the liver. Our results confirm that the expression of KS-WNK1 is restricted to the kidney.

Expression of L-and KS-WNK1 was further characterized within the mouse kidney, in microdissected nephron segments (Figure 1C and Table S3). RT-QPCR confirmed that L-WNK1 is expressed all along the nephron at similar levels, except for a higher expression in the glomerulus and a lower expression in the DCT. In contrast, our analysis revealed that KS-WNK1 expression pattern is broader than previously reported. Its main sites of expression are the DCT and CNT. In the DCT, KS-WNK1 represents 99% of WNK1 isoforms and is expressed 80 times more than L-WNK1. In the CNT, KS-WNK1 represents 64% of WNK1 isoforms, respectively, but its expression level is 6 times less than in the DCT. KS-WNK1 is also the predominant isoform in the cTAL (64% of WNK1 isoforms), even though it is expressed 16 times less than in the DCT. Finally, KS-WNK1 is expressed at a very low level in the mTAL and CCD (50 to 65 times less than in the DCT), where it represents between 35 and 40% of WNK1 isoforms. In order to rule out that the low expression seen in the segments adjacent to the DCT is due to a contamination of these segments preparations by DCTs, we performed a RT-QPCR on the same preparations with primers recognizing the DCT-specific NaCl co-transporter NCC. As expected, NCC transcripts were detected only in the DCT preparations (Figure S1), thus showing that cDNAs from DCT do not contaminate other segments.

Identification of three alternative splicing regions in *WNK1*

In order to identify regions likely to be alternatively spliced, we combined three screening methods. First, we reviewed all relevant articles in the MEDLINE database; second, we screened the EST database for transcripts resulting from alternative splicing and, third, we amplified overlapping regions of WNK1 mRNA by RT-PCR. This allowed us to determine three regions of interest. The first is located between exons 8 and 10 and contains three alternative exons - 8b, HSN2, and 9 (Figure 2). The second, located between exons 10 and 13, contains two alternative exons - 11 and 12 (Figure 3). The third region, located between exons 25 and 27, has never been studied before. Our results show that exon 26 is alternatively spliced and identify two novel alternative exons, 26a and 26b (Figure 4).

Exons 8b, HSN2 and 9

Three exons are submitted to alternative splicing in the region located between exons 8 and 10. Exon 9 is spliced out of roughly half of the transcripts in all human tissues (Figure 2A). This splicing event does not occur in mice. Transcripts containing the remaining two, exons 8b and HSN2, were previously cloned and sequenced in mouse tissues [13], where they were described as specifically expressed in the nervous system. Our study confirms that the highest expression of HSN2 is observed in the mouse dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord, where it is present in 57% of WNK1 isoforms (Figure S1). However, its expression is not restricted to the nervous system. RT-PCR performed on the mDCT cell line, isolated from mouse DCT [19], showed that HSN2 expression outside the nervous system cannot be attributed solely to tissue innervations (Figure 2B). The HSN2-containing WNK1 protein, WNK1/HSN2, is also detected in the mouse kidney (Figure 2C). KS-WNK1 appears to contain exon HSN2 as well, as a PCR product is amplified between exons 4a and HSN2 (data not shown). This is further confirmed by quantification of the alternative exons in the different nephron segments, which shows that the expression of HSN2, even though very weak, follows that of the combination of L- and KS-WNK1, with a low level of expression along the kidney and a higher expression in the DCT (Figure S2). We show that exon 8b is only included when HSN2 is present and that its expression in mice is predominantly detected

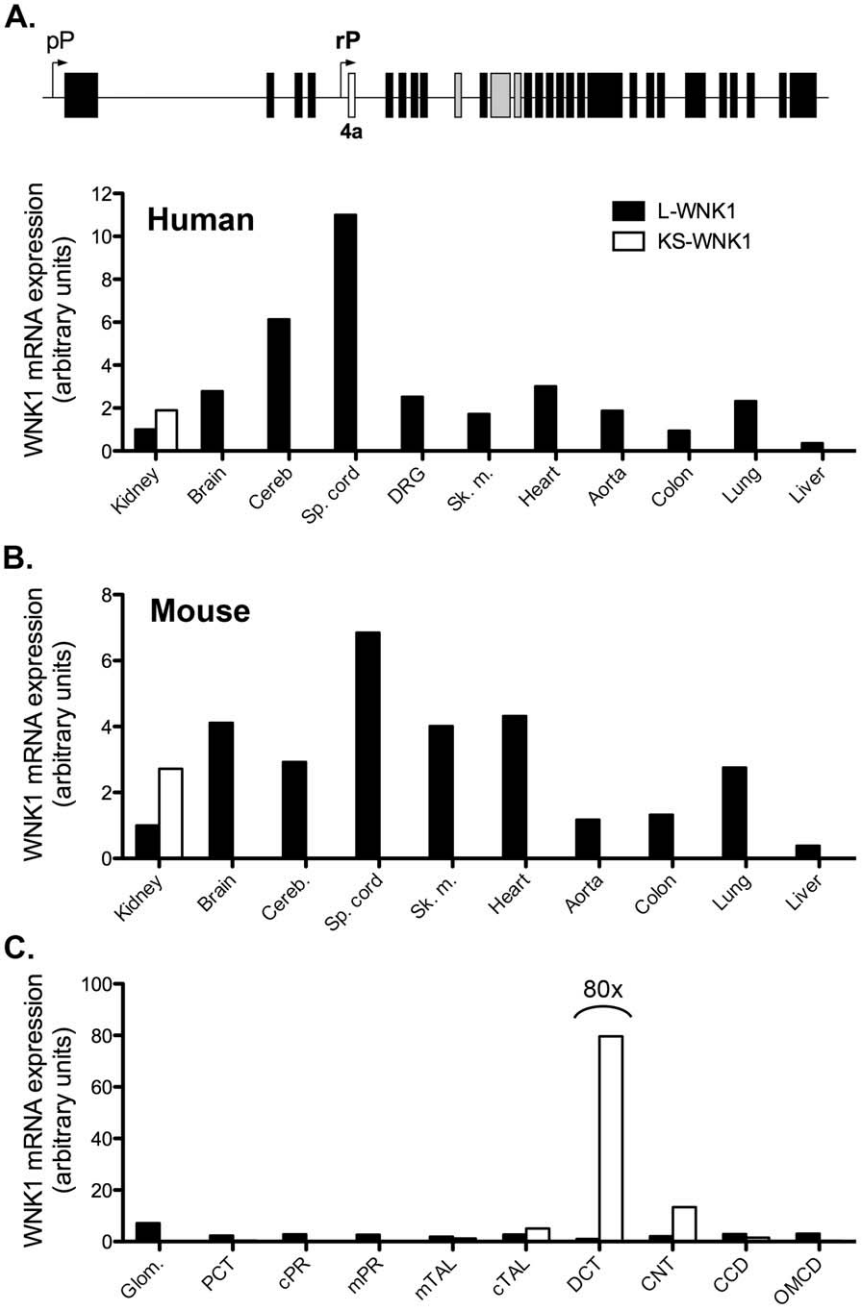


Figure 1. Level of expression of L-WNK1 and KS-WNK1 mRNA in a panel of human and mouse tissues. (A) Upper panel: Schematic representation of the *WNK1* gene. The proximal promoter (pP) drives the transcription of L-WNK1. The renal promoter (rP) controls the expression of KS-WNK1, whose transcription starts at exon 4a (white box), specific to this isoform. Expression of L-WNK1 was quantified by RT-QPCR using primers recognizing exons 2–3 in humans (lower panel in A) and 1–2 in mice (B). Expression of KS-WNK1 was quantified by RT-QPCR using primers recognizing exons 4a-5. *ubc* was used as a reference gene. The expression level of L-WNK1 was arbitrarily set to 1 in the kidney. Panel C presents the data obtained in microdissected mouse nephron segments using *RPL26* as a reference gene. The expression level of L-WNK1 was arbitrarily set to 1 in the DCT. Glom: glomerulus -PCT: Proximal Convoluted Tubule - cPR:cortical Pars Recta – mPR:medullary Pars Recta – mTAL: medullary Thick Ascending Limb of Henle's loop – cTAL: cortical Thick Ascending Limb of Henle's loop – DCT: Distal Convoluted Tubule – CNT: Connecting tubule – CCD: cortical Collecting Duct – OMCD: Outer Medullary Collecting Duct. Expression of L-WNK1 is arbitrarily set to 1 in the kidney (B) and in the DCT (C) and expression of KS-WNK1 is expressed relatively to L-WNK1, the ratio of KS-WNK1 over L-WNK1 being obtained as described in the method section.
doi:10.1371/journal.pone.0037751.g001

in the nervous system; however 12% of WNK1 isoforms in the aorta also contain this exon, a level comparable to that of the cerebellum.

In human, HSN2-containing transcripts are also expressed ubiquitously, with a much higher level of expression in the dorsal root ganglia, where 57% of WNK1 transcripts contain this exon (Figure 2A). WNK1/HSN2 represent only 3% of WNK1 isoforms in the spinal cord in human, thus demonstrating that the very strong expression of L-WNK1 in this tissue (Figure 1) is not due to the expression of this isoform. Exon 9 is always present in the

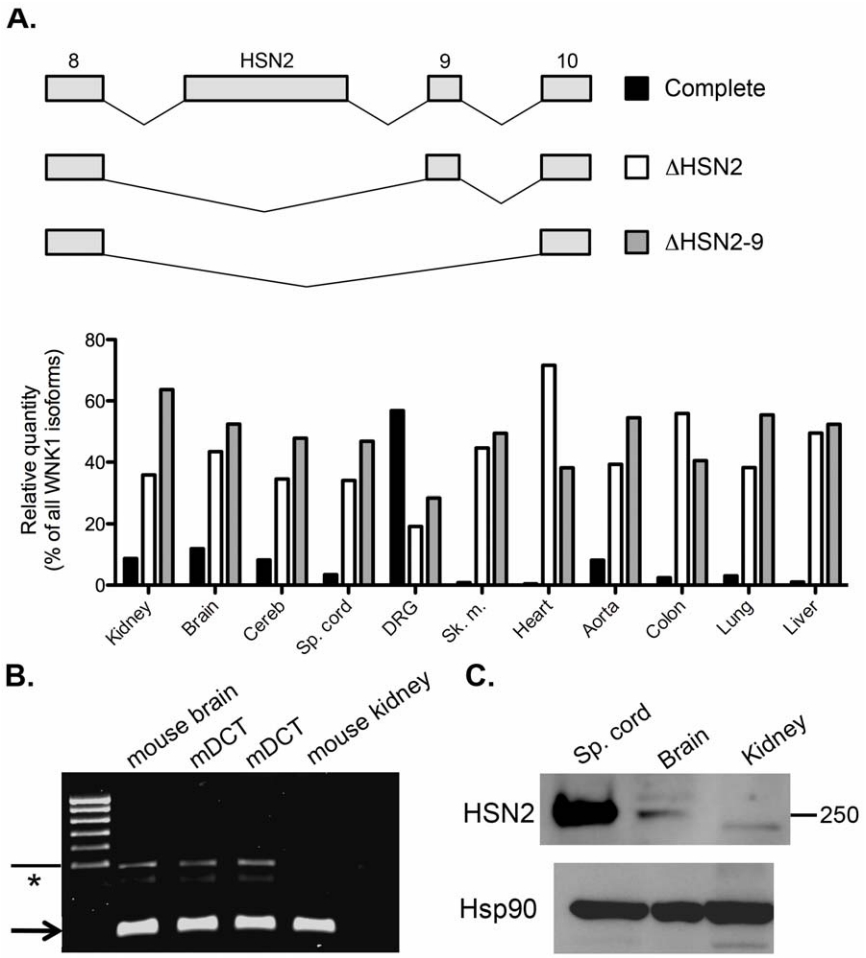


Figure 2. Pattern of expression and relative proportions of the human splice variants of region 8–10. (A) Upper panel: schematic representation of the different splicing events that can occur in this region. Lower panel: relative quantities of these variants in a panel of human tissues, expressed as a percentage of total WNK1 expression. Cereb.: Cerebellum; Sp. cord: spinal cord; DRG: Dorsal Root Ganglia; Sk. m.: Skeletal muscle. (B) A HSN2-containing WNK1 transcript is expressed in mDCT cells. RT-QPCR was performed between exon 8 and HSN2, resulting in the amplification of a 228 bp fragment (arrow), corresponding to the "Δ8b" isoform, and a 486 bp fragment (arrowhead), corresponding to the complete isoform. RNA extracts from mouse brain, expressing both isoforms, and from mouse kidney, expressing mostly the "Δ8b" isoform, were used as control. The weak band indicated by an asterisk results from a non-specific amplification (verified by sequencing). (C) The HSN2-containing protein is detected in the mouse kidney. Immunoblot of various mouse tissues incubated with an antibody directed against the portion of the protein encoded by HSN2. A strong signal is detected in the spinal cord and a lower signal in the brain and renal cortex. An immunoblot incubated with a HSP90 antibody shows equal loading of the different samples.
doi:10.1371/journal.pone.0037751.g002

WNK1/HSN2 isoform. Even though a genomic sequence highly homologous to that of mouse exon 8b can be found in the human genome database, we could not detect expression of this exon in human tissues, either by RT-PCR or RT-QPCR.

Exons 11 and 12

In both humans and mice, exons 11 and 12 are subjected to alternative splicing. Exon 11 can be spliced alone ("Δ11" isoform) or together with exon 12 ("Δ11–12" isoform) but exon 12 ("Δ12" isoform) is rarely spliced alone (Figure 3). Indeed, the "Δ12" isoform is expressed at very low levels in all tissues examined, except in the heart in both species and the skeletal muscle in human.

Each isoform shows a very specific pattern of expression (Figure 3 and Figure S3). The isoform including both exons ("complete" isoform) is expressed only in the heart, the skeletal muscle and neural tissues in both species but the level of expression differs between species. A very high expression of this isoform is observed in the human heart, where it represents 73% of all WNK1 isoforms, while it represents 30–48% of WNK1 isoforms in every aforementioned tissue in mice. "Δ11–12" is the predominant isoform in the aorta, particularly in human (69% and 52% of all WNK1 isoforms in human and mouse respectively).

The major isoform expressed in the kidney is "Δ11", which represents ~70% of WNK1 renal transcripts in both humans and mice. Exon 12 is the most abundant alternatively spliced exon in the nephron (Figure S3C). In order to determine if this exon is included in L-WNK1 and/or KS-WNK1, we calculated the ratio of exon 12 over exon 8 to estimate the proportion of transcripts containing this exon in each nephron segment (Figure S3D). This ratio is similar in all nephron segments (~80%), whether they express L-WNK1 only, such as the proximal tubules, or a large majority of KS-WNK1, such as the DCT (Figure S3D). This indicates that (1) 80% of L-WNK1 transcripts contain exon 12 in the segments expressing only L-WNK1 and (2) that 80% of KS-

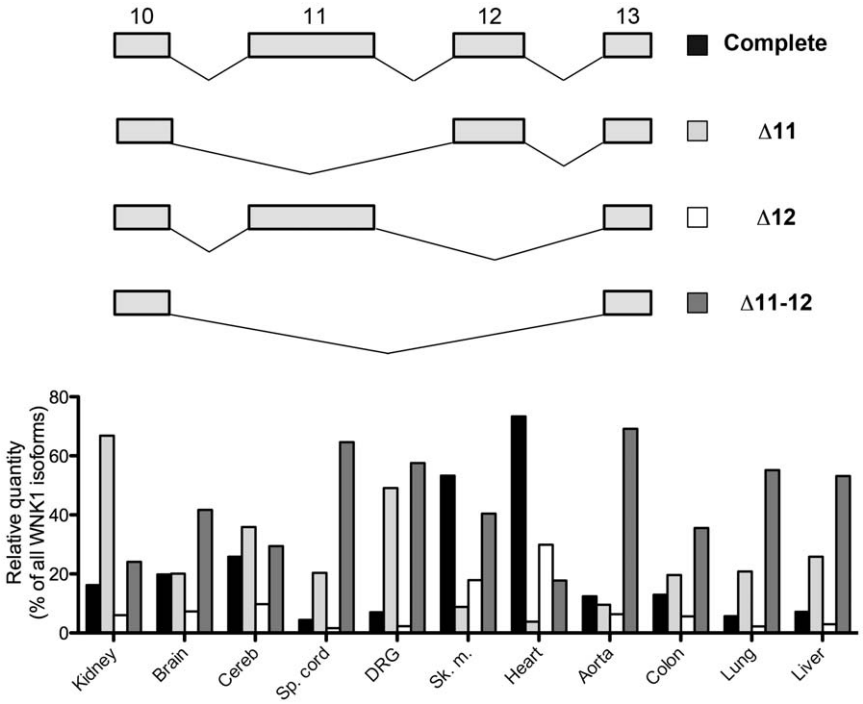


Figure 3. Pattern of expression and relative proportions of the human splice variants of region 10–13. Upper panel: schematic representation of the different splicing events that can occur in this region. Lower panel: relative quantities of these variants in a panel of human tissues, expressed as a percentage of total WNK1 expression.
doi:10.1371/journal.pone.0037751.g003

WNK1 transcripts contain exon 12 in the segments where KS-WNK1 is predominant. However, we cannot draw a conclusion about L-WNK1 transcripts in those segments as L-WNK1 is expressed at a very low level compared to KS-WNK1, particularly in the DCT where L-WNK1 represents only 1.5% of all WNK1 transcripts.

Exons 26, 26a and 26b

We identified for the first time the region between exons 25 and 27 as a region of interest concerning alternative splicing (Figure 4 and Figure S4). The amplification of WNK1 mRNA between exons 25 and 27 revealed, as expected, a band corresponding to the full length transcript (exons 25–26–27). The rare splicing of exon 26 could also be detected, but only in human. In neural tissues and skeletal muscle, we also detected PCR products longer than expected. Sequencing of these products revealed the existence of two new exons within intron 26 of *WNK1*, which we named 26a and 26b. While HSN2 does not appear to be specific to the nervous system, exons 26a and 26b are exclusively expressed in neural tissues and skeletal muscle. In both species, 26b can be present alone, especially in the central nervous system, whereas 26a is only present together with 26b. Exons 26a and 26b, 100% conserved between mouse and human, are respectively 72 and 42 nucleotides long. Their presence does not induce the appearance of a frameshift or a stop codon.

Discussion

Careful examination of the different isoforms of WNK1 revealed a much more complex situation than initially suspected [3]. Of the 28 usually described exons of WNK1 [16], four in humans (9, 11, 12 and 26) and two in mice (11 and 12) are subjected to alternative splicing. Because of its later discovery, exon 4a was not initially included in the 28 exons of WNK1. WNK1 contains four other exons: exons 8b and HSN2, discovered in the nervous system [13], and exons 26a and 26b, described here for the first time. Our study not only revealed the complex pattern of WNK1 isoforms but also allowed the quantification of each isoform in a panel of human and mouse tissues.

Relative quantification with RT-QPCR, based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula or the efficiency-corrected formula [20], is the most commonly used method to establish the pattern of expression of a given gene in different tissues or experimental conditions, with one tissue or condition used as a calibrator [17]. However, our goal was not only to establish the pattern of expression of WNK1 isoforms, but also to quantify the proportions of these isoforms in each tissue of interest. We developed a new methodology to analyze data from RT-QPCR in the case of multiple isoforms generated from one gene. This technique is a simple and inexpensive tool to quantify alternative splicing. Noteworthy, this methodology can also be extended to compare the expression of different genes as long as they share a 100% homologous region which can be used as a reference gene. This will often be the case for homologous genes.

The inclusion or deletion of any combination of the WNK1 alternative exons does not generate a frameshift or a stop codon. WNK1 is a large 250 kDa protein and the prediction of the potential role of these exons is difficult in the absence of a three-dimensional model of the WNK1 protein structure, as only the crystal structure of the kinase domain has been determined [21]. Computational tools do not predict motifs in these exons, which does not exclude their potentially important role in protein structure/function. This is obvious in the case of HSN2, as its mutated form leads to loss of pain perception, even though no functional motif can be identified.

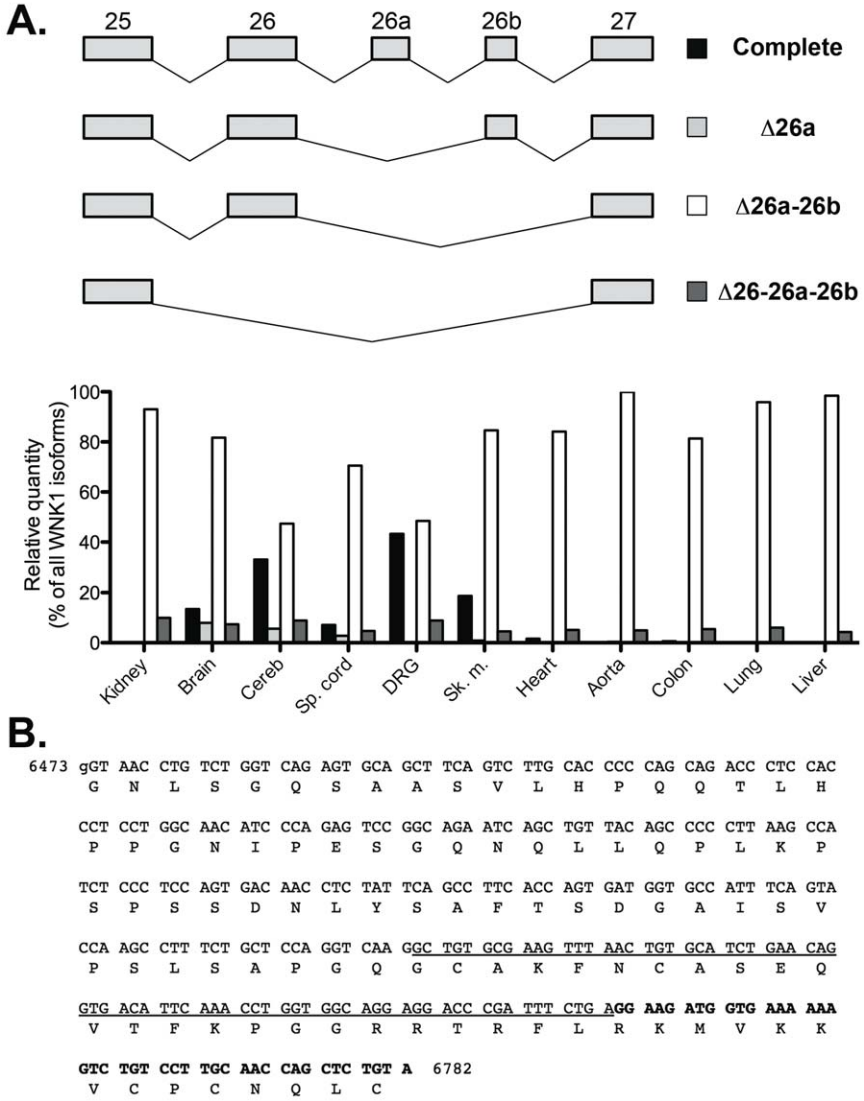


Figure 4. Pattern of expression and relative proportions of the human splice variants of region 25–27. (A) Upper panel: schematic representation of the different splicing events that can occur in this region. Lower panel: relative quantities of these variants in a panel of human tissues, expressed as a percentage of total WNK1 expression. (B) DNA and amino acid sequences of exons 26, 26a and 26b. Sequences of exon 26a and 26b are respectively underlined and in bold.
doi:10.1371/journal.pone.0037751.g004

An unexpected result was the clear amplification of a HSN2-containing transcript by PCR in non-neuronal tissues. Why this band was not detected previously [13] is not clear. While the authors did report a band in the kidney, they attributed this to contamination by adrenal tissue. In our case, kidney dissection was clear of adrenal tissue and the detection of HSN2 could not be attributed to the innervations of the kidney since we were able to amplify the same HSN2 transcript in different renal epithelial cell lines. These results do not diminish the crucial role of WNK1/HSN2 in the nervous system but opens the possibility that this isoform might have a function outside the nervous system. Interestingly, we observed a particularly high level expression of HSN2-containing transcripts in the human dorsal root ganglia, confirming the study conducted in mice [13].

One limitation of our study is that we considered all the studied tissues as a whole, the only exception being the kidney. All these tissues contain different cell types, which may express different WNK1 isoforms. This means that an isoform which is highly expressed in only one cell type could appear as a minor isoform in the whole tissue. For instance, there is only a two-fold difference between KS-WNK1 and L-WNK1 in the whole kidney, whereas KS-WNK1 is 80-times more expressed than L-WNK1 in DCT cells. Since WNK1 function has been mostly studied in the kidney, we focused on this tissue but the same could be true in others. HSN2-containing transcripts in the dorsal root ganglia may represent 100% of all transcripts in the satellite cells that envelop sensory neurons [13]. Similarly, the strong expression observed in the cerebellum probably results from an especially high expression in the granular layer and Purkinje cells [22], with fairly weak expression elsewhere.

These complex and tissue-specific alternative splicing events must be taken into account when interpreting some of the previously published data. For instance, alternative splicing of exon 12 is of particular importance as the main study which localized WNK1 by immunohistochemistry used an antibody against the portion of the protein encoded by exon 12 [23]. More

importantly, due to the incomplete knowledge of the tissue-specific isoforms of WNK1, none of the numerous studies conducted in *Xenopus oocytes* or cell lines has ever discussed which transcript was used and the transcript has never been adapted to the organ studied. Most *in vitro* studies on the function of WNK1 were performed with the rat isoform cloned by the laboratory of M. Cobb [18], which happens to be the "Δ11–12" isoform. To our knowledge, no renal study has been conducted with the isoform expressed specifically in this organ, i.e. the "Δ11" isoform. Such a detailed analysis has recently been reported for *WNK3*, the alternative splicing of which generates four different transcripts, with some being specifically expressed in the nervous system. If a first study concluded that brain and kidney WNK3 isoforms have opposite effects on NCC [24], a more recent and exhaustive study reported that all WNK3 transcripts display similar activities toward the co-transporters of the SLC12 family [25].

In conclusion, *WNK1* is a complex 32 exon-gene with multiple tissue-specific isoforms. Exons 8b, HSN2, 26a and 26b are newly identified alternatively spliced exons that may play a crucial role, as has already been demonstrated for HSN2. To be exhaustive, one should also add exon 4a, discovered a few years after the kinase was first cloned, making the total exon number 33. Of the classically described 28 exons of the gene, 4 are also alternatively spliced, namely exons 9, 11, 12 and 26. In total, 9 WNK1 exons are alternatively spliced, some expressed in a tissue-specific manner like exon 4a in the kidney and exons 26a and 26b in the nervous system, some expressed in all tissues investigated, with different preferential expressions like exon 11 in the heart and exon HSN2 in the neural tissues, and some expressed ubiquitously with no preferential expression, such as exons 9 and 26. The complexity of this gene must be taken into account in future studies of both the renal and extra-renal roles of WNK1.

Materials and Methods

Total RNA from mouse and human tissues

All mouse studies were performed in accordance with the French government animal policy (agreement number 75–1254). Total RNA was extracted from mouse tissues (4 C57Bl/6N 3 month-old males) using the Nucleospin® RNA II extraction kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Human total RNA extracts from various tissues were purchased from BD Clontech.

RT-PCR and DNA sequence analysis

Total RNA was treated with DNase (DnaseI, Ambion) and reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase and Random Primers (Life Technologies™). Alternative splicing was explored with primers complementary to non-spliced exons flanking the region of interest. The sequence of all primers used in this study is given in Table S4. The amplified fragments were visualized by electrophoresis on agarose gels. PCR products differing from the expected size were purified and subcloned into pGEM®-T (Promega) and sequenced using the Sanger method (GATC Biotech). The sequence of the complete human WNK1 coding sequence, containing exons HSN2, 26a and 26b, was deposited in Genbank (Accession number: JQ358908).

Real-time quantitative RT-PCR

Real-time quantitative RT-PCR (RT-QPCR) was carried out using intercalation of SYBR green (qPCR MasterMix Plus for SYBR®; Eurogentec) on a Chromo4 continuous fluorescence detector (MJ Research, Bio-Rad laboratories, Waltham, MA). Human or mouse cDNA was serially diluted by 1/5 to generate standard curves. Primers were used only if the efficiency calculated from the standard curves was 2 ± 0.05 and if the melting curve showed a single peak. No amplification was detected in samples that did not undergo reverse transcription.

Two reference genes, *18S* and *GAPDH* for human tissue, *18s* and *ubiquitin C* (*ubc*) for mouse tissue, and *ubc* and *RPL26* for mouse nephron segments were tested. Both reference genes gave similar results and the reference gene with the most stable expression (*18S* for human, *ubc* for mouse tissues and *RPL26* for nephron segments) was chosen to establish the pattern of expression of L- and KS-WNK1 in the tissue panel or nephron segments, using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula with the kidney or the DCT arbitrarily fixed as a calibrator. L-WNK1 expression was quantified using primers recognizing exons 1 and 2 (mouse) or 2 and 3 (human). KS-WNK1 expression was quantified using primers recognizing exons 4a (specific of KS-WNK1, Figure 1A) and 5. To examine WNK1 isoforms generated by alternative splicing, we designed primer pairs to overlap exons that are contiguous only in the isoform of interest (Figure S5).

Determination of the relative quantities of WNK1 isoforms in a given tissue

As described in the Results section, the relative quantification using the $2^{-\Delta CT}$ formula [17] does not indicate the real ratio of the gene of interest over the reference gene. For each couple of primers, the correction factor that would give the real value of this ratio is unknown and therefore the relative quantity of two transcripts in a given sample cannot be determined. We circumvented this limitation by developing a methodology to determine the correction factor which, applied to the $2^{-\Delta CT}$ ratio, gives the real ratio of the level of expression of the gene of interest over the reference gene.

The conditions needed to apply our method are the following:

1. a portion of the mRNA that is common to all isoforms must be determined and used as a internal reference gene.
2. primers should be designed to recognize specifically mutually exclusive isoforms (as illustrated in the case of region 10–13 in Figure S5).
3. The RT-QPCR should be run in at least as many tissues or conditions as there are different isoforms.

The following equations can then be written in every sample:

$$\sum_{i=1,n} [\text{isoform i}] = 1$$

$$\sum_{i=1,n} \alpha_i [\text{isoform i}]_Q = 1$$

where [isoform i] is the "true" expression ratio of isoform i relative to the reference gene, and $[\text{isoform i}]_Q$ is the ratio given by the $2^{-\Delta CT}$ formula, where ΔCT is the difference in threshold cycles for isoform i and the reference gene ($CT_i - CT_{ref}$) (see detailed formula below), which must be corrected by a factor α_i that is *a priori* unknown.

$$[\text{isoform i}]_Q = \frac{2^{CTref}}{2^{CTi}} = 2^{CTref\text{-}CTi} = 2^{-\Delta CT}$$

The n correction factors are determined using a simple algorithm run in C++ that calculates the average and the standard deviation

of the sum $S = \sum_{i=1,n} \alpha_i [isoform\ i]_Q$ in all analysed tissues for all possible combinations of α_i, with a minimal increment of 0.1 from 0.1 to 10. A filter is applied to the results stored in a MySQL database to retrieve the combination of correction factors (α_1 to α_n) that yields a value of S between 0.98 and 1.02 in the $\geq$n tissues, with the lowest relative standard deviation. This combination is then used to determine the true fraction of each isoform in each tissue.

Noteworthy, the correction factors determined by the equations include adjustment for the length of the amplicon, so there is no need to take that factor into account [26] when using our method. Our methodology applied to the results obtained using a formula that included the efficiency of the PCR reactions [20,26], or using values derived from a standard curve yielded the same results, which is not surprising since the primers were only used if the corresponding efficiency was very close to 2, a condition necessary for the validity of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula [17]. Results obtained for all WNK1 isoforms in both human and mouse are given in Tables S1, S2, S3. The unknown correction factors yield a sum of approximately 1 (or 100%) in each of the examined tissues, which validates our approach. The intrinsic imprecision of RT-QPCR, mainly due to pipetting inaccuracy, explains the fact that the sum of isoforms in each tissue is not exactly equal to 100%. Indeed, the same RT-QPCR experiment performed several times always gives slightly different results, with a precision of about 10% in our hands, explaining why the standard deviation of the means of the sums is around 5–10% for each isoform, and is expected to be higher when more isoforms are examined.

Example of L-WNK1 and KS-WNK1. Assuming that the sum of the "true" KS-WNK1-to-exon 8 expression ratio (denoted by [KS-WNK1]) and the "true" L-WNK1-to-exon 8 expression ratio (denoted by [L-WNK1]) is equal to 1 (or 100%), we have in every tissue:

$$[KS-WNK1]+[L-WNK1]=1$$

As described above, the ratios obtained by RT-QPCR (denoted $[KS-WNK1]_Q$ and $[L-WNK1]_Q$) must be pondered by correction factors, such that:

$$\alpha[KS-WNK1]_Q+\beta[L-WNK1]_Q=1$$

where α and β are *a priori* unknown. These factors were determined as described above. The original and corrected values are given in Table S3.

RT-QPCR on microdissected mouse nephron segments

Glomeruli and nephron segments from 6 C57Bl/6 adult males were characterized and microdissected from liberase-treated kidneys under a binocular microscope as previously described [27,28]. After microdissection, pools of tubules of identical structures from a single mouse were thoroughly rinsed and total RNA was extracted using the RNeasy® Micro Kit (Qiagen). Reverse transcription was performed simultaneously for all samples using the First-strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics) and Real-time QPCR was performed on a LightCycler (Roche Diagnostics) with the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics) as previously described [28].

Immunoblotting

Preparation of renal cortex, brain and spinal cord total protein extracts from mouse tissues and immunoblotting was performed as previously described [29]. The antiWNK1/HSN2 antibody was a gift of G. Rouleau (Montreal, Canada).

Supporting Information

Figure S1 Verification of the absence of contamination of the microdissected segments preparations by the DCT. The expression of the DCT-specific NaCl co-transporter NCC was quantified in the different nephron segments by RT-QPCR, using *RPL26* as a reference gene. Datas are means ± s.e.m from 6 mice. The expression level was arbitrarily fixed set to 100 in the DCT. Glom: glomerulus -PCT: Proximal Convoluted Tubule - cPR:cortical Pars Recta – mPR: medullary Pars Recta – mTAL: medullary Thick Ascending Limb of Henle's loop – cTAL: cortical Thick Ascending Limb of Henle's loop – DCT: Distal Convoluted Tubule – CNT: Connecting tubule – CCD: cortical Collecting Duct – OMCD: Outer Medullary Collecting Duct.
(PDF)

Figure S2 Pattern of expression and relative proportions of the splice variants of region 8–10 in mice. (A) Schematic representation of the different splicing events that can occur in this region. (B) Relative quantities of these variants in a panel of mouse tissues, expressed as a percentage of total WNK1 expression. Cereb.: Cerebellum; Sp. cord+DRG: Spinal cord+ Dorsal Root Ganglia; Sk. muscle: Skeletal muscle. Unlike the human situation, exon 9 is always included in the mouse WNK1 mRNA, which could also contain an additional exon, 8b. (C) Expression level of exons 8b, HSN2 and 11 in microdissected mouse nephron segments, relative to RPL26. Exon 11 was included to highlight the low expression of exons 8 h and HSN2, compared to exon 12, described in Figure S3C. Datas are means ± s.e.m from 6 mice.
(PDF)

Figure S3 Pattern of expression and relative proportions of the splice variants of region 10–13 in mice. (A) Schematic representation of the different splicing events that can occur in this region. (B) Relative quantities of these variants in a panel of mouse tissues, expressed as a percentage of total WNK1 expression. (C) Expression level of exons 11 and 12 in microdissected mouse nephron segments, relative to RPL26. Datas are means ± s.e.m from 6 mice. (D) Relative quantity of WNK1 transcripts containing exon 12 in microdissected mouse nephron segments, calculated as the ratio of exon 12 over exon 8.
(PDF)

Figure S4 Pattern of expression and relative proportions of the splice variants of region 25–27 in mice. Upper panel: schematic representation of the different splicing events that can occur in this region. Lower panel: relative quantities of these variants in a panel of mouse tissues, expressed as a percentage of total WNK1 expression. Unlike the human situation, exon 26 is never spliced out of the mouse WNK1 mRNA.
(PDF)

Figure S5 Schematic representation of the localization of the primers used to determine the relative quantity of the WNK1 isoforms. The example of region 10–13 is shown. One of the primers within one pair was designed such that it overlaps exons that are contiguous only in the isoform of interest. For example, to study the expression of the "Δ11" isoform, the

forward primer recognises a sequence located in exon 10 while the reverse primer overlaps exons 10 and 12.
(PDF)

Table S1 Relative quantities of WNK1 isoforms in a panel of human tissues.
(PDF)

Table S2 Relative quantities of WNK1 isoforms in a panel of mouse tissues. * Spinal cord samples also contain the Dorsal Root Ganglia.
(PDF)

Table S3 Relative quantities of L-WNK1 and KS-WNK1 in microdissected mouse nephron segments. $[\text{L-WNK1}]_Q$ and $[\text{KS-WNK1}]_Q$ are the values of the ratio of each transcript over exon 8, given by the $2^{-\Delta CT}$ formula. [L-WNK1] and [KS-WNK1] are the "true" expression ratio. α and β are the calculated correction factors. The ratios given here, being expressed over exon 8, represent the proportion of L-or KS-WNK1 amongst all WNK1 transcripts. Glom: Glomerulus - PCT: Proximal Convoluted Tubule - cPR: cortical Pars Recta - mPR: medullary Pars Recta - mTAL: medullary Thick Ascending Limb of Henle's loop - cTAL: cortical Thick Ascending Limb of Henle's loop - DCT: Distal Convoluted Tubule - CNT: Connecting tubule - CCD: cortical Collecting Duct - OMCD: Outer Medullary Collecting Duct.
(PDF)

Table S4 Sequence of all primers used in this study.
(XLS)

Acknowledgments

The authors wish to thank S. Bergaya, C. Büsst and A. Edwards for their critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EVP AD XJ JH. Performed the experiments: EVP LC JF. Analyzed the data: EVP LC TM AD JH. Contributed reagents/materials/analysis tools: LC AD. Wrote the paper: EVP JH.

References

1. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, et al. (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. Science 293: 1107–1112.
2. Kahle KT, Ring AM, Lifton RP (2008) Molecular physiology of the WNK kinases. Annu Rev Physiol 70: 329–355.
3. McCormick JA, Ellison DH (2011) The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. Physiol Rev 91: 177–219.
4. Bergaya S, Faure S, Baudrie V, Rio M, Escoubet B, et al. (2011) WNK1 Regulates Vasoconstriction and Blood Pressure Response to {alpha}1-Adrenergic Stimulation in Mice. Hypertension.
5. Xie J, Wu T, Xu K, Huang IK, Cleaver O, et al. (2009) Endothelial-Specific Expression of WNK1 Kinase Is Essential for Angiogenesis and Heart Development in Mice. Am J Pathol.
6. Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, Richter LJ, Piggott J, et al. (2003) Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 14109–14114.
7. Boutros M, Kiger AA, Armknecht S, Kerr K, Hild M, et al. (2004) Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in Drosophila cells. Science 303: 832–835.
8. Sun X, Gao L, Yu RK, Zeng G (2006) Down-regulation of WNK1 protein kinase in neural progenitor cells suppresses cell proliferation and migration. J Neurochem 99: 1114–1121.
9. Xu BE, Stippec S, Lenertz L, Lee BH, Zhang W, et al. (2004) WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. J Biol Chem 279: 7826–7831.
10. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, et al. (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature 446: 153–158.
11. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, et al. (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science 314: 268–274.
12. Stephens P, Edkins S, Davies H, Greenman C, Cox C, et al. (2005) A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. Nat Genet 37: 590–592.
13. Shekarabi M, Girard N, Riviere JB, Dion P, Houle M, et al. (2008) Mutations in the nervous system–specific HSN2 exon of WNK1 cause hereditary sensory neuropathy type II. J Clin Invest 118: 2496–2505.
14. Delaloy C, Lu J, Houot AM, Disse-Nicodeme S, Gasc JM, et al. (2003) Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. Mol Cell Biol 23: 9208–9221.
15. O'Reilly M, Marshall E, Speirs HJ, Brown RW (2003) WNK1, a gene within a novel blood pressure control pathway, tissue-specifically generates radically different isoforms with and without a kinase domain. J Am Soc Nephrol 14: 2447–2456.
16. Verissimo F, Jordan P (2001) WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. Oncogene 20: 5562–5569.
17. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402–408.
18. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, et al. (2000) WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. J Biol Chem 275: 16795–16801.
19. Friedman PA, Gesek FA (1995) Stimulation of calcium transport by amiloride in mouse distal convoluted tubule cells. Kidney Int 48: 1427–1434.
20. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, et al. (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. Biotechnol Lett 28: 1601–1613.
21. Min X, Lee BH, Cobb MH, Goldsmith EJ (2004) Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. Structure 12: 1303–1311.
22. Delaloy C, Hadchouel J, Imbert-Teboul M, Clemessy M, Houot AM, et al. (2006) Cardiovascular expression of the mouse WNK1 gene during development and adulthood revealed by a BAC reporter assay. Am J Pathol 169: 105–118.
23. Choate KA, Kahle KT, Wilson FH, Nelson-Williams C, Lifton RP (2003) WNK1, a kinase mutated in inherited hypertension with hyperkalemia, localizes to diverse Cl- -transporting epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 663–668.
24. Glover M, Zuber AM, O'Shaughnessy KM (2009) Renal and brain isoforms of WNK3 have opposite effects on NCCT expression. J Am Soc Nephrol 20: 1314–1322.
25. Cruz-Rangel S, Melo Z, Vazquez N, Meade P, Bobadilla NA, et al. (2011) Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters. Am J Physiol Cell Physiol 301: C601–608.
26. Nissant A, Lourdel S, Baillet S, Paulais M, Marvao P, et al. (2004) Heterogeneous distribution of chloride channels along the distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch clamp. Am J Physiol Renal Physiol 287: F1233–1243.
27. Morla L, Crambert G, Mordasini D, Favre G, Doucet A, et al. (2008) Proteinase-activated receptor 2 stimulates Na,K-ATPase and sodium reabsorption in native kidney epithelium. J Biol Chem 283: 28020–28028.
28. Cheval L, Pierrat F, Dossat C, Genete M, Imbert-Teboul M, et al. (2011) Atlas of gene expression in the mouse kidney: new features of glomerular parietal cells. Physiol Genomics 43: 161–173.
29. Picard N, Eladari D, El Moghrabi S, Planes C, Bourgeois S, et al. (2008) Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice. J Biol Chem 283: 4602–4611.

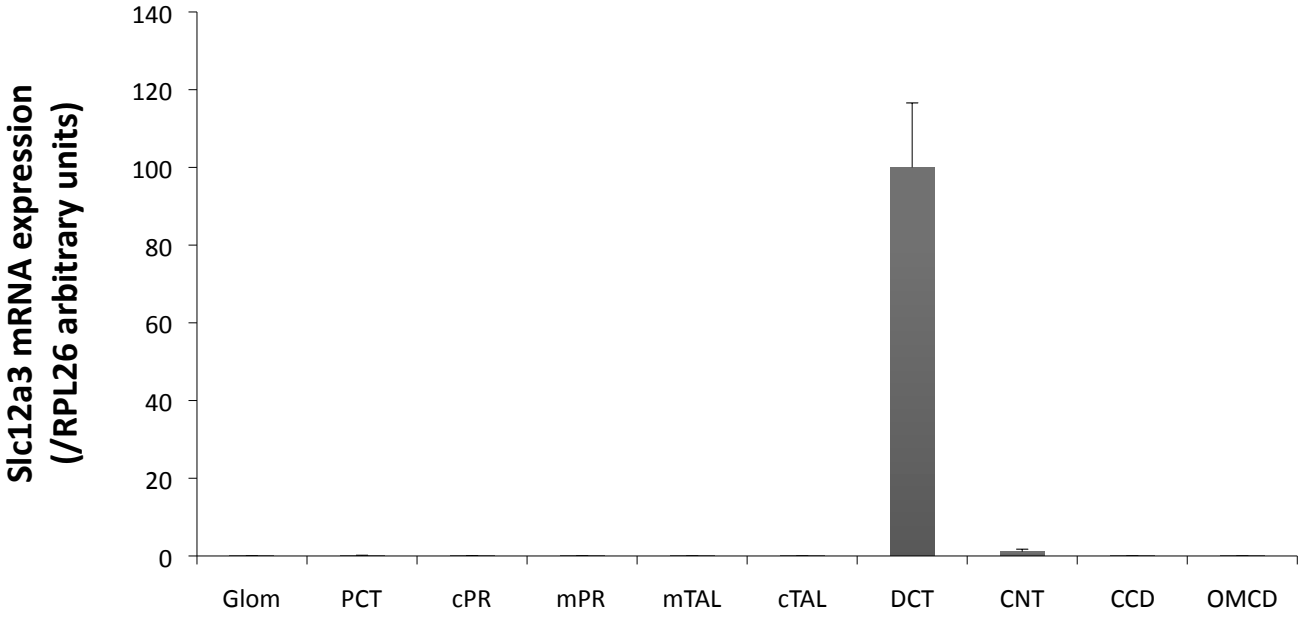
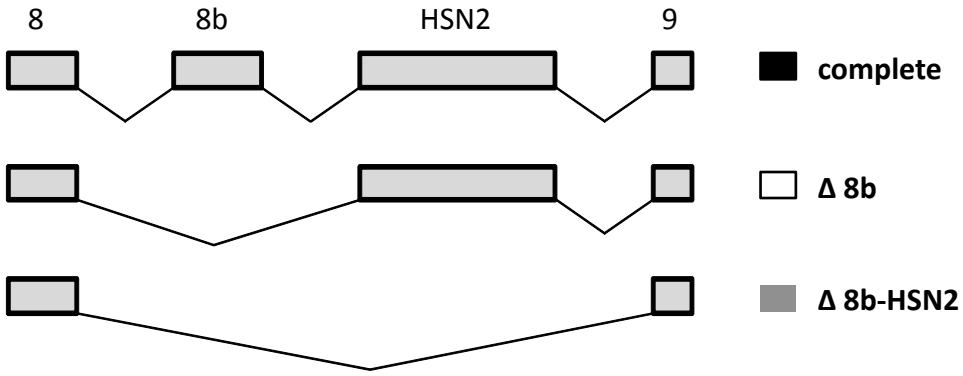
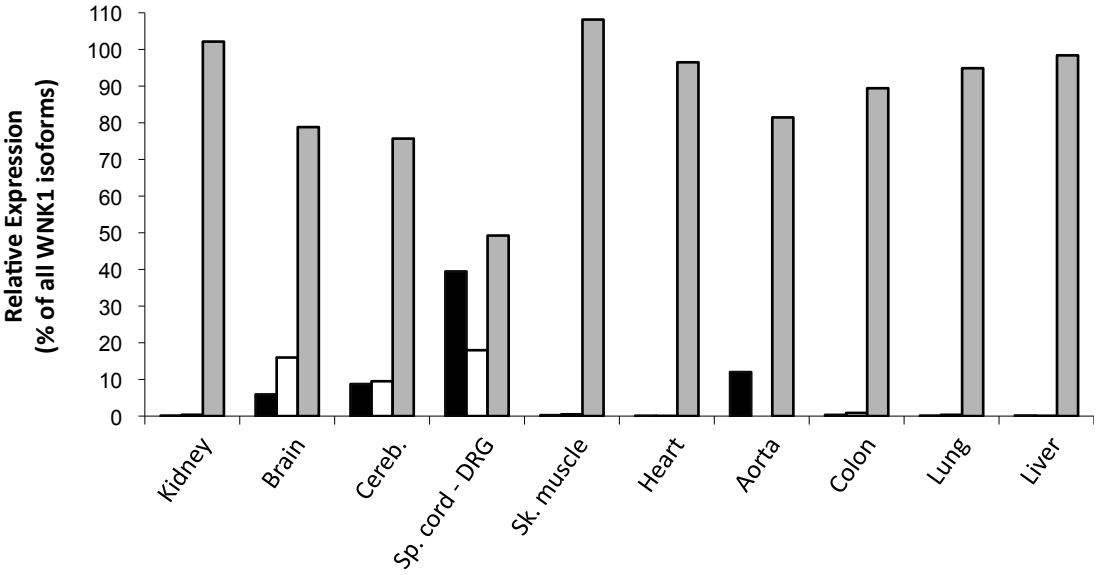

Slc12a3 mRNA expression
(/RPL26 arbitrary units)
140
120
100
80
60
40
20
0
Glom
PCT
cPR
mPR
mTAL
cTAL
DCT
CNT
CCD
OMCD

Figure S1

A.



B.



C.

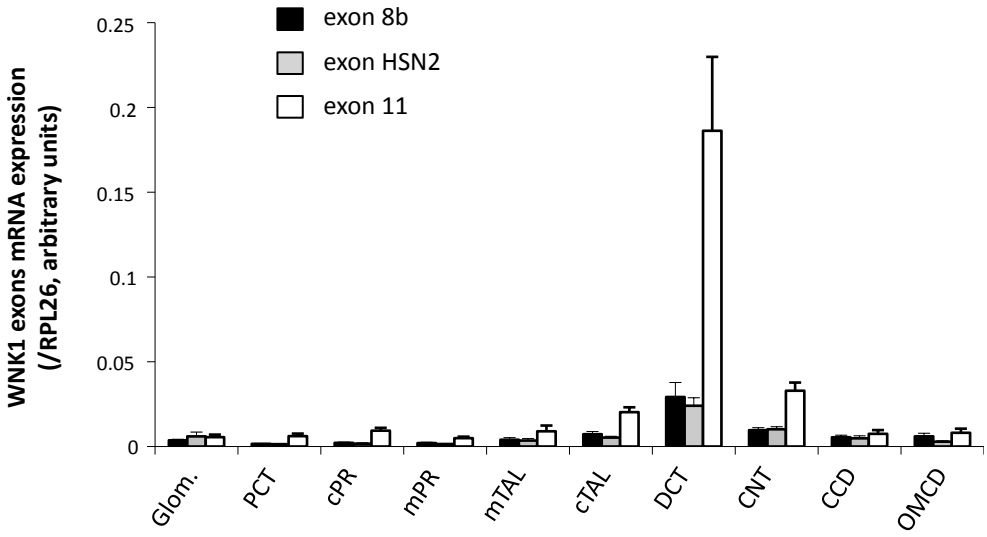


Figure S2

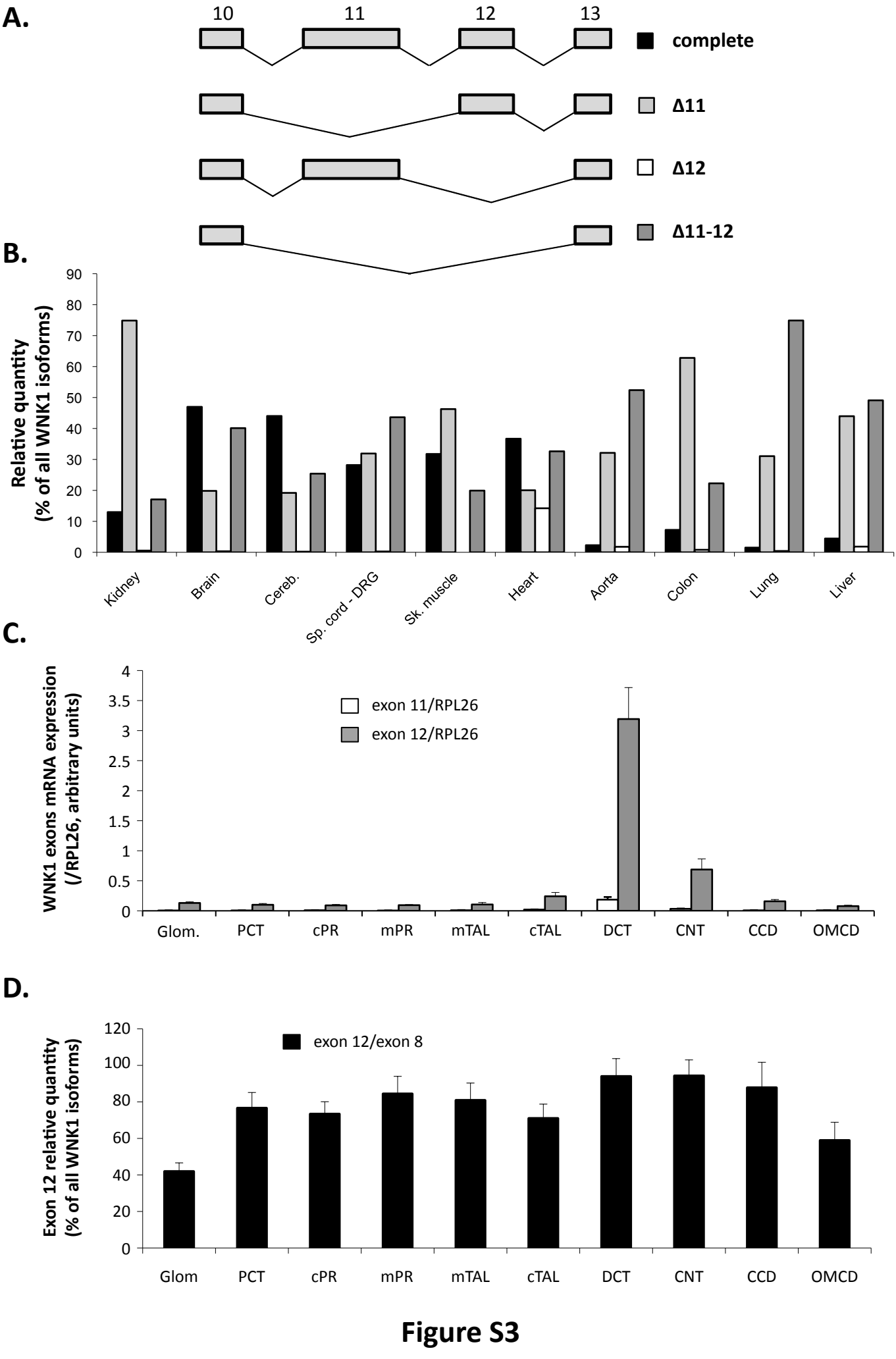

A.
10
11
12
13
complete
Δ11
Δ12
Δ11-12
B.
Relative quantity
(% of all WNK1 isoforms)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Kidney
Brain
Cereb.
Sp. cord - DRG
Sk. muscle
Heart
Aorta
Colon
Lung
Liver
C.
WNK1 exons mRNA expression
(/RPL26, arbitrary units)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
exon 11/RPL26
exon 12/RPL26
Glom.
PCT
cPR
mPR
mTAL
cTAL
DCT
CNT
CCD
OMCD
D.
Exon 12 relative quantity
(% of all WNK1 isoforms)
120
100
80
60
40
20
0
exon 12/exon 8
Glom
PCT
cPR
mPR
mTAL
cTAL
DCT
CNT
CCD
OMCD

Figure S3

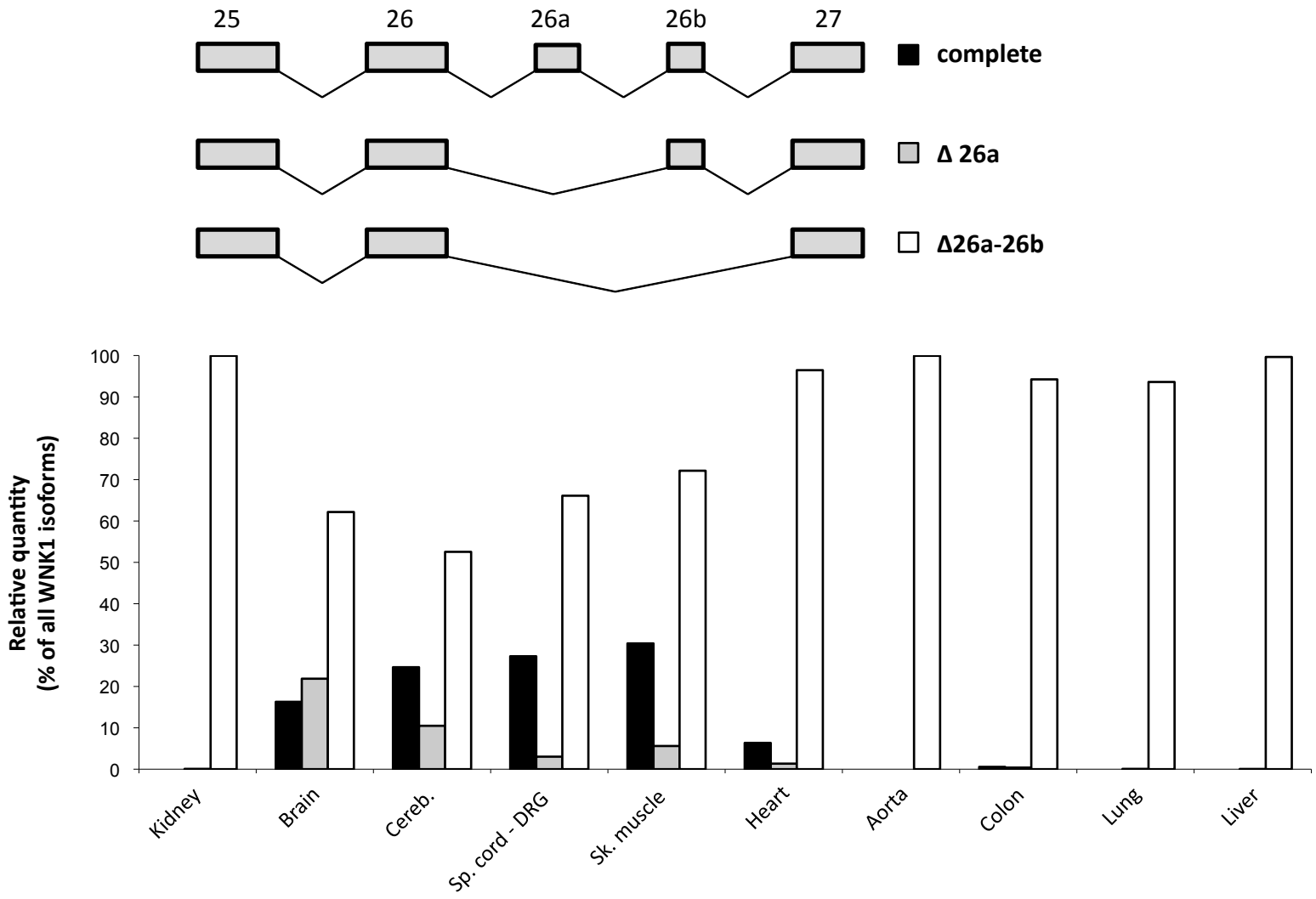

25
26
26a
26b
27
complete
Δ 26a
Δ26a-26b
Relative quantity
(% of all WNK1 isoforms)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Kidney
Brain
Cereb.
Sp. cord - DRG
Sk. muscle
Heart
Aorta
Colon
Lung
Liver

Figure S4

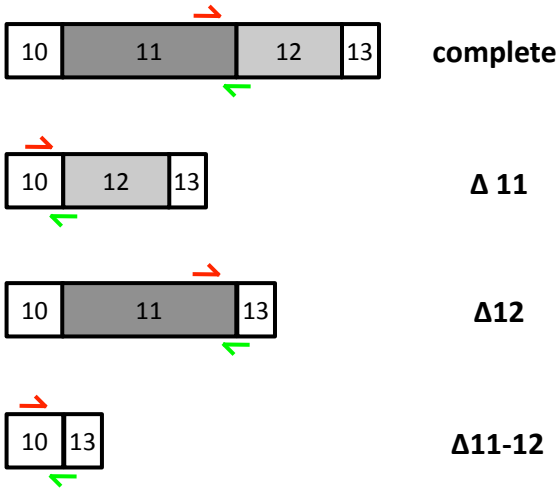


Figure S5

	Isoform	Primers	Tissue										
			Kidney	Brain	Cereb.	Sp cord	DRG	Sk. m.	Heart	Aorta	Colon	Lung	Liver
Region 8-10	**complete**	HSN2-9	8.7	11.9	8.2	3.4	56.8	0.8	0.4	8.2	2.5	3.0	1.0
	ΔHSN2	8-9	35.8	43.5	34.5	34.0	19.2	44.6	71.6	39.3	55.9	38.2	49.5
	ΔHSN2-9	8-10	63.7	52.5	47.8	46.8	28.4	49.4	38.2	54.5	40.5	55.4	52.3
	sum		***108.2***	***107.8***	***90.5***	***84.3***	***104.4***	***94.9***	***110.2***	***102.0***	***98.9***	***96.7***	***102.8***
Region 10-13	**complete**	11-12	16.2	19.8	25.8	4.4	7.0	53.3	73.3	12.4	12.9	5.7	7.2
	Δ11	10-12	66.9	20.1	35.9	20.4	49.1	8.8	3.8	9.6	19.7	20.8	25.8
	Δ12	11-13	6.1	7.3	9.8	1.7	2.3	17.9	29.9	6.4	5.6	2.2	3.0
	Δ11-12	10-13	24.1	41.7	29.4	64.7	57.6	40.5	17.8	69.2	35.6	55.2	53.1
	sum		***113.3***	***88.9***	***101.0***	***91.1***	***115.9***	***120.5***	***124.8***	***97.6***	***73.8***	***84.0***	***89.1***
Region 25-27	**complete**	26a-26b	0.0	13.5	33.1	7.1	43.3	18.7	1.7	0.1	0.6	0.0	0.0
	Δ26a	26-26b	0.2	8.0	5.6	2.8	0.2	0.9	0.2	0.4	0.1	0.1	0.1
	Δ26a-26b	26-27	93.1	81.7	47.4	70.5	48.5	84.6	84.2	99.9	81.4	95.9	98.4
	Δ26-26a-26b	25-27	10.0	7.3	8.9	4.7	8.9	4.5	5.1	5.0	5.5	6.1	4.3
	sum		***103.3***	***110.5***	***94.9***	***85.2***	***100.9***	***108.7***	***91.1***	***105.4***	***87.5***	***102.0***	***102.8***

Table S1. Relative quantities of WNK1 isoforms in a panel of human tissues.

	Isoforms	Primers	Tissue									
			Kidney	**Brain**	**Cereb**	**Sp.cord***	**Sk. m.**	**Heart**	**Aorta**	**Colon**	**Lung**	**Liver**
Region 8-9	complete	8-8b	0.1	5.9	8.7	39.5	0.3	0.1	12.0	0.3	0.1	0.2
	Δ8b	8-HSN2	0.4	16.0	9.5	18.0	0.5	0.1	0.0	0.9	0.4	0.1
	Δ8b-HSN2	8-9	102.1	78.8	75.7	49.2	108.2	96.5	81.5	89.4	94.9	98.4
	sum		***102.7***	***100.7***	***93.9***	***106.7***	***108.9***	***96.7***	***93.5***	***90.6***	***95.4***	***98.6***
Region 10-13	complete	11-12	13.0	47.0	44.0	28.2	31.8	36.7	2.3	7.2	1.5	4.5
	Δ11	10-12	74.9	19.8	19.2	31.9	46.3	20.0	32.1	62.8	31.1	44.0
	Δ12	11-13	0.6	0.3	0.2	0.3	0.0	14.2	1.8	0.8	0.4	1.8
	Δ11-12	10-13	17.1	40.1	25.4	43.6	19.9	32.6	52.4	22.3	74.9	49.1
	sum		***105.5***	***107.3***	***88.8***	***104.0***	***98.0***	***103.6***	***88.6***	***93.1***	***107.9***	***99.4***
Region 26-27	complete	26a-26b	0.0	16.3	24.7	27.3	30.4	6.4	0.0	0.6	0.0	0.0
	Δ26a	26-26b	0.1	21.9	10.5	3.0	5.6	1.3	0.0	0.4	0.1	0.1
	Δ26a-26b	26-27	99.9	62.2	52.5	66.1	72.2	96.5	99.9	94.2	93.6	99.6
	sum		***100.0***	***100.3***	***87.7***	***96.4***	***108.2***	***104.2***	***99.9***	***95.2***	***93.7***	***99.7***

Table S2. Relative quantities of WNK1 isoforms in a panel of mouse tissues. * Spinal cord samples also contain the Dorsal Root Ganglia.

Isoform	Primers	Nephron segment									
		glom	PCT	cPR	mPR	mTAL	cTAL	DCT	CNT	CCD	OMCD
$[L\text{-}WNK1]_Q$	ex 2-3	*77.22*	*62.59*	*78.49*	*78.09*	*49.62*	*28.15*	*0.98*	*10.30*	*54.87*	*72.77*
α						1.26					
[L-WNK1]		97.29	78.87	98.90	98.39	62.52	35.47	1.24	12.98	69.14	91.70
$[KS\text{-}WNK1]_Q$	ex 4a-5	*0.60*	*4.66*	*2.25*	*1.18*	*16.22*	*26.75*	*41.15*	*33.53*	*15.00*	*3.70*
β						2.4					
[KS-WNK1]		1.43	11.19	5.41	2.83	38.93	64.19	98.77	80.48	36.00	8.88
[L-WNK1] + [KS-WNK1]		**98.72**	**90.06**	**104.30**	**101.22**	**101.45**	**99.66**	**100.01**	**93.45**	**105.13**	**100.57**

Table S3. Relative quantities of L-WNK1 and KS-WNK1 in microdissected mouse nephron segments. $[L\text{-}WNK1]_Q$ and $[KS\text{-}WNK1]_Q$ are the values of the ratio of each transcript over exon 8, given by the $2^{-\Delta CT}$ formula. [L-WNK1] and [KS-WNK1] are the "true" expression ratio. α and β are the calculated correction factors. The ratios given here, being expressed over exon 8, represent the proportion of L-or KS-WNK1 amongst all WNK1 transcripts. Glom: Glomerulus - PCT: Proximal Convoluted Tubule - cPR: cortical Pars Recta - mPR: medullary Pars Recta - mTAL: medullary Thick Ascending Limb of Henle's loop - cTAL: cortical Thick Ascending Limb of Henle's loop - DCT: Distal Convoluted Tubule - CNT: Connecting tubule - CCD: cortical Collecting Duct - OMCD : Outer Medullary Collecting Duct

III. Conclusion et nouveaux résultats

1. Conclusion

Notre étude a permis de montrer que *WNK1*, classiquement décrit comme un gène à 28 exons, est un gène à 32 exons, puisqu'ont été identifiés 2 nouveaux exons, 26a et 26b, auxquels il faut ajouter 8b et HSN2, tous soumis à épissage alternatif. De plus, l'exon 4a, découvert quelques années après la première identification de la kinase, n'est pas inclus dans les 28 exons; la kinase comporte donc au total 33 exons. Parmi les 28 exons classiquement décrits, 4 sont soumis à épissage alternatif : 9, 11, 12 et 26. Au total, *WNK1* comporte donc 8 exons soumis à épissage alternatif et un exon généré par un promoteur alternatif. Certains exons sont exprimés de manière tissu-spécifique, comme 4a dans le rein et 26a et 26b dans le système nerveux, d'autres sont exprimés de manière ubiquitaire avec une distribution tissulaire inégale et partiellement conservée entre espèces, comme l'exon 11 qui est fortement exprimé dans le cœur et HSN2 qui est fortement exprimé dans le système nerveux, et d'autres exprimés de manière ubiquitaire également, sans tissu d'expression préférentielle, comme les exons 9 et 26 (Figure 13). Enfin, malgré des résultats le plus souvent similaires entre l'homme et la souris, l'épissage des exons 9 et 26 ne concerne que l'homme tandis que l'expression de l'exon 8b n'est détectée de manière significative que chez la souris.

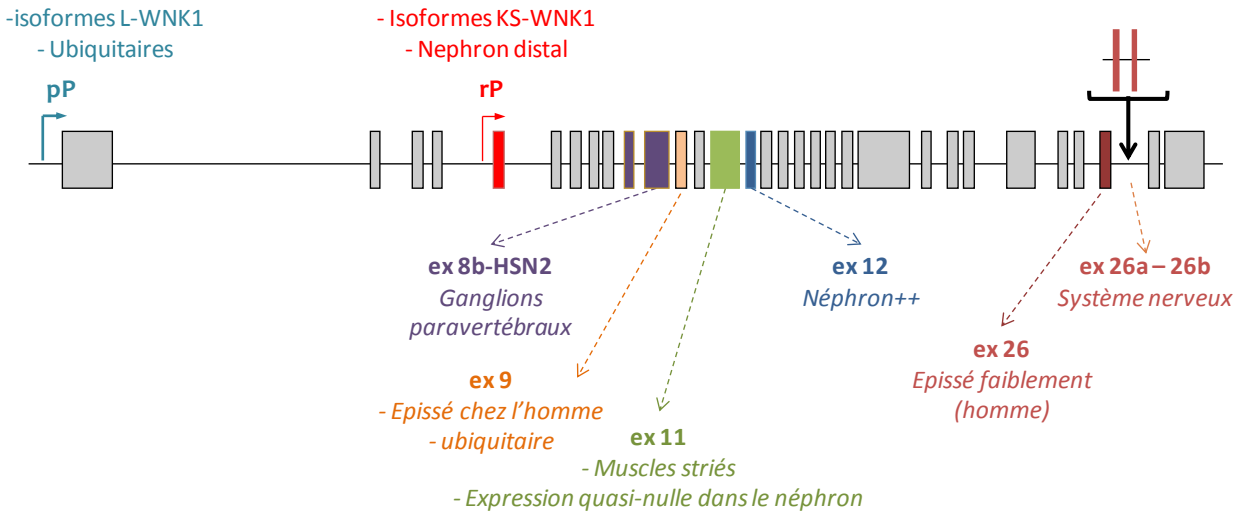


Figure 13 : Schéma récapitulatif des isoformes de WNK1. Deux promoteurs alternatifs contrôlent l'expression de L- et KS-WNK1. Il existe 8 exons soumis à épissage alternatif: 8b-HSN2-9-11-12-26-26a-26b

2. Perspectives et résultats récents

Ces nouvelles données doivent être prises en compte dans l'analyse des rôles rénaux et extra-rénaux de WNK1. Ainsi, nous avons souhaité reconsidérer les résultats obtenus sur la fonction de WNK1 dans le rein à la lumière de ces nouvelles données. Il avait en effet été rapporté jusqu'à présent que WNK1 ne régule pas directement l'activité de NCC [73]. Cependant ces travaux ont été réalisés avec l'isoforme initialement clonée par l'équipe de Mélanie Cobb, qui se trouve être l'isoforme « Δ11-12 » alors que l'isoforme majoritairement exprimée dans le rein est l'isoforme « Δ11 ».

La caractérisation de l'activité des différentes isoformes mises en évidence dans le rein a été menée en collaboration avec l'équipe de Gerardo Gamba (Université de Mexico, Mexico, Mexique). Nous avons sous-cloné les différentes isoformes L-WNK1 humaines exprimées dans le rein à savoir Δ9, Δ9-11, Δ11-12 et Δ 9-11-12 ainsi que l'isoforme complète, contenant les 28 exons "classiques" de WNK1. Le test fonctionnel que nous avons choisi est

celui de la régulation du transport de Na^+ par NCC dans l'œuf de Xénope. Comme le montrent les résultats préliminaires présentés dans la figure 14, les isoformes dont l'exon 11 est épissé (majoritaires dans le rein) activent très fortement NCC. De manière également inattendue, l'isoforme complète de WNK1 active également, dans une moindre mesure, le co-transporteur. Cette expérience est la première à mettre en évidence *in vitro* une activation de NCC par L-WNK1. La reproduction des expériences en testant également le clone utilisé par les autres équipes devrait nous éclairer sur les discordances entre nos résultats et ceux publiés jusqu'à présent. Ces résultats demandent à être reproduits et confirmés mais ils illustrent la nécessité de lire les résultats concernant les fonctions de WNK1 en tenant compte de ses variants d'épissage.

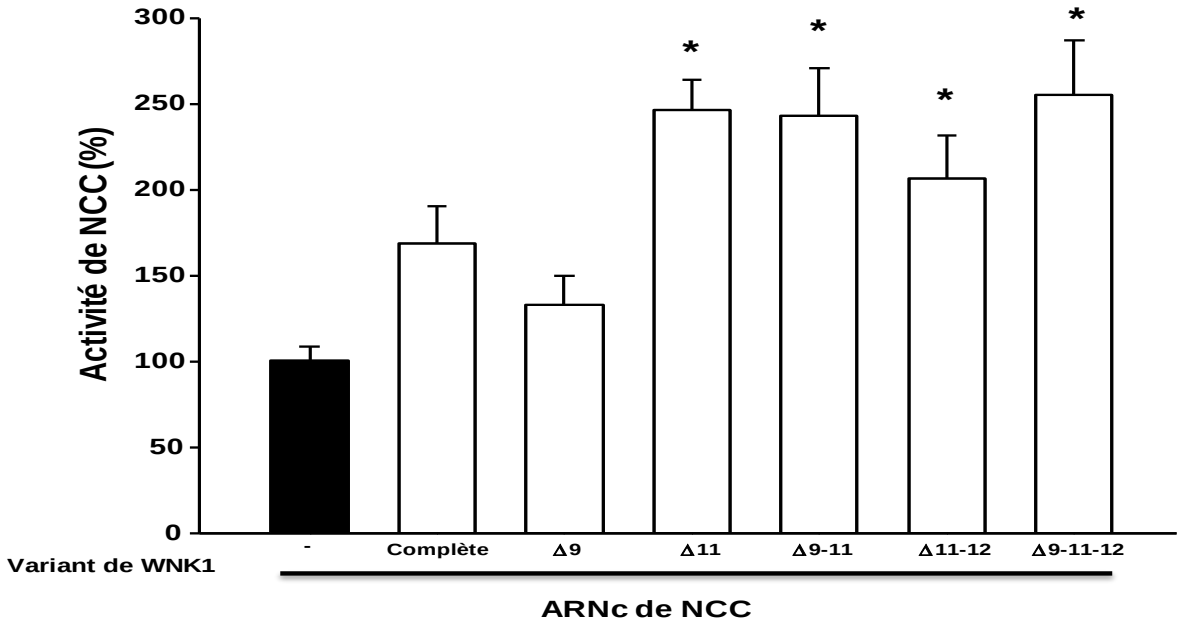


Figure 14 : Effets des différents variants d'épissage rénaux de WNK1 sur l'activité de NCC. La barre noire représente l'activité basale de NCC, exprimé dans l'œuf de Xénope. Les barres blanches représentent la variation par rapport à l'activité basale qu'entraîne la co-injection d'ARNc des variants d'épissage humains de WNK1. On voit que la co-injection avec les isoformes de WNK1 dépourvues d'exon 11 entraîne une nette activation de NCC.

Deuxième partie : Génération et caractérisation d'un modèle murin d'Hypertension Hyperkaliémique Familiale par délétion du premier intron de *WNK1*

I. Introduction

3. Génération du modèle murin

Les mutations présentées par les patients HHF au locus *WNK1* ne concernent pas la portion codante du gène. Il s'agit de grandes délétions de 41 et 22 kbp [11] au sein du premier intron de 60kb. Ces délétions entraînent une augmentation de l'expression de WNK1 au niveau des leucocytes [11]. Depuis ces premiers résultats obtenus par une collaboration entre les équipes du Pr Jeunemaitre à Paris et du Pr Lifton à Yale, le laboratoire s'est intéressé aux conséquences de la délétion du premier intron de *WNK1*. Ainsi, un premier modèle de souris transgéniques permettant la caractérisation du profil et du niveau d'expression des différentes isoformes de *WNK1* avant et après délétion de l'intron 1 a été généré [155]. Le transgène comprenait des sites loxP de part et d'autre du premier intron et les gènes rapporteurs *luciférase* et *nLacZ* dans l'exon 2 et l'exon 4a respectivement. Le laboratoire a ainsi montré que:

(1) la délétion de la totalité du premier intron de *WNK1* murin (d'une taille de 30 kbp) a probablement les mêmes conséquences que les délétions partielles observées chez les patients HHF, puisqu'on observe une surexpression de *WNK1* dans les leucocytes des souris comparable à celle observée chez les patients;

(2) la surexpression de *WNK1* dans les leucocytes est en fait due à l'expression ectopique de *KS-WNK1*; cette expression ectopique est généralisée et est observée notamment dans les sites d'expression majeurs de *L-WNK1*, à savoir le système cardiovasculaire et le cervelet;

(3) cette délétion entraîne dans le rein une surexpression limitée au DCT de *L-WNK1* et *KS-WNK1*.

Cependant, ce modèle présentait les limitations inhérentes à l'expression d'un transgène, à savoir qu'il n'est pas dans le même environnement chromatinien que le gène endogène. De plus, le lien entre ces délétions, la modification d'expression des isoformes de WNK1 et le développement d'une hypertension et des troubles métaboliques restait à comprendre. En effet, ces souris transgéniques n'étaient pas un modèle d'HHF puisque le locus *WNK1* endogène n'était pas modifié et que le transgène ne permettait que l'expression des gènes rapporteurs et non la surexpression de L-WNK1 et KS-WNK1. Nous avons donc généré un modèle murin d'HHF liée à *WNK1* pour répondre à un double objectif : 1/ analyser les conséquences moléculaires de cette délétion et 2/ élucider le mécanisme physiopathologique conduisant à l'apparition d'une hypertension hyperkaliémique.

Les travaux préliminaires du laboratoire ayant montré que la délétion de l'ensemble de l'intron 1 murin a le même effet sur l'expression des différentes isoformes de *WNK1* que la délétion observée chez les patients HHF, nous avons émis l'hypothèse que la délétion de l'intron 1 de *WNK1* chez la souris pourrait conduire à un phénotype similaire à celui des patients HHF. Cette délétion a été effectuée par recombinaison homologue dans le génome des cellules ES et génération des souris transgéniques correspondantes. Nous avons choisi d'effectuer cette délétion de façon tissu-spécifique, grâce à l'insertion de sites loxP, cibles de la recombinase Cre, de part et d'autre de l'intron 1 (Figure 1 de l'article). Il est ainsi possible de déléter l'intron 1 soit dans tous les tissus, comme c'est le cas chez les patients, soit spécifiquement dans le rein ou l'arbre vasculaire, afin de définir le rôle de chacun de ces organes dans le développement du syndrome.

Les souris chimères issues de l'injection des cellules ES porteuses de l'allèle modifié de *WNK1* dans des blastocystes ont été obtenues en Décembre 2008. La génération des souris porteuses de la délétion intronique a ensuite nécessité deux croisements successifs (figure 15):

(1) un croisement avec des souris *hACTB-FLPe* exprimant la recombinase FLPe dans l'ovocyte [206] afin d'exciser les cassettes de sélection *pgk-neo*^{r} et *pgk-puro*^{r};

(2) un croisement avec des souris *pgk-Crem* exprimant la recombinase Cre dans les cellules germinales [207] afin de déléter l'intron 1 de *WNK1* de façon constitutive et ubiquitaire.

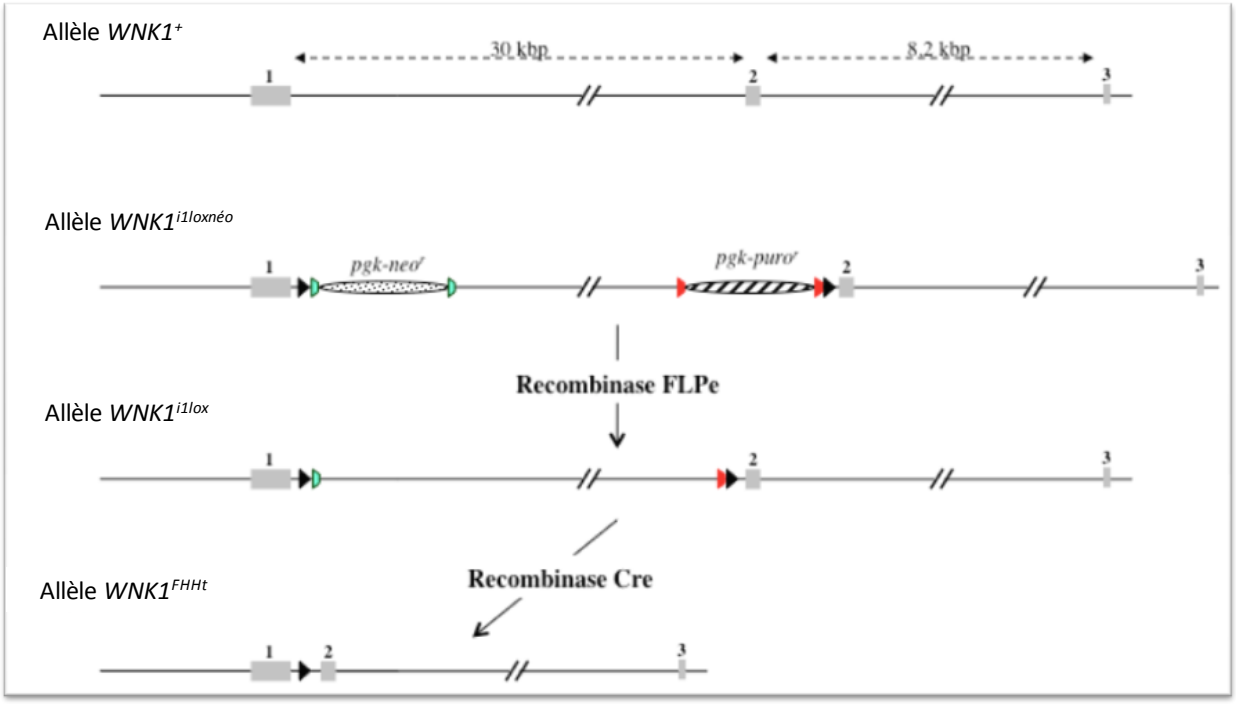


Figure 15: Stratégie de production des différents allèles *WNK1*. L'allèle *WNK1* sauvage (*WNK1*$^+$) est schématisé en haut de la figure: les exons sont représentés par des rectangles gris. L'allèle *Intron1*^{neo}, produit par recombinaison homologue, contient deux sites *loxP* (triangle noir), de part et d'autre de l'intron 1, la cassette *pgk-puro*^{r}, flanquée de sites *FRT* mutés (triangle vert) au début de l'intron 1 et la cassette *pgk-neo*^{r}, flanquée de sites *FRT* (triangle rouge) à la fin de l'intron 1. Suite à l'action de la recombinase FLPe, les cassettes de sélection sont délétées, donnant naissance à l'allèle *WNK1*^{i1lox}. Par

croisement des souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ avec des souris exprimant la recombinase Cre, l'intron 1 est délété de manière ubiquitaire : souris *WNK1*$^{+/FHHt}$; porteuses de l'allèle *WNK1*^{FHHt} et d'un allèle sauvage.

4. Analyse phénotypique des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$

Les souris ainsi obtenues ont un phénotype similaire à celui des patients HHF. Leur pression artérielle, mesurée par télémétrie, est supérieure à celle des souris contrôles d'environ 11 mmHg (Figure 1 de l'article). Elles présentent de plus une hyperkaliémie (6,0 ± 0,3 vs 4,6 ± 0,2 mM, p=0,0005) et une acidose métabolique hyperchlorémique, puisqu'elles ont un chlore plasmatique plus élevé (116,3 ± 0,3 vs 112,1 ± 0,3 mM, p<10-6), un taux de bicarbonates plus bas (18,4 ± 1,1 vs 23,5 ± 0,8 mM, p=0,001) et un pH inférieur (7,21 ± 0,03 vs 7,31 ± 0,02 , p=0,01) par rapport aux souris contrôles *WNK1*$^{+/i1lox}$ (Tableau 1 de l'article). Les patients répondant particulièrement bien à un traitement par les diurétiques thiazidiques, Nous avons administré trois jours de traitement oral par hydrochlorothiazide (2,4mg/10g/j), qui a corrigé aussi bien les anomalies métaboliques que le phénotype tensionnel (Tableau 1 et Figure 1 de l'article).

Nous avons cherché à comprendre les mécanismes à l'origine de ce phénotype. Sur le plan moléculaire tout d'abord, nous avons analysé par RT-QPCR les modifications d'expression des deux isoformes de WNK1 chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ en comparaison aux souris contrôles *WNK1*$^{+/i1lox}$ dans les segments tubulaires rénaux ainsi que dans divers organes. Nous avons ainsi pu montrer que la délétion de l'intron 1 de *WNK1* entraîne une surexpression de L-WNK1 d'un facteur 2 dans le DCT et d'environ 20% dans le CNT, sans entraîner de modification d'expression de KS-WNK1 (Figure 6 de l'article). L'expression de L- et KS-WNK1 n'est pas modifiée de manière significative dans le colon, le cœur, l'os et l'aorte. On peut cependant souligner une tendance à la diminution d'expression de L-WNK1

dans l'aorte (non montré) et une tendance à l'augmentation des deux isoformes dans le colon (Figure 6 de l'article).

Le phénotype observé est donc dû à l'augmentation d'expression de L-WNK1 dans le DCT et le CNT. Les troubles étant corrigés par les diurétiques thiazidiques, qui bloquent le co-transporteur NCC, nous avons quantifié son niveau d'expression et de phosphorylation. L'expression de NCC est augmentée d'un facteur 2 et sa phosphorylation d'un facteur 5 chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ (voir figure 2 de l'article). Cette augmentation est associée à une activation du co-transporteur, puisque la réponse natriurétique et chlorurétique à une injection intra-péritonéale d'hydrochlorothiazide (12,5mg/kg) est plus importante chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ que chez les souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ (Figure 2 de l'article).

En résumé, la délétion du premier intron de *WNK1* entraîne une hypertension hyperkaliémique. Ce phénotype résulte d'une augmentation d'expression de L-WNK1 dans le DCT et le CNT, avec une augmentation d'expression et d'activité du co-transporteur NCC.

II. Deuxième article

"WNK1-related FHHt results from NCC activation through an increased expression of L-WNK1 in the DCT, with no modification of KS-WNK1."

(non soumis)

WNK1-related Familial Hyperkalemic Hypertension results from activation of the Na^+-Cl^- cotransporter NCC through an increased expression of L-WNK1 in the distal nephron.

Emmanuelle Vidal-Petiot[1,2], Emilie Elvira-Matelot[1,2], Christelle Soukaseum[1,2], Lydie Cheval[2,3,4,5], Shengnan Wu[1,2], Cara Büsst[1,2], Véronique Baudrie[1,2], Elizabeth Huc[1,2], Michelle Cambillau[6], Alain Doucet[2,3,4,5], Xavier Jeunemaitre[1,2,7], Juliette Hadchouel[1,2]

1 - INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France
2 - University Paris-Descartes, Paris, France
3 - Cordeliers Research Center– Inserm UMRS 872- Paris, France
4 - CNRS, ERL 7226, Laboratoire de génomique, physiologie et physiopathologie rénales, Paris, France
5 - University Pierre et Marie Curie, Paris, France
6 - Department of Biochemistry, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France
7 – Department of Genetics, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Running title: Pathogenesis of *WNK1*-related Hyperkalemic Hypertension

Keywords: Hypertension, WNK1, NCC.

ABSTRACT

Mutations in the serine-threonine kinase *WNK1* are responsible for Familial Hyperkalemic Hypertension (FHHt), a rare form of hypertension associated with hyperkaliemia and hyperchloremic metabolic acidosis. *WNK1* gives rise to a ubiquitous isoform, L-WNK1, and a kinase-deficient isoform expressed exclusively in the nephron, KS-WNK1. FHHt mutations are large deletions of *WNK1* first intron. To elucidate the mechanisms underlying FHHt pathogenesis, and thereby the role of WNK1 on ion homeostasis and blood pressure, we generated *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice harboring a deletion of *WNK1* first intron. These mice display increased blood pressure, hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis. This phenotype results from an increased activity of the sodium-chloride cotransporter NCC in the distal convoluted tubule (DCT), as it is reversed completely by administration of hydrochlorothiazide. The molecular consequence of the intronic deletion is an increased expression of L-WNK1 in the DCT and to a lesser extent in the connecting tubule, with no modification of KS-WNK1 expression. Our study demonstrates that the pathogenesis of *WNK1*-related FHHt results from an activation of NCC induced by the overexpression of L-WNK1 in the DCT.

INTRODUCTION

Familial Hyperkalemic Hypertension (FHHt) is a rare disorder featuring hypertension, hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis (OMIM 145260) [1,2]. Eleven years ago, mutations in the *WNK1* and *WNK4* genes were shown to cause FHHt [3], opening a field of extensive research on these two serine-threonine kinases of the WNK (With No lysine (K)) family (for review, see [4]). Despite multiples studies on how the kinases regulated blood pressure and ion homeostasis [5] many questions still remain concerning their physiological roles and the mechanism of FHHt, mainly WNK1-related FHHt.

FHHt mutations in the *WNK4* gene are missense mutations of highly conserved amino-acids. The regulation of distal nephron function by wild-type (wt-) or FHHt-WNK4 has been extensively studied *in vitro* [4] and *in vivo* through the characterization of several mouse models [6,7,8,9]. Whereas is it still debated whether wt-WNK4 is an inhibitor or an activator of NCC, it clearly appears that WNK4 FHHt-mutants activate NCC, through the SPAK/OSR1 pathway [10].

The *WNK1* gene generates two isoforms through alternative promoters. A long isoform, L-WNK1 (Long-WNK1), is expressed ubiquitously while a shorter isoform lacking a functional kinase

domain is expressed specifically in the kidney, hence its name KS-WNK1, for Kidney-Specific WNK1 [11]. In the kidney, both isoforms coexist. L-WNK1 is expressed at a low level in all nephron segments whereas KS-WNK1 is expressed only in the thick ascending limb of the loop of Henle and the distal nephron, mainly in the distal convoluted tubule (DCT) but also in the connecting tubule (CNT) [12]. *In vitro* experiments suggest that L-WNK1 positively regulates NCC, by antagonizing WNK4 inhibition of the transporter [13,14,15] and/or through phosphorylation of SPAK, which in turn phosphorylates and activates NCC [16,17,18]. There is no *in vivo* study on the renal function of L-WNK1. Both *in vitro* [19] and *in vivo* [20,21] data demonstrate that KS-WNK1 regulates NCC negatively. The two mutations identified at the *WNK1* locus do not modify the coding sequence, but are large (22 and 41 kb) deletions of the 60 kb-long first intron [3]. These deletions are thought to modify the expression of one or both isoforms encoded by the *WNK1* gene. In human, the deletion results in an overexpression of WNK1in the leucocytes [3]. We generated a transgenic mouse model that exhibited an ectopic expression of KS-WNK1 and an increased expression of L-WNK1 in the DCT upon deletion of the first intron [22]. However, the transgene we used did not allow studying the functional consequences of the deletion of *WNK1* first intron as a reporter gene was inserted under the control of each *WNK1* promoter. We therefore generated a mouse model harboring a heterozygous deletion of the endogenous first intron of *WNK1*, so as to reproduce the human genetic situation. These mice exhibit hyperkalemia, hypertension and metabolic acidosis, which appear to result from NCC activation similarly to what was observed in WNK4-FHHt mouse models. This phenotype results from a two-fold increase in L-WNK1 expression in the DCT, and a slight increased expression of L-WNK1 in the CNT, with no modification of KS-WNK1 expression.

METHODS

Physiological studies

All studies were conducted on 3 to 5 month-old male mice and were performed in accordance with the relevant guidelines of the French Ministry of Agriculture (Authorization Executive Order A751532) for scientific experimentation on animals, European Communities Council Directive, and international ethical standards.

For basal urine collection, animals were housed in metabolic cages and fed a standard diet (0.24%Na; 0.81%K; RM3-P Special Diet Services, England) with free access to tap water. After a 3-day adaptation period, urines were collected daily for 3 consecutive days.

For the high-salt study, after the same adaptation period, urines were collected after 24 hours, then twice every twelve hours. The diet was then changed for a high salt (3% Na) diet, and urines sample were collected every 12 h for the first 48 h and then over a 24 h-period on days 3, 14, 15. Between day 4 and 11, mice were kept in the usual housing facility.

At the end of the experimental period, blood was taken at the tail in anesthetized animals (ketamine and xylazine, 0.1 and 0.01 mg/g body weight, respectively). Urine and plasma creatinine and urine electrolytes were determined using an AU400 analyzer (Olympus). Urine aldosterone was measured by RIA (Siemens Healthcare). Blood gas and electrolytes were analyzed on a ABL80 (Radiometer).

For drug injection studies, a 3 day-adaptation period was followed by a 3-day experimental period, with injection of the vehicle on day 1 and of the drug of interest on day 2 and 3. Urine was collected 2 (furosemide), 4 (HCTZ), 6 (amiloride), 12 and 24 h after each injection. All drugs were injected intra-peritoneally (furosemide: 10 µg/g, amiloride: 1.45µg/g, thiazide: 12.5 µg/g, all in normal saline).

For the chronic thiazide treatment during telemetric measurement and for blood analysis, Hydrochlorothiazide (HCTZ, Sigma) was administered orally by mixing 2.4 mg HCTZ per 10g of body weight with 4 g of grounded food, 1 mL water and 0.08 g agar per day.

Telemetry

The catheter of the telemeter was inserted into the left carotid artery. The transmitter probe was positioned subcutaneously on the flank. After a one-week recovery period in individual cages, mice were placed on a receiver and blood pressure (BP) and locomotor activity were recorded continuously in freely moving mice, in a light/dark-cycled recording room (7am to 7pm).

For each mouse, BP values were recorded for 3 consecutive days on a normal diet. The mice then received a high salt diet (3% Na^+) for 2 weeks, during which BP was recorded for the first 5 days and last 3 days. BP was finally recorded during 3 days, after adding thiazide treatment to the high salt diet.

RNA extraction and quantitative PCR

Heart, kidney and colon RNA from 7 mice in each group was extracted using the nucleospin RNAII Macherey-Nagel kit according to the manufacturer's instructions.

Atfer treatment with deoxyribonuclease (DnaseI, Ambion), 500 ng of total RNA was reverse transcribed (Superscript Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA) with random hexamer primers (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Real-time PCR was carried out on a using intercalation of SYBRgreen (Eurogentec, Seraing, Belgium) on a Chromo4 continuous fluorescence detector (MJ Research, Bio-Rad laboratories,

Waltham, MA). Primers sequences are indicated in supplementary data. No DNA was detectable in samples that did not undergo reverse transcription. A standard curve was generated using serial dilutions of cDNA of the tissue of interest and showed a PCR efficiency of 2 ± 0.05 for each experiment performed. *Ubiquitin c* was used a reference gene and comparative quantification of the gene of interest between the two genotypes was obtained using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Quantitative RT-PCR from microdissected tubules

Renal cortex segments from 6 *WNK1*$^{+/FHHt}$ and 6 *WNK1*$^{+/i1lox}$ males were microdissected from liberase-treated kidneys as previously reported [23]. The different tubule segments were characterized and dissected under a binocular microscope as previously described [24]. After dissection, pools of tubules of identical structures from a single mouse were thoroughly rinsed and RNAs were extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen) and then stored at -80°C. Reverse transcription was performed simultaneously for all samples using the first-strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics) and Real-time PCR was performed on a LightCycler (Roche Diagnostics) with the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1 kit (Roche diagnostics) as previoulsy described [24].

Immunoblots analysis

Renal cortex samples were homogenized in a cold extraction buffer containing 0.25M sucrose, 20mM tris-Hepes pH 7.4, proteases and phosphatases inhibitors (Complete and PhosSTOP tablets; Roche Diagnostics). The homogenates were then subjected to a first centrifugation (2000xg for 10 min) to obtain post-nuclear fractions. The supernatant was centrifuged at 17000xg for 20 min: the resulting pellet corresponds to the plasma membranes-enriched fraction. The supernatant was then submitted to subsequent centrifugation at 200000xg for 1h: the resulting pellet corresponds to the intracellular vesicles-enriched fraction. These fractions were then submitted to SDS/PAGE electrophoresis and immunoblotting was performed as described [25]. The following antibodies were used: NCC (gift from D. Ellison), ENaC (α, β and γ subunits; gift from J. Loffing), NCC phospho-Thr55, SPAK, SPAK phospho-Ser373, SPAK phosphor-Thr233 [26]. The last 4 were obtained from the Division of Signal Transduction Therapy (the University of Dundee).

Statistical analysis

Values are given as mean ± s.e.m. Comparison between genotypes was performed using an unpaired Student t-test or a non-parametric Mann-Whitney test, as appropriate.

RESULTS

Generation of WNK1$^{+/FHHt}$ mice

We used homologous recombinations in Embryonic Stem (ES) cells to create a mutant allele of *WNK1* (*WNK1*$^{+/i1loxneo}$) in which two loxP sites were inserted at each extremity of the first intron of the gene. Details on the generation of the targeting vector, ES cell clones and corresponding mice are given in Supporting Material and Methods (supplementary figure S1). Chimeric males, obtained by injection of one ES cell clone, were crossed with C57Bl/6N females to produce *WNK1*$^{+/i1loxneo}$ animals, which were then bred with *hACTBFLPe* mice [27] to remove the antibiotic resistance cassettes, inserted with the loxP sites. The resulting mice, *WNK1*$^{+/i1lox}$, were then crossed with *pgk-Crem* transgenic mice, thereby generating the *WNK1*$^{+/FHHt}$ animals by deletion of *WNK1* first intron,

WNK1$^{+/FHHt}$ mice display Hyperkalemic Hypertension

As compared to *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice, *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice displayed higher serum K^+ (6.0 ± 0.3 *vs* 4.6 ± 0.2 mM, p=0.0005), higher serum Cl^- (116.3 ± 0.3 *vs* 112.1 ± 0.3 mM, $p<10^{-6}$), lower serum HCO_3^- (18.4 ± 1.1 *vs* 23.5 ± 0.8 mM, p=0.001), and lower venous pH (7.21 ± 0.03 *vs* 7.31 ± 0.02, p=0.01) (Table 1). Hence they displayed hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis. In addition, serum Na^+ was slightly higher (151.4 ± 0.5 *vs* 149.6 ± 0.5, p=0.01) and haematocrit was lower (43.2 ± 1.3 *vs* 47.6 ± 1.6, p=0.02) in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, in favour of hypervolemia. Glomerular filtration rate was normal (142.3 ± 12.6 *vs* 122.1 ± 12.6 µL/min, p=NS). There was no difference in serum Ca^{2+}, Mg^{2+} and PO_4^{3-} between the two groups (Table 1). Urine aldosterone was increased in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice (27 ± 1.9 *vs* 14.6 ± 2 pmol/24H, p= 0.0003). Renin mRNA expression, assessed by RT-qPCR in the renal cortex of 8 mice in each group, was significantly lower in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice (42 ± 4 *vs* 100 ± 19, p=0.01).

Despite the hyperkalemia and acidosis, *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice had similar K^+ and $NH4^+$ urinary excretion as *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice (Table 1), reflecting a renal defect in serum K^+ and blood pH homeostasis regulation. Urinary excretion of Na^+, Cl^-, Mg^{2+} and PO_4^{3-} was also similar in both groups.

As compared to *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice, *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice displayed hypercalciuria (0.98 ± 0.13 *vs* 0.37 ± 0.04 mmol/mmol creatinine, p=0.001), which was highly amplified under a high Na^+ (3%) diet (8.70 ± 0.92 *vs* 1.63 ± 0.19 mmol/mmol creatinine, $p<5.10^{-4}$).

The systolic and diastolic blood pressure of conscious and unrestrained 6 month-old males was recorded by radiotelemetry. As shown in Figure 1, both systolic and diastolic arterial pressure was significantly higher in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice than in *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice. A chronic salt load (3%Na for 15

days) did not modify blood pressure in control mice. In *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, blood pressure increased only transiently after the diet switch and then returned to the basal level after 4 days.
The biological and blood pressure abnormalities of *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice were entirely corrected by a 3-day oral administration of hydrochlorothiazide (HCTZ 2.4mg/10g/day) as shown in Table 1 and Figure 1. Hence heterozygous deletion of *WNK1* first intron in mice leads to the same phenotype as FHHt patients.

Deletion of WNK1 first intron leads to increased NCC expression and activity

Since the phenotype was entirely corrected by thiazide administration, we first focused on the expression and activity of the Na^+-Cl^- cotransporter NCC. NCC mRNA in isolated DCT was increased two to three-fold in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice with no ectopic expression of NCC outside the DCT (Figure 2). Likewise, in the membrane-enriched fraction of the renal cortex, immunoblots showed that NCC protein expression at the apical membrane was increased two to three-fold. NCC phosphorylation was highly increased, about 5-fold in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. In the sub-membrane fraction, NCC expression was not different between the two groups and its phosphorylated form was barely detectable (data not shown), confirming that the phosphorylation of NCC is important for its expression at the apical membrane. The increase in NCC phosphorylation and expression is associated with an increased activity of the co-transporter as the urine output and Na^+ and Cl^- excretion in response to HCTZ injection was greater in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice than in their control littermates in the first 4 hours after injection (Figure 2). This was followed by a greater Na^+ and Cl^- sparing in the next eight hours.
In order to elucidate the pathway leading to NCC activation, we performed immunoblots on cortical homogenates to evaluate the expression and phosphorylation of SPAK in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, as increased phoshorylation of this kinase is supposed to play a key role in the activation of NCC in WNK4-FHHt mouse models [10,28]. However, using two independent series of mice, we showed that SPAK expression and phosphorylation on Thr233 and Ser373, the two residues phosphorylated by WNK1 [17,18], were similar between *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice and their control littermates (Figure 3).

NCC loses its regulation by salt intake in WNK1$^{+/FHHt}$ mice

Whereas pNCC was downregulated by high salt intake in control mice, neither NCC nor pNCC was modified in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, showing that the regulation of NCC expression and phosphorylation by salt intake was lost in *WNK1*$^{+/FHHt}$ animals (supplemental figure S2).

Conserved ENaC expression and activity in* WNK1$^{+/FHHt}$ *mice

Real-time RT-qPCR quantification of Scnn1a, -1b and -1g transcripts, encoding respectively the α, β and γ subunits of ENaC, was performed on cDNAs obtained from the different cortical nephron segments. Whereas expression of Scnn1b and Scnn1g was significantly decreased in the DCT of *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, all three subunits were normally expressed or even slightly upregulated (Scnn1a) in the connecting tubule (supplementary figure S3). No modification was observed in the cortical collecting duct. Accordingly, in membrane-enriched preparation of renal cortex, the expression of the α, β and γ ENaC subunits was similar in both groups of mice (figure 4A). Functional experiments supported a conserved ENaC activity in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, as Na^+ and K^+ excretions were similarly modified in *WNK1*$^{+/FHHt}$ and *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice in response to amiloride injection (figure 4B). The mechanisms responsible for the downregulation of *Scnn1b* and *Scnn1g* transcription in the DCT remain to be elucidated but our data suggest that it does not affect overall ENaC activity in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice.

Decreased NKCC2 activity in WNK1*$^{+/FHHt}$ *mice

Whereas NKCC2 protein expression was not significantly different between *WNK1*$^{+/FHHt}$ and *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice (data not shown), the activity of the transporter was significantly lower in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice than in *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice (Figure 5). An acute injection of furosemide induced a larger diuretic, natriuretic, chloruretic and calciuretic response in *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice than in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. Noteworthy, blockade of NKCC2 increased greatly Ca^{2+} excretion in control mice but not in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, thus abolishing the difference in Ca^{2+} excretion between the two groups. This suggests that, as in the *WNK4*$^{+/D561A}$ mice, decreased NKCC2 activity secondary to increased NCC activity could explain the hypercalciuria.

Deletion of WNK1 first intron increased expression of L-WNK1 in the DCT

In order to clarify the link between the deletion of *WNK1* first intron and the FHHt phenotype, we characterized the consequences of the deletion on the expression of L- and KS-WNK1 in microdissected cortical nephron segments (Figure 6). L-WNK1 transcripts level was increased two-fold in the DCT (two-fold, $p<4.10^{-4}$) and by 20% in the CNT in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. KS-WNK1 expression was not modified in any segment. In the heart and colon, the expression of L- and KS-WNK1 were not significantly modified, although there was a tendency for an increased expression of both isoforms in the colon and of KS-WNK1 in the heart in the *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. The modification of KS-WNK1 expression had to be interpreted cautiously as it is expressed at very low levels in extra-renal tissues with RT-QPCR CT values above 30.

DISCUSSION

In order to better understand the mechanisms by which the mutations identified at the *WNK1* locus lead to the development of FHHt, we generated mice harbouring a heterozygous deletion of *WNK1* first intron. The mice display all the features of human FHHt, i.e. hypertension, hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis, which are corrected by thiazide diuretics. Similarly to *WNK4*-related FHHt mouse models [7,28], these mice exhibit increased expression and phosphorylation of NCC. We demonstrated that this phenotype results from a two-fold increase of L-WNK1 in the DCT and a 20 % increase of L-WNK1 in the CNT, with no modification in the expression of KS-WNK1. Combined with the fact that complete inactivation of KS-WNK1 does not lead to FHHt [20], this suggest that the net level of L-WNK1, rather than the ratio of L-WNK1 over KS-WNK1 is important for triggering WNK1-related FHHt.

We previously generated a mouse model bearing a transgene containing the mouse *WNK1* gene modified by a conditional deletion of the first intron and insertion of two reporter genes in exons 2 and 4a to monitor the expression of L-WNK1 and KS-WNK1, respectively [22]. This transgenic model had led us to conclude that the deletion of *WNK1* first intron leads to the overexpression of both isoforms in the distal nephron and ubiquitous extra-renal expression of KS-WNK1. The present study demonstrated somewhat different expression profiles of L- and KS-WNK1 upon *WNK1* first intron deletion. In our previous study, despite a BAC (Bacterial Artificial Chromosome) that included large regions upstream and downstream of the *WNK1* promoters, the luciferase reporter gene, supposed to mimic the expression of L-WNK1, was expressed 100 times less than the endogenous gene. This illustrates that the expression of a transgene, randomly inserted in the genome, often differs from that of the endogenous gene. If the present study confirms the unmodified expression outside the kidney and increased expression in the distal nephron for L-WNK1, it demonstrates that the renal and extra-renal increase in KS-WNK1 expression was likely due to inappropriate regulation of the transgene.

The pathway leading from increased L-WNK1 expression to increased NCC expression and phosphorylation remains unclear. *In vitro* data suggest two possible mechanisms: the first is that WNK1 prevents WNK4 inhibition of NCC [13,14,15]. The existence of this link between L-WNK1 and WNK4 has never been demonstrated *in vivo*. In addition, the inhibition of NCC membrane localization by WNK4 remains controversial, as the inactivation of WNK4 in mouse models leads to a decreased NCC expression and phosphorylation [8,29]. The second possible mechanism for L-WNK1 activation of NCC is through phosphorylation of the Ste-20 related kinases SPAK and

OSR1 [16,17,18], which appears to be the pathway mediating *WNK4*-related FHHt [10,28]. However, we did not find an increased phosphorylation of SPAK in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. It is possible that the phosphorylation of SPAK is increased in the DCT and decreased in the cortical thick ascending limb of Henle's loop, where it is also expressed [26], therefore immunoblots performed on whole cortex homogenates show an unchanged level of expression. However, a clear increase in SPAK phosphorylation was observed in a *WNK4*-related FHHt mouse model with the same type of whole cortex preparation. Given that WNK1 phosphorylates SPAK to a much greater extent than WNK4 *in vitro* [16], it is surprising that we did not find an increased phosphorylation of SPAK in our model if this pathway is implicated. Noteworthy, in another mouse model with increased NCC expression and phosphorylation as a consequence of KS-WNK1 inactivation, there was a decreased rather than increased phosphorylation of SPAK [20]. Further investigation is therefore necessary to establish the link between WNK1 and NCC phosphorylation *in vivo*.

We submitted control and mutant mice to a chronic dietary Na^+ load (3%Na for 15 days). This challenge did not modify blood pressure in control mice. In *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice, blood pressure increased only transiently after the diet switch and then returned to the basal level after 4 days. In human, it has actually to our knowledge never been tested whether these patients are salt-sensitive

We found elevated aldosterone levels in mutant mice. The expected level of aldosterone in FHHt is difficult to predict as the hormone is under the conflicting influences of hypertension and hypervolemia in the one hand and hyperkaliemia in the other hand. However, our result is in agreement with most human studies that report a rather elevated aldosterone level in patients with FHHt [2,30,31], supporting the stronger influence of the hyperkalemia than hypervolemia on aldosterone secretion. Whether these elevated aldosterone levels activate ENaC in the presence of reduces sodium delivery in this segment is uncertain. In fact, the hyperkalemia and metabolic acidosis suggest that ENaC is unable to generate a sufficient electrogenic Na^+ reabsorption to drive K^+ and H^+ secretion in the CNT and CCD.

Even though complete correction of the phenotype by thiazide diuretics suggests that NCC activation is sufficient to generate hyperkalemia, this is still a matter of debate as other mouse models with NCC activation do not display hyperkalemia [20,32]. As L-WNK1 inhibits ROMK *in vitro* [33], the increased expression of the kinase in the DCT and the CNT, where ROMK is also expressed, could participate in deregulating potassium homeostasis.

Lastly, the finding that modest variation of L-WNK1 expression in the DCT is responsible for such a strong phenotype suggests that *WNK1* polymorphisms that modify its transcription or the stability of the protein could play a role in essential hypertension. Accordingly, several authors demonstrated an association between *WNK1* variants and blood pressure level and plasma K^+ level in the general population [34,35,36,37,38].

In summary, generation and analysis of the first model of WNK1-related FHHt allowed us to characterize the molecular consequences of heterozygous deletion of WNK1 first intron and to show that a net increase of L-WNK1 is the distal tubule triggers the development of FHHt through an activation of NCC. The model will also be helpful to test future pharmacological agents interacting with the WNK1 pathway.

ACKNOWLEDGMENTS

COMPETING INTERESTS STATEMENT

REFERENCES

1. Gordon RD, Hodsman GP (1986) The syndrome of hypertension and hyperkalaemia without renal failure: long term correction by thiazide diuretic. Scott Med J 31: 43-44.
2. Schambelan M, Sebastian A, Rector FC, Jr. (1981) Mineralocorticoid-resistant renal hyperkalemia without salt wasting (type II pseudohypoaldosteronism): role of increased renal chloride reabsorption. Kidney Int 19: 716-727.
3. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, et al. (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. Science 293: 1107-1112.
4. McCormick JA, Ellison DH (2011) The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. Physiol Rev 91: 177-219.
5. Uchida S (2010) Pathophysiological roles of WNK kinases in the kidney. Pflugers Arch 460: 695-702.
6. Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, et al. (2008) Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. Kidney Int 74: 1403-1409.
7. Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, et al. (2006) Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. Nat Genet 38: 1124-1132.
8. Ohta A, Rai T, Yui N, Chiga M, Yang SS, et al. (2009) Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion, and lowers blood pressure. Hum Mol Genet.
9. Yang CL, Liu X, Paliege A, Zhu X, Bachmann S, et al. (2007) WNK1 and WNK4 modulate CFTR activity. Biochem Biophys Res Commun 353: 535-540.
10. Chiga M, Rafiqi FH, Alessi DR, Sohara E, Ohta A, et al. (2011) Phenotypes of pseudohypoaldosteronism type II caused by the WNK4 D561A missense mutation are dependent on the WNK-OSR1/SPAK kinase cascade. J Cell Sci 124: 1391-1395.
11. Delaloy C, Lu J, Houot AM, Disse-Nicodeme S, Gasc JM, et al. (2003) Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. Mol Cell Biol 23: 9208-9221.
12. Vidal-Petiot E, Cheval L, Faugeroux J, Malard T, Doucet A, et al. (2012) A New Methodology for Quantification of Alternatively Spliced Exons Reveals a Highly Tissue-Specific Expression Pattern of WNK1 Isoforms. PLoS One 7: e37751.
13. Golbang AP, Cope G, Hamad A, Murthy M, Liu CH, et al. (2006) Regulation of the expression of the Na/Cl cotransporter by WNK4 and WNK1: evidence that accelerated dynamin-dependent endocytosis is not involved. Am J Physiol Renal Physiol 291: F1369-1376.
14. Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH (2003) WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. J Clin Invest 111: 1039-1045.
15. Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, Ellison DH (2005) Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. J Clin Invest 115: 1379-1387.
16. Anselmo AN, Earnest S, Chen W, Juang YC, Kim SC, et al. (2006) WNK1 and OSR1 regulate the Na+, K+, 2Cl- cotransporter in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 10883-10888.

17. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, et al. (2005) WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. J Biol Chem 280: 42685-42693.
18. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR (2005) The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. Biochem J 391: 17-24.
19. Subramanya AR, Yang CL, Zhu X, Ellison DH (2006) Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. Am J Physiol Renal Physiol 290: F619-624.
20. Hadchouel J, Soukaseum C, Busst C, Zhou XO, Baudrie V, et al. (2010) Decreased ENaC expression compensates the increased NCC activity following inactivation of the kidney-specific isoform of WNK1 and prevents hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 18109-18114.
21. Liu Z, Xie J, Wu T, Truong T, Auchus RJ, et al. (2011) Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models. Hum Mol Genet 20: 855-866.
22. Delaloy C, Elvira-Matelot E, Clemessy M, Zhou XO, Imbert-Teboul M, et al. (2008) Deletion of WNK1 first intron results in misregulation of both isoforms in renal and extrarenal tissues. Hypertension 52: 1149-1154.
23. Morla L, Crambert G, Mordasini D, Favre G, Doucet A, et al. (2008) Proteinase-activated receptor 2 stimulates Na,K-ATPase and sodium reabsorption in native kidney epithelium. J Biol Chem 283: 28020-28028.
24. Cheval L, Pierrat F, Dossat C, Genete M, Imbert-Teboul M, et al. (2011) Atlas of gene expression in the mouse kidney: new features of glomerular parietal cells. Physiol Genomics 43: 161-173.
25. Picard N, Eladari D, El Moghrabi S, Planes C, Bourgeois S, et al. (2008) Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice. J Biol Chem 283: 4602-4611.
26. Rafiqi FH, Zuber AM, Glover M, Richardson C, Fleming S, et al. (2010) Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. EMBO Mol Med 2: 63-75.
27. Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, et al. (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nat Genet 25: 139-140.
28. Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, et al. (2007) Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. Cell Metab 5: 331-344.
29. Castaneda-Bueno M, Cervantes-Perez LG, Vazquez N, Uribe N, Kantesaria S, et al. (2012) Activation of the renal Na+:Cl- cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 7929-7934.
30. Arnold JE, Healy JK (1969) Hyperkalemia, hypertension and systemic acidosis without renal failure associated with a tubular defect in potassium excretion. Am J Med 47: 461-472.
31. Mayan H, Munter G, Shaharabany M, Mouallem M, Pauzner R, et al. (2004) Hypercalciuria in familial hyperkalemia and hypertension accompanies hyperkalemia and precedes hypertension: description of a large family with the Q565E WNK4 mutation. J Clin Endocrinol Metab 89: 4025-4030.
32. Paulais M, Bloch-Faure M, Picard N, Jacques T, Ramakrishnan SK, et al. (2011) Renal phenotype in mice lacking the Kir5.1 (Kcnj16) K+ channel subunit contrasts with that observed in SeSAME/EAST syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 10361-10366.
33. Lazrak A, Liu Z, Huang CL (2006) Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 1615-1620.
34. Han Y, Fan X, Sun K, Wang X, Wang Y, et al. (2011) Hypertension associated polymorphisms in WNK1/WNK4 are not associated with hydrochlorothiazide response. Clin Biochem.
35. Newhouse S, Farrall M, Wallace C, Hoti M, Burke B, et al. (2009) Polymorphisms in the WNK1 gene are associated with blood pressure variation and urinary potassium excretion. PLoS One 4: e5003.
36. Newhouse SJ, Wallace C, Dobson R, Mein C, Pembroke J, et al. (2005) Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension study. Hum Mol Genet 14: 1805-1814.
37. Osada Y, Miyauchi R, Goda T, Kasezawa N, Horiike H, et al. (2009) Variations in the WNK1 gene modulates the effect of dietary intake of sodium and potassium on blood pressure determination. J Hum Genet.
38. Tobin MD, Raleigh SM, Newhouse S, Braund P, Bodycote C, et al. (2005) Association of WNK1 gene polymorphisms and haplotypes with ambulatory blood pressure in the general population. Circulation 112: 3423-3429.

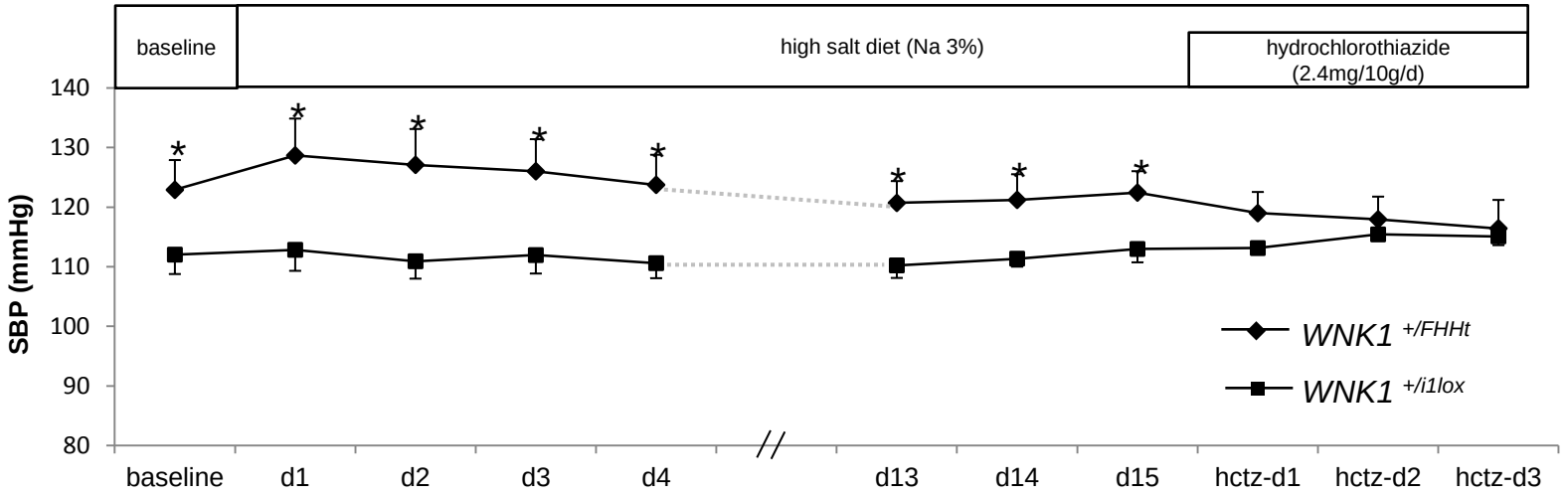
	Standard diet (0.24% Na)			HCTZ (2.4 mg/10g/d)			High Na diet (3% Na)		
	WNK1$^{+/i1lox}$ (n=8)	*WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=8)	p	*WNK1*$^{+/i1lox}$ (n=7)	*WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=6)	p	*WNK1*$^{+/i1lox}$ (n=8)	*WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=8)	p
Blood									
pH	7.31 0.02	7.21 0.03	0.01	7.37 0.02	7.37 0.01	0.6	7.32 0.02	7.28 0.01	0.03
HCO_3^- (mmol/L)	23.5 0.8	18.4 1.1	0.001	23.4 0.5	24.7 0.5	0.08	23.6 0.7	21.4 0.7	0.02
Cl^- (mmol/L)	112.1 0.3	116.3 0.3	<0.000001	109.7 0.9	109.2 0.6	0.6	113.4 1.1	116.0 0.7	0.03
K^+ (mmol/L)	4.55 0.15	6.00 0.27	0.0005	4.5 0.3	4.7 0.2	0.5	5.2 0.3	6.0 0.5	0.13*
Na^+ (mmol/L)	149.6 0.5	151.4 0.5	0.01	147 0.4	145.8 0.6	0.2	150 1	149.6 0.1	0.4
Ca^{2+} (mmol/L)	2.18 0.02	2.18 0.03	0.99	nd	nd		nd	nd	
Creatinine (µmol/L)	26.8 0.5	27.4 1.2	0.64	nd	nd		nd	nd	
Hematocrit	47.6 1.6	43.2 1.3	0.02	nd	nd		48.9 1.1	46.7 1.6	0.14
Mg^{2+} (mmol/L)	0.91 0.03	0.90 0.03	0.73	nd	nd		nd	nd	
PO_4^{3-} (mmol/L)	2.82 0.17	2.81 0.10	0.94	nd	nd		nd	nd	
PTH (pg/mL)	146 20	143 46	0.95	nd	nd		nd	nd	
Urine									
Na^+ (mmol/mmol creatinine)	35.9 3.1	35.4 2.2	0.89	**	**		718 41	729 60	0.89
K^+ (mmol/mmol creatinine)	114.1 8.2	114.2 9.9	0.99				112.8 6.1	114.2 7.4	0.89
Cl^- (mmol/mmol creatinine)	56.9 3.9	56.9 4.6	0.98				765 43	772 64	0.93
Ca^{2+} (mmol/mmol creatinine)	0.37 0.04	0.98 0.13	0.001				1.63 0.19	8.70 0.92	0.0003
Mg^{2+} (mmol/mmol creatinine)	6.63 1.10	7.86 0.73	0.38				11.1 0.6	11.7 0.7	0.49
PO_4^{3-} (mmol/mmol creatinine)	25.6 2.2	23.6 1.6	0.46				27.3 2.5	36.0 2.1	0.02
NH4+ (mmol/mmol creatinine)	7.98 1.17	6.68 0.54	0.35				nd	nd	
24h aldosterone (pmol)	14.6 2.0	27 1.9	0.0003				nd	nd	

Table 1 : Blood and urine biochemistries in *WNK1*$^{+/i1lox}$ and *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice

* Only performed on n= 3+3 mice for technical reasons (other samples were hemolyzed)

** urine was collected during acute HCTZ treatment and not chronic oral treatment, see figure x

nd : not determined; data are mean sem



	standard diet (Na 0.24%)		high salt diet (d1) (Na 3%)	
AP (mmHg)	*WNK1*$^{+/i1lox}$ (n=7)	*WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=6)	*WNK1*$^{+/i1lox}$ (n=7)	*WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=6)
night				
SBP	118.3 3.3	130 5.4*	117.4 3.7	135.8 7.4*$^{£}$
DBP	89.2 3.4	99.2 3.2*	88.7 3.6	103.6 5.1*$^{£}$
day				
SBP	105.8 3.2	115.9 4.6*	108.2 3.3	121.6 5*$^{£}$
DBP	78.1 3.3	87 3.4*	80.2 3.5	91.8 4.2*$^{£}$

Figure 1 : *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice display higher arterial pressure than their control littermates. Continuous telemetric recording of systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure in 6 *WNK1*$^{+/FHHt}$ and 7 *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice submitted to a standard diet (0.24% Na), followed by a 15-day high salt diet (3% Na) and a 3-day treatment with hydochlorothiazide (HCTZ 2.4mg/10g body weight/day, mixed in the food). The upper graph shows 24-hour average values of SBP throughout the experiment. The table shows detailed values of SBP and DBP at baseline (average of a 2-day recording period) and during the first day of high salt diet. Data are mean ± s.e.m; *p<0.05 vs *WNK1*$^{+/i1lox}$ - $^{£}$ p<0.05 vs normal salt.

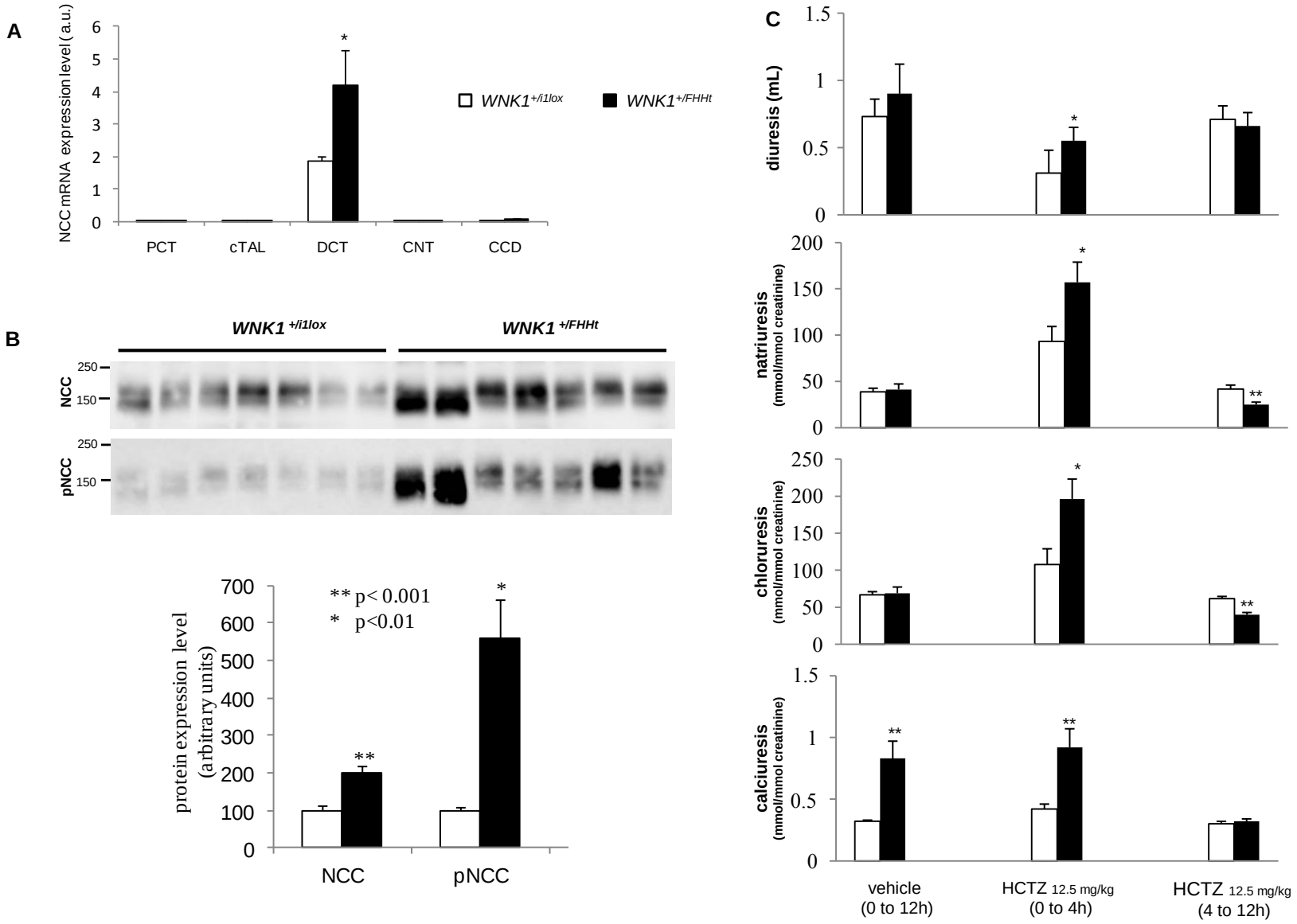


Figure 2: NCC expression, phosphorylation and activity are increased in *WNK1$^{+/fFHHt}$* mice. (A) NCC mRNA expression expressed as a ratio of ubiquitin C expression is arbitrary units, in microdissected cortical nephron segments of *WNK1$^{+/i1lox}$* mice (n=6) and *WNK1$^{+/FHHt}$* mice (n=6); PCT: Proximal Convoluted Tubule; cTAL: cortical Thick Ascending Limb of Henle's loop; DCT: Distal Convoluted Tubule; CNT: Connecting Tubule; CCD: Cortical Collecting Duct. (B) Immunoblots of NCC and pNCC in plasma membranes-enriched fractions of renal cortex and densitometric quantification in *WNK1$^{+/i1lox}$* mice (n=7) and *WNK1$^{+/FHHt}$* mice (n=7). (C) Urine output and urine excretion of Na^+, Cl^- and Ca^{2+} in response to injection of vehicle or hydrochlorothiazide (12.5 mg/kg body weight, i.p.) in *WNK1$^{+/i1lox}$* mice (n=8) and *WNK1$^{+/FHHt}$* mice (n=8). Urines were collected 4 and 12 h after injection; no urine was present 4 h after injection of vehicle. For all graphs, data are mean s.e.m. * p<0.05, **p<0.01 vs *WNK1$^{+/i1lox}$*.

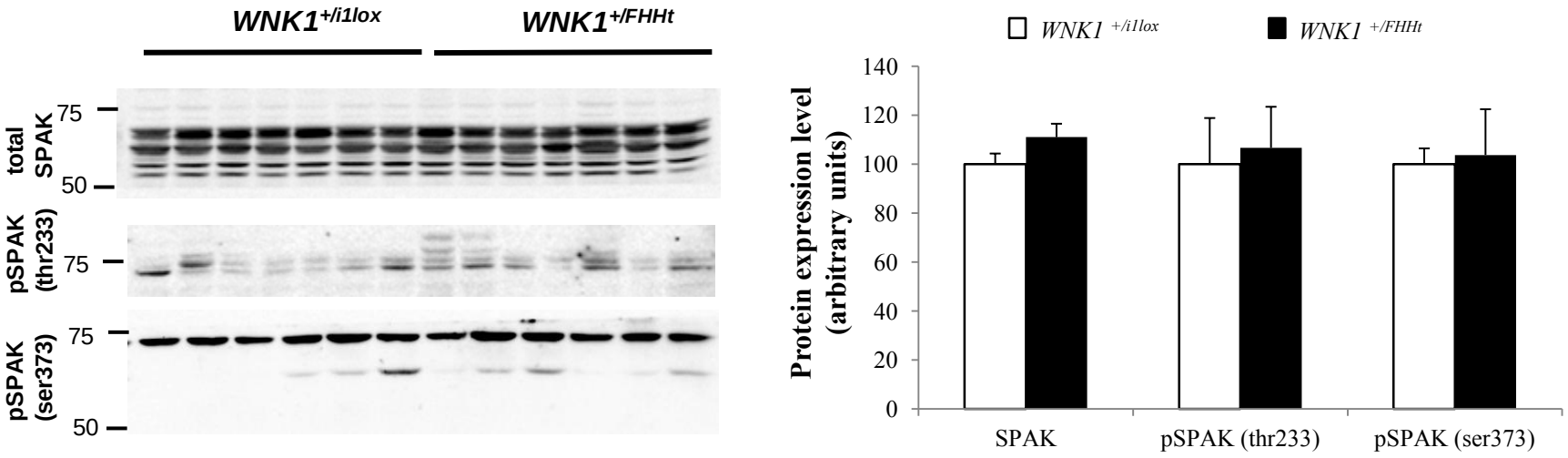


Figure 3: SPAK expression and phosphorylation are similar in *WNK1*$^{+/FHHt}$ and *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice. Immunoblots performed on total cortex protein extract with antobodies against total SPAK (n=7+7), pSPAK-thr233 (n= 7+7) and pSPAK-ser373 (n=6+6). Densitometry quantification showed no difference between the two groups with either antibody. Data are mean s.e.m.

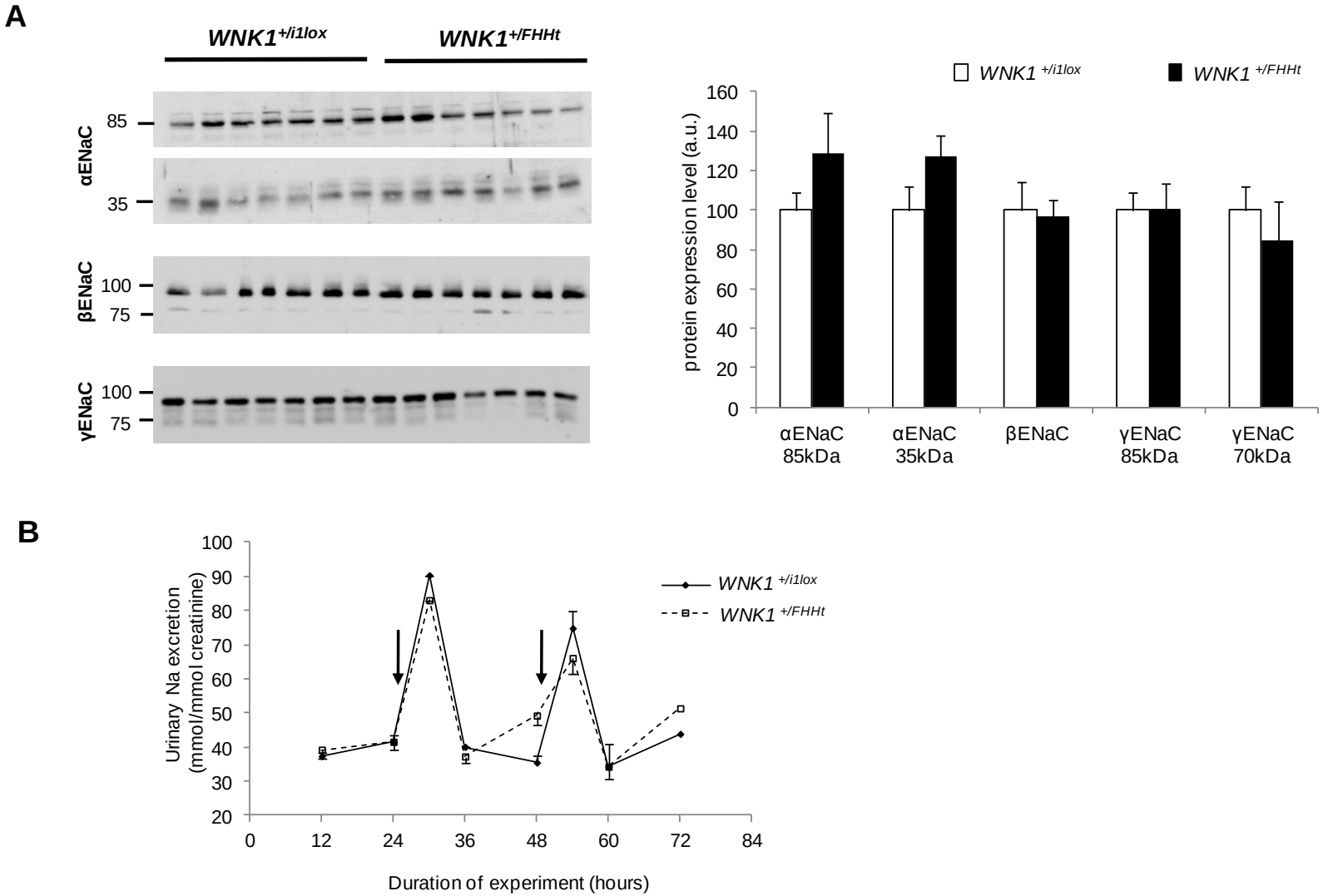


Figure 4: ENaC expression and function is conserved in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. Immunoblots performed on cortical plasma membrane-enriched protein extract with antibodies against total α-, β- and γENaC (n=7 per group) showing that all ENaC subunits are expressed at the same level in both groups. (B) Amiloride injection: urinary Na^+ excretion after injections of amiloride (arrow, 4,7 nmol/g) in 8 mice per group, placed in metabolic cages, showing that both groups of mice respond in the same manner after pharmacological blockade of ENaC. Data are mean s.e.m.

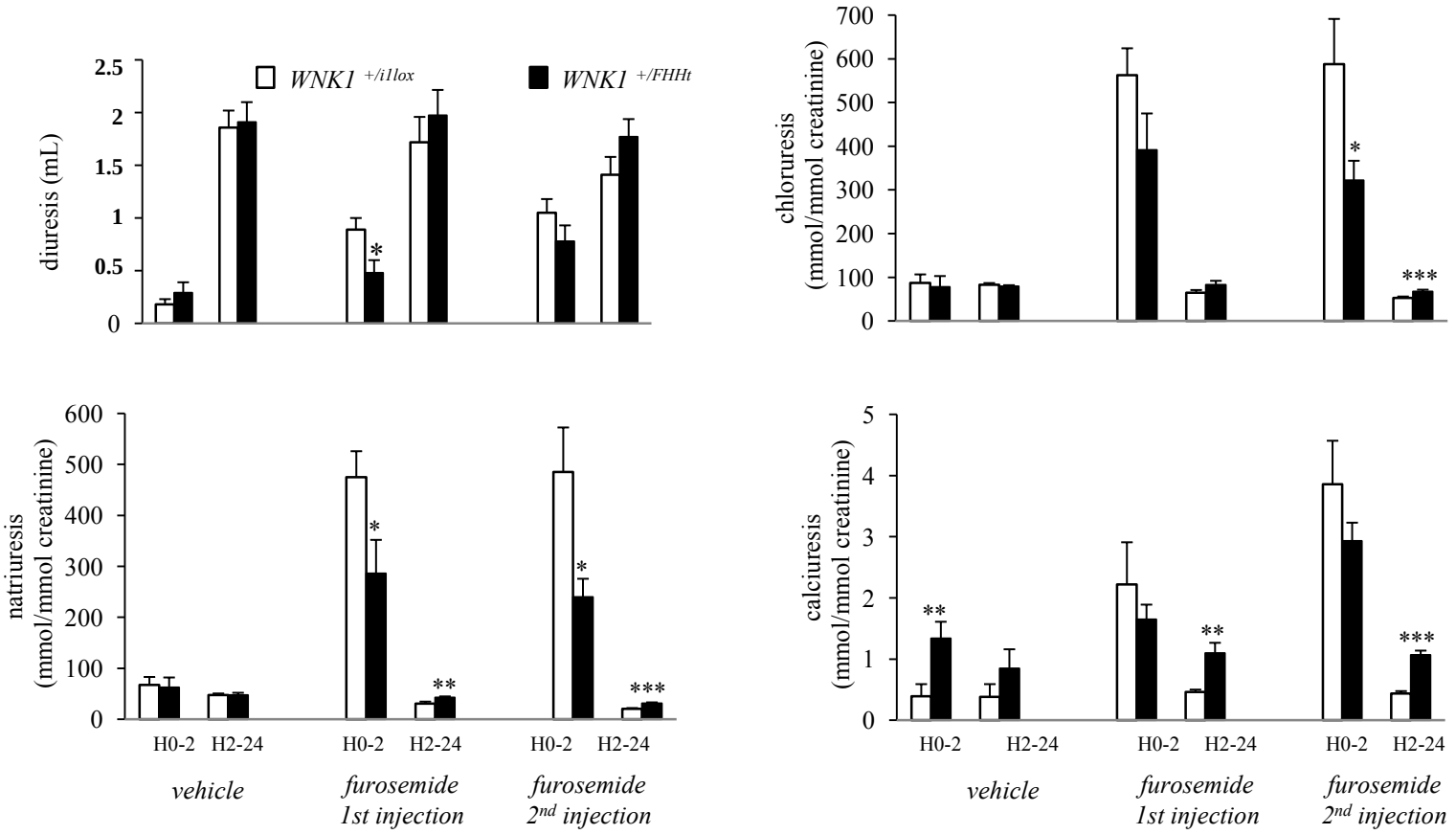


Figure 5: NKCC2 activity is decreased in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. Urine output and urine excretion of Na, Cl, Ca in response to injection of vehicle (day1) or furosemide (days 2 and 3; 100µg/10g body weight, i.p.) in *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice (n=6) and *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice (n=6). Urines were collected 2 and 24 h after injection. Data are mean s.e.m. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs *WNK1*$^{+/i1lox}$

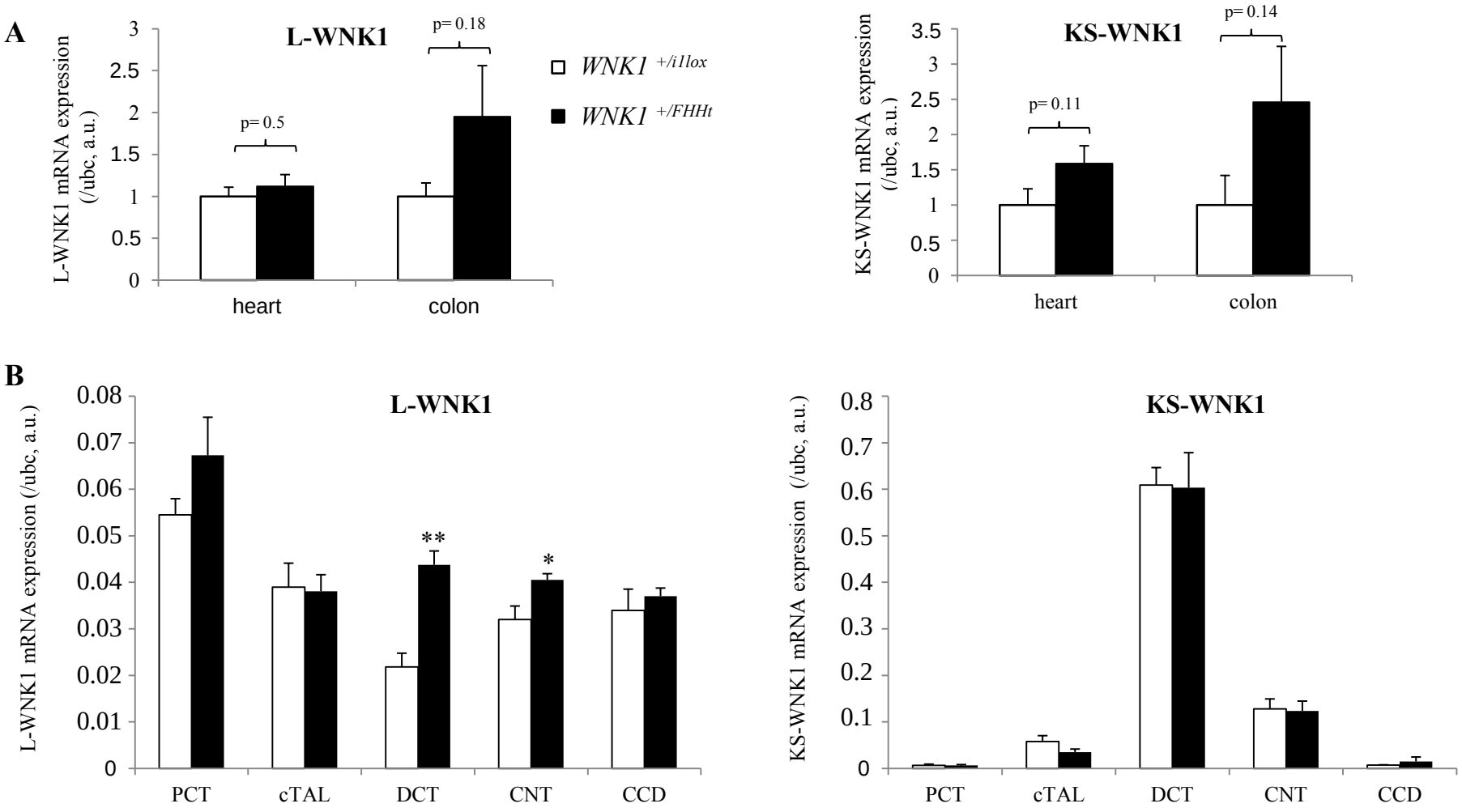


Figure 6: Deletion of *WNK1* first intron results in an increased expression of L-WNK1 in the distal nephron. Level of expression of L-WNK1 (left panels) and KS-WNK1 (right panels) mRNA quantified by real-time RT-PCR and expressed as a ratio of ubiquitine C (ubc) expression in heart and colon (A, n=7 per group) and in the microdissected nephron (B, n=6 per group). In the heart and colon, the of WNK1 isoforms in *WNK1* $^{+/i1lox}$ mice was arbitrarily set to 1. Data are mean s.e.m. * $p<0.05$, ** $p<0.0005$ vs *WNK1* $^{+/i1lox}$.

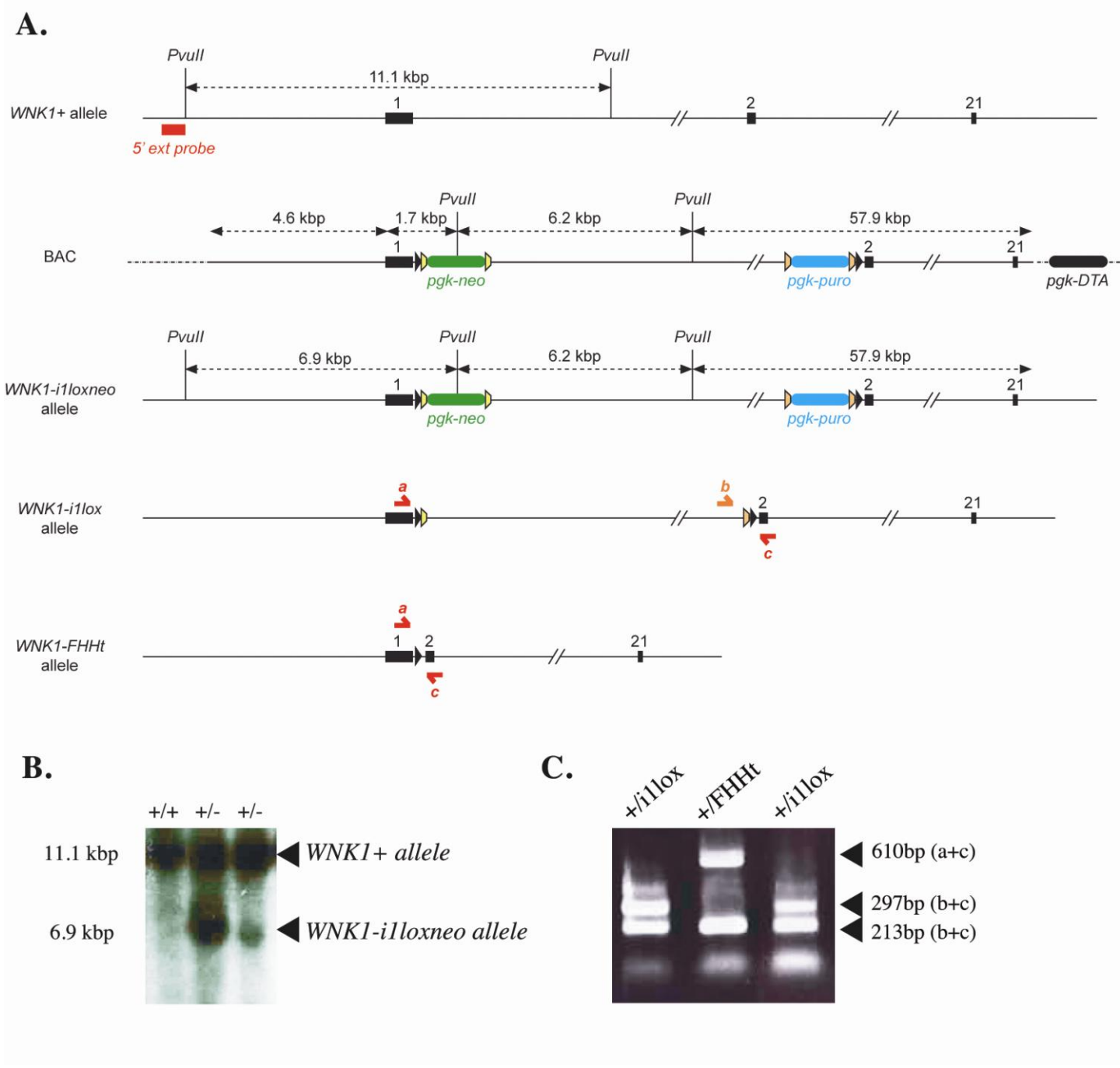


Figure S1. Generation of WNK1+/FHHt mice.

(A) Targeting strategy for generating WNK1+/FHHt mice. The diagram shows the wild-type mWNK1 locus, the targeting construct (BAC), the targeted locus before (WNK1-i1loxneo allele) and after (WNK1-i1lox allele) FLP recombination and after Cre recombination (WNK1-FHHt allele). The black triangles represent the loxP sites, the yellow and orange trapezoids correspond to the wild-type and mutated (FRT3) FRT sites, respectively.

(B) Verification of homologous recombination by Southern blotting of PvuII-digested genomic DNA of the selected ES cell clones; the probe (5'ext probe) is shown as a red rectangle in (A). The 6.9kbp band corresponds to the insertion of recombination sites and selection cassette near exon 1.

(C) Genotyping of the WNK1i1lox and WNK1FHHt alleles by PCR on genomic DNA derived from mouse tails. The localisation of the primers used are shown in A (red and orange arrows above and below the schematic representation of the WNK1-FHHt allele): primer a = mWNK1-i1-5LAs, primer b = mWNK1-i15'puro2-s and primer c = mWNK1-i13'puro-as. An example of a representative PCR is given: the 213bp band corresponds to the wild-type allele, the 297bp band to the WNK1i1lox allele and the 610bp band to the WNK1FHHt allele.

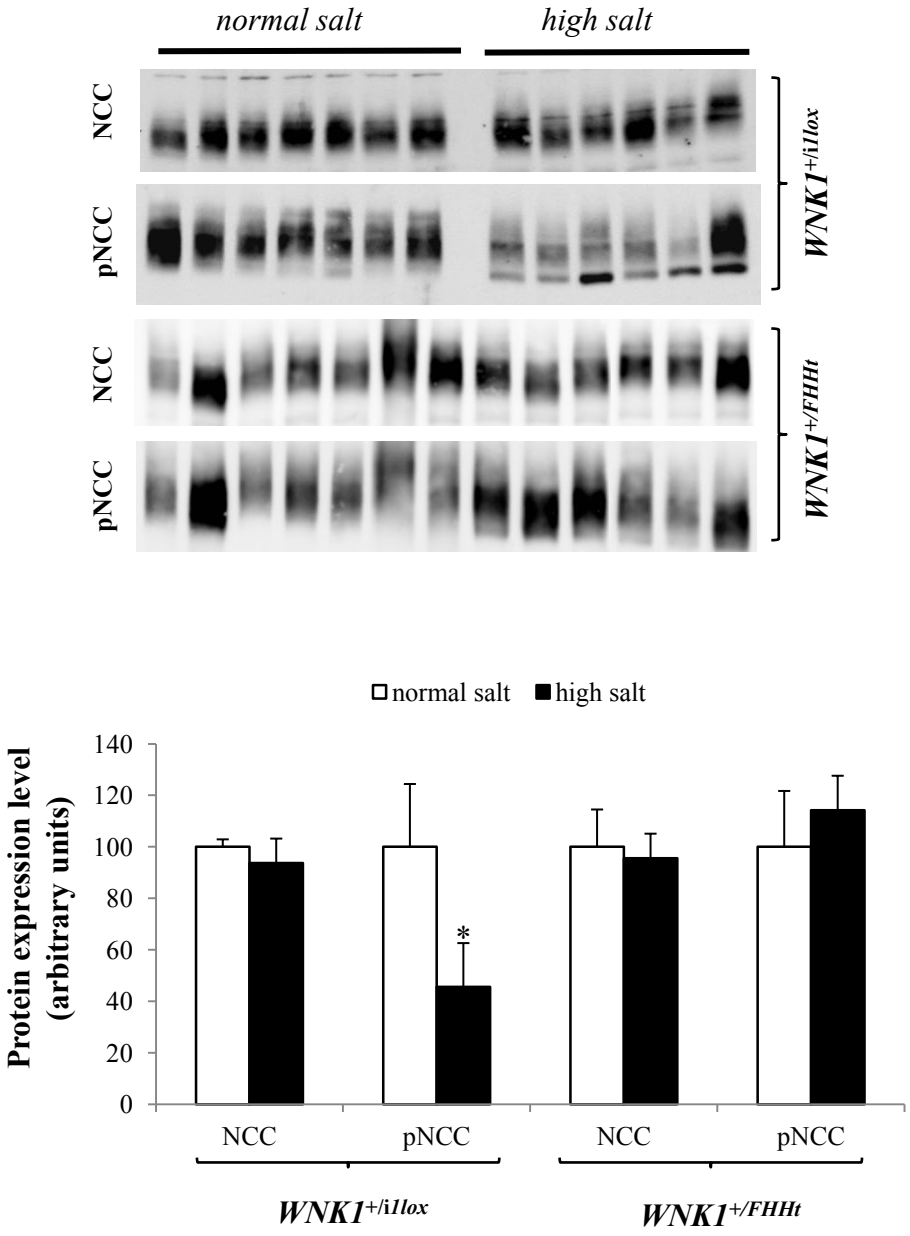


Figure S2: Regulation of NCC expression and phosphorylation by Na intake in *WNK1*$^{+/FHHt}$ and *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice. The renal cortex was dissected after 15 days of high salt (3%Na) diet (n=6+7) or during the normal (0.24% Na) diet (n=7+7). Immunoblots with antibodies against NCC or phospho-NCC were performed on plasma membranes-enriched protein fraction. Whereas NCC phosphorylation is dowregulated by high salt intake in control mice, such a downregulation is lost in *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice. Data are mean s.e.m. * $p<0.05$

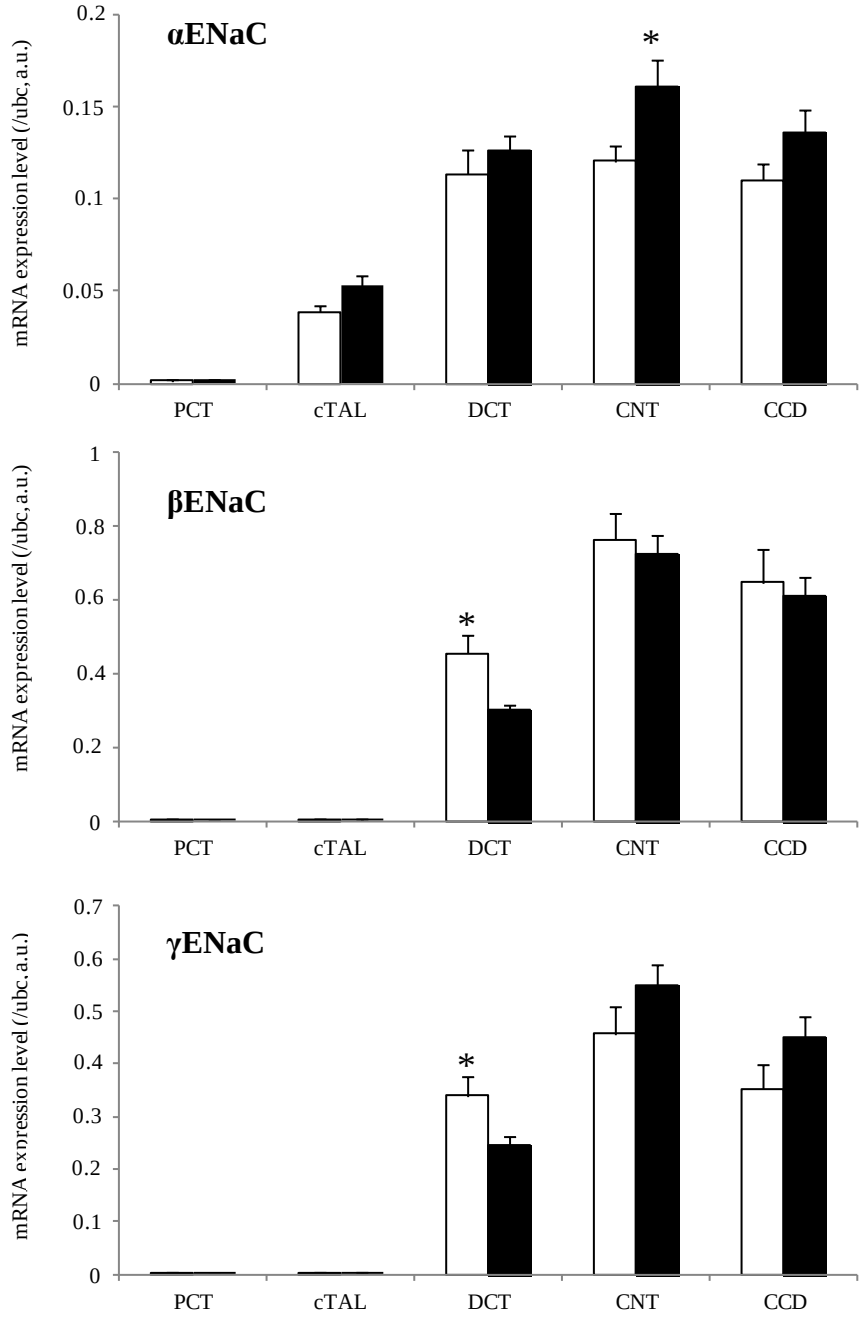


Figure S3: mRNA expression of Scnn 1a, -b and -g in *WNK1*$^{+/FHHt}$ and *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice. mRNA expression of Scnn 1a, -b and g, encoding respectively the α, β, and γ subunits of ENaC, expressed as a ratio of ubiquitin C in arbitrary units, in microdissected cortical nephron segments of *WNK1*$^{+/i1lox}$ mice (n=6) and *WNK1*$^{+/FHHt}$ mice (n=6); PCT: Proximal Convoluted Tubule; cTAL: cortical Thick Ascending Limb of Henle's loop; DCT: Distal Convoluted Tubule; CNT: Connecting Tubule; CCD: Cortical Collecting Duct . Data are mean s.e.m. * $p<0.05$

Homology arms subcloning	
N-i15'LA-s	ataagaatgcggccgcCCAGCAGTACCAGCAAAGACC
Bg-i15'LA-as	gaagatctAAACTGGCTTAACAGAGCCAAA
E-i15'RA-s	cggaattcTGTCGAGTTCACTCTTTACTTG
X-i15'RA-as	ccgctcgagAATTCCCAAAGGCTGAGGATA
E-i13'LA-s	gcgaattcAGCTCCTGTAAAGGCACCAA
X-i13'LA-as	ccgctcgagATGGTGACAATCTCAGAAGTCAG
Sp-lox-i13'RA-s	gcACTAGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGTGCCATCTTGACCAGCTTATT
Nh-i13'RA-as	gctagcAGAGGGCAACCTTGACATTG
Genotyping	
mWNK1-i15'LAs	CCAGCAGTACCAGCAAAGACC
mWNK1-i15'puro2-s	TACCTGACTTCTGAGATTGTCACC
mWNK1-i13'puro-as	CGAACAATGTTGGGATGTTG
Real Time quantitative RT-PCR (SyBr Green)	
mWNK1-qPCR-ex2s	CGTCTGGAACACTTAAAACGTATCT
mWNK1-qPCR-ex3as	CACCAGCTTCTTAAAACTTTGATTT
mWNK1-qPCR-ex4a-s	TTGTTATTGTAAATTCTCATTGCTG
mWNK1-qPCR-ex5as	AGGAATTGCTACTTTGTCAAAACTG
mNCC-s	CTGGAGAACCTGTTCGCTTC
mNCC-as	GACTTGACCTTGCCATTGGT
mα-ENaC-s	CGGAGTTGCTAAACTCAACATC
mα-ENaC-as	TGGAGACCAGTACCGGCT
mβ-ENaC-s	ATGTGGTTCCTGCTTACGCTG
mβ-ENaC-as	GTCCTGGTGGTGTTGCTGTG
mγ-ENaC-s	CCAAAGCCAGCAAATAAACAAA
mγ-ENaC-as	GCGGCGGGCAATAATAGAGA
mUbc-s	AGCCCAGTGTTACCACCAAG
mUbc-as	ACCCAAGAACAAGCACAAGG

Table S1. Sequence of primers used for PCR amplification and cloning of the homology arms used to modifiy the BAC, mice genotyping and Real Time quantitative RT-PCR. In the sequence of the subcloning primers, the lower-case letters correspond to the sequence of the restriction site used for subcloning. In the sequence of Sp-lox-i13'RA-s, the underlined sequence is that of the loxP site.

III. Nouveaux résultats et perspectives

Comme le montre l'article, les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ représentent un bon modèle d'étude d'Hypertension Hyperkaliémique Familiale. Elles apportent la preuve que les délétions retrouvées chez les patients ont bien un rôle causal dans la maladie. Notre étude a montré que ces souris ont une activation majeure du co-transporteur NCC et que celle-ci joue un rôle central dans l'apparition des troubles métaboliques et de l'hypertension. Sur le plan moléculaire, la délétion du premier intron de *WNK1* entraîne une expression augmentée de l'isoforme longue L-WNK1 dans le DCT et le CNT sans modification de KS-WNK1.

1. Voie d'activation de NCC.

Le modèle murin d'HHF par mutation de *WNK1* présente une augmentation d'expression de L-WNK1 dans le DCT et une augmentation d'expression, de phosphorylation et d'activité de NCC. Notre étude ne permet cependant pas de conclure quant au mécanisme exact reliant L-WNK1 à NCC. Les études *in vitro* suggèrent deux mécanismes possibles, tous deux indirects, par lesquels une augmentation de L-WNK1 pourrait conduire à une activation de NCC. Tout d'abord, L-WNK1 pourrait activer NCC via WNK4, en levant l'inhibition exercée par WNK4 sur NCC [72,73,76]. Ce mécanisme est cependant incertain puisque le tonus inhibiteur de WNK4 sur NCC, suggéré par les études *in vitro*, est contesté par certains travaux *in vivo* qui suggèrent au contraire que WNK4 pourrait activer NCC [131,135].

Afin de déterminer si WNK4 joue un rôle en aval de L-WNK1 dans l'activation de NCC, nous générons actuellement des souris porteuses de la délétion de l'intron 1 de *WNK1* et d'une mutation inactivatrice de *WNK4* (souris *WNK4*$^{-/-}$,[131]). Nous pourrons ainsi déterminer si la réduction ou l'absence de WNK4 modifie le phénotype des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$. Ce modèle permettra pour la première fois une approche *in vivo* de la cascade WNK1/WNK4/NCC.

Une deuxième voie possible par laquelle une augmentation de L-WNK1 entraîne une activation de NCC est la phosphorylation de SPAK, qui a son tour phosphoryle et active NCC [47,82,83]. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation d'expression et de phosphorylation de SPAK dans le cortex rénal des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ (figure 3 de l'article). Il est possible que SPAK soit activé dans le DCT mais inhibé dans la cTAL. En effet SPAK est également exprimé dans la cTAL où il participe à l'activation de NKCC2 en le phosphorylant [111]. Afin de tester cette hypothèse, nous allons étudier de façon semi-quantitative l'expression et la phosphorylation de SPAK dans le DCT et la cTAL par immunohistochimie, en collaboration avec le Dr Kerim Mutig (Université de La Charité, Berlin, Allemagne).

2. Comprendre l'hypercalciurie des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$

Les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ ont une calciurie deux à trois fois supérieure à celle des souris contrôles. Ce phénotype a été observé chez les souris présentant une hypertension hyperkaliémique par mutation de *WNK4* [128,129,136]. Chez les patients, une hypercalciurie et même des lithiases ont été rapportées mais leur mécanisme n'a jamais été exploré. Après un très bref rappel sur les mécanismes de réabsorption du calcium par le néphron, je détaillerai l'ensemble des données sur les liens entre métabolisme calcique et kinases WNKs. Puis je discuterai les premiers résultats obtenus dans le modèle *WNK1*$^{+/FHHt}$ concernant cette

problématique, ainsi que les explorations envisagées pour mieux comprendre l'hypercalciurie observée dans ce modèle d'hypertension hyperkaliémique.

a) Transport rénal du calcium : brefs rappels

Le rein participe à l'homéostasie calcique en régulant la réabsorption du calcium, librement filtré par le glomérule [208,209]. Moins de 2% du calcium filtré est excrété dans l'urine. La plus grande part de la réabsorption est paracellulaire, dans le tubule proximal et l'anse ascendante large de l'anse de Henlé. Cette réabsorption est passive, et suit le gradient électrochimique généré par le transport de Na^+ dans ces segments. Dans le néphron distal, au niveau de la deuxième partie du DCT et du CNT a lieu moins de 20% de la réabsorption, de manière active, par une voie transcellulaire (figure 16).

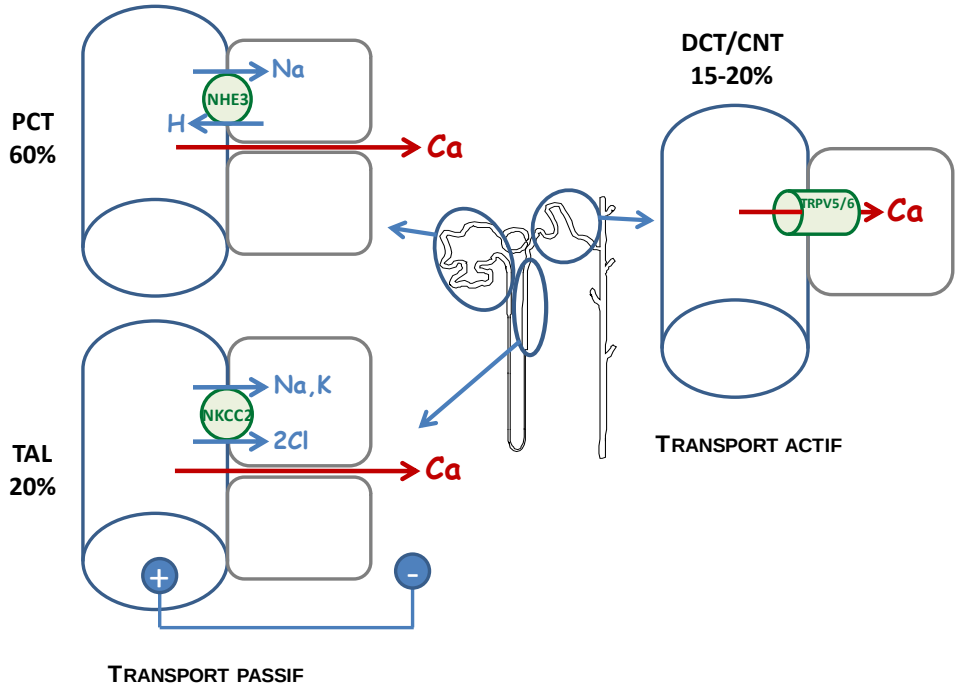


Figure 16: Rappel schématique sur le transport de calcium le long du néphron. Environ 80% du calcium filtré est réabsorbé de manière passive dans le PCT et la TAL, selon le gradient de voltage généré

par le transport de sodium dans ces mêmes segments. 15 à 20% sont réabsorbés dans le DCT et le CNT de manière active par le canal TRPV5.

Cette réabsorption est donc régulée indépendamment de la balance sodée, en particulier par la PTH (parathormone) et le calcitriol. Le calcium entre dans la cellule par le canal TRPV5 (Transient Receptor Potential Vanilloid 5 Ca2+ channel), exprimé dans la membrane apicale du DCT2 et du CNT. Il se lie ensuite à la Calbindin D28K, qui assure sa diffusion dans le cytosol jusqu'à la membrane baso-latérale et sort de la cellule via l'échangeur Na^+/Ca^{2+} NCX1 ou PMCA1b (Plasma membrane Ca^{2+} ATP-ase 1b). Le transport actif du calcium dans le tubule distal, consommateur d'ATP, est schématisé dans la figure 17.

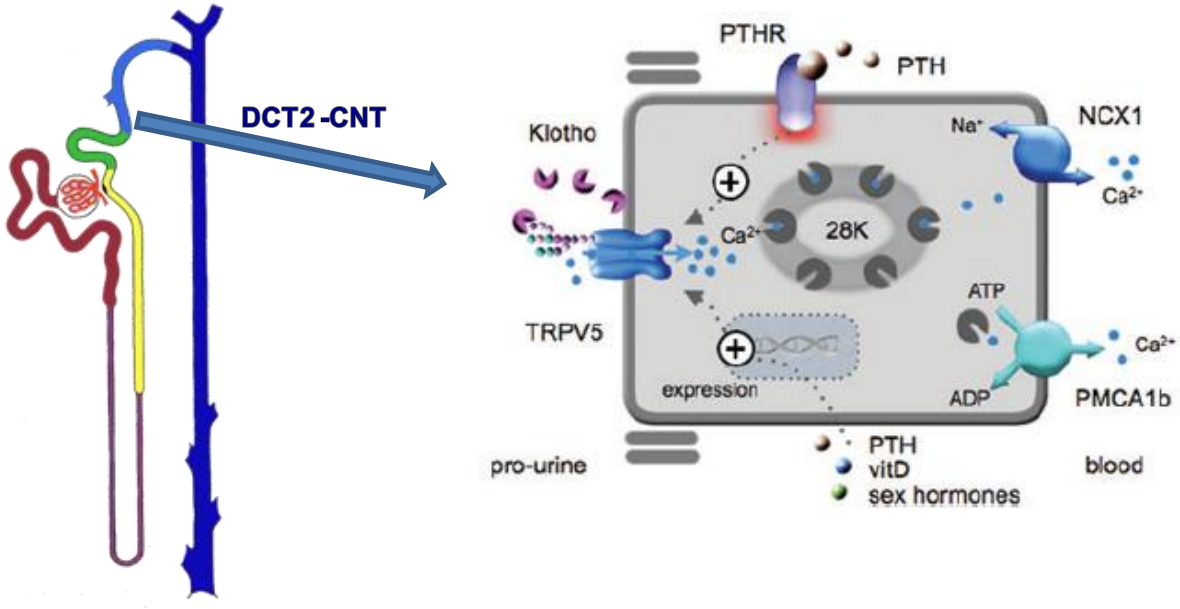


Figure 17: Transport actif transcellulaire du calcium dans le tubule distal. D'après Dimke *et al.* [208]. PTH : parathormone - PTHR: récepteur de la parathormone - vitD : calcitriol - TRPV5 : Transient Receptor Potential Vanilloid 5 Ca^{2+} channel - 28K : calbindin D28K - NCX1: Na^+/Ca^{2+} exchanger type 1 - PMCA1b : Plasma membrane Ca^{2+} ATP-ase 1b.

b) HHF, kinases WNK et métabolisme calcique

- ***WNK4 et métabolisme calcique : données chez les patients***

L'association d'une hypercalciurie voire de lithiases rénales à l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale a été rapportée très tôt [70,210,211]. Concernant les patients ayant une mutation dans le gène *WNK4*, l'ensemble des données provient de l'étude d'une grande famille israélienne présentant la mutation Q565E. La publication initiale descriptive de cette famille souligne, outre les traits caractéristiques du syndrome de Gordon, des anomalies du métabolisme calcique [19], explorées plus avant lors d'une étude ultérieure sur 18 sujets atteints et 16 apparentés non atteints [4]. Les patients HHF ont une calcémie légèrement inférieure aux sujets contrôles (2,36±0.04 vs 2,45±0.08 mmol/l, p=0,01) et une calciurie supérieure (0,85±0,34 vs 0.28±0,12 mmol/mmol créatinine, p<0,001). Sous thiazidiques, cette valeur diminue significativement chez les patients à 0,28±0,19 mmol/mmol créatinine. Les taux de magnésium, phosphore et PTH plasmatiques sont normaux et comparables entre les deux groupes. Les auteurs précisent que l'hypercalciurie est contemporaine de l'apparition des premiers troubles ioniques, notamment de l'hyperkaliémie, et précède donc, parfois de nombreuses années, l'apparition de l'HTA.

De nouvelles explorations ont récemment été menées sur cette large famille israélienne pour tenter de comprendre le mécanisme de l'hypercalciurie [17]. Les patients atteints d'HHF ont une calciurie corrélée à la natriurèse, ce qui n'est pas le cas chez les patients contrôles, et ont un ratio calcium/sodium dans les urines supérieur aux patients contrôles. La réabsorption proximale du sodium a été évaluée indirectement chez 8 patients par la mesure de la clairance endogène du lithium [17]. Ces auteurs s'attendaient à observer une clairance augmentée chez les patients, témoignant d'une moindre réabsorption proximale du sodium or ils ont observé l'inverse, à savoir une clairance du lithium diminuée de moitié chez les patients par rapports

aux sujets sains apparentés. Le mécanisme de l'hypercalciurie dans l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale est donc loin d'être élucidé. Il est enfin rapporté chez ces mêmes sujets une densité minérale osseuse diminuée (mais non comparée aux apparentés sains) et des lithiases urinaires « fréquentes ». La notion de petite taille dans certains cas de syndrome de Gordon a été rapportée [2,212] et semblait aussi concerner certains membres de cette famille. Mais une publication récente précise que la petite taille ne concerne qu'une branche de la famille et ne fait donc pas partie des signes de l'HHF [16].

- ***Cas des patients ayant une mutation de WNK1***

La seule étude publiée mentionnant la calciurie des patients présentant une mutation de *WNK1* [20] porte sur une famille avec 17 membres atteints et 32 apparentés non atteints. Il y est précisé que les patients n'ont ni petite taille ni pathologie lithiasique. Les analyses sont faites sur les urines de la nuit, et non un recueil des 24H, et ne montrent pas d'hypercalciurie. Le rapport calcium/créatinine est même moindre chez les atteints, mais de manière non significative (0,45±0,32 vs 0,55±0.34 mmol/mmol, p=0,52). Il est possible cependant que la natriurèse significativement moindre chez les patients diminue la calciurie mesurée sur cet échantillon. Notons enfin que la magnésémie est strictement normale chez les patients.

- ***Kinases WNK et ostéoporose***

Plusieurs publications suggèrent un lien entre métabolisme calcique et WNKs, en particulier WNK1 et WNK4. Une publication récente a rapporté qu'un variant rare de *WNK4*, présentant une mutation sur une arginine hautement conservée de l'exon 17 (R1204C), est associé à l'ostéoporose dans une population portugaise [177]. Une autre équipe a étudié les gènes différentiellement exprimés dans les lymphocytes de femmes ménopausées en fonction

de leur densité minérale osseuse et a identifié plusieurs gènes de la voie des MAP Kinases, dont *WNK1*, comme étant sous-exprimés dans le groupe de densité minérale osseuse faible [213]. Notons enfin qu'une équipe a suggéré que l'effet bénéfique des thiazidiques sur la densité minérale osseuse pourrait aussi être le résultat de l'action directe de l'inhibition de NCC sur la différentiation ostéoblastique et l'ostéoformation [214]. En effet, NCC est exprimé dans les ostéoblastes d'homme et de rat. Les thiazidiques stimulent l'expression de marqueurs de différentiation sur des ostéoblastes en culture et favorisent aussi la formation de nodules minéralisés. L'expression des WNKs dans l'os n'a cependant jamais été étudiée.

- ***Apport des modèles animaux d'HHF***

Les deux modèles murins de syndrome de Gordon par mutation de *WNK4* présentent une hypercalciurie [128,129]. L'hypercalciurie de ces souris est très nettement exacerbée sous un régime riche en sodium (d'un facteur 6 contre un facteur 2 chez les souris sauvages). La calcémie, la PTH et le calcitriol ne sont pas différents des contrôles. Enfin, l'inhibition génétique ou pharmacologique de NCC corrige l'hypercalciurie, suggérant l'implication directe ou indirecte de l'hyperactivation du co-transporteur dans la diminution de la réabsorption rénale de calcium.

Au niveau moléculaire, l'expression de TRPV5 chez les souris "WNK4-HHF" est identique aux souris contrôles, alors que celle de TRPV6 et de la calbindine 28 est supérieure à celle des souris contrôles. L'ensemble de ces résultats est donc en défaveur d'une diminution du transport actif de calcium comme mécanisme causal de l'hypercalciurie. En revanche, l'expression de NKCC2 est diminuée chez les souris mutantes, qui de plus n'augmentent pas leur calciurie sous furosémide, suggérant une moindre activité de NKCC2. Les auteurs concluent que les souris ont un moindre transport de sodium dans l'anse de Henlé en compensation de l'hypervolémie liée à l'activité de NCC et, par conséquent, une

diminution de la réabsorption passive de calcium dans ce segment, responsable de l'hypercalciurie. Notons cependant que les auteurs n'ont pas cherché à éliminer l'éventuelle participation de l'intestin ou de l'os à l'hypercalciurie. De plus, une des rares données dont on dispose concernant la réponse au furosémide chez les patients rapporte au contraire une réponse augmentée à l'injection de furosémide chez un jeune patient de 7 ans dont on ne connaît cependant pas la mutation causale [70].

c) Métabolisme calcique chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$

- ***Discussion des résultats présentés dans l'article***

Les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ présentent une hypercalciurie (0,98±0,13 *vs* 0,37±0,13 mmol/mmol creatininurie, p=0,001). La calcémie, la magnésémie, la phosphorémie et le taux de parathormone (PTH) ne sont pas différents entre les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ et les souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ (Tableau 1 de l'article). Sous régime riche en sodium (3% Na), la différence de calciurie s'amplifie nettement (8,7±0,92 vs 1,63±0,19 mmol/mmol, p=0,0003). Le blocage du co-transporteur NCC par une injection intrapéritonéale d'hydrochlorothiazique (12,5mg/kg) s'accompagne chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ d'une réponse natriurétique et chlorurétique rapide, supérieure à celle des souris contrôles, ce qui témoigne d'une activité basale de NCC augmentée chez les souris mutantes (Figure 2 de l'article). Dans les 4 heures qui suivent l'injection, l'hypercalciurie des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ n'est pas modifiée. De manière intéressante, on observe entre 4 et 12h après l'injection une excrétion de sodium et de chlore freinée, de manière plus importante chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ que chez les souris *WNK1*$^{+/i1lox}$. Cette phase traduit selon toute vraisemblance une activation compensatrice de la réabsorption proximale de sodium et de chlore, en particulier par le co-transporteur NKCC2. Pendant cette même période de recueil, la calciurie des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ diminue

drastiquement pour rejoindre celle des souris *WNK1*$^{+/i1lox}$. Si une activation proximale de la réabsorption de sodium efface l'hypercalciurie, cela suggère que le mécanisme à l'origine de l'hypercalciurie puisse être une relative inhibition du transport de sodium, en particulier par NKCC2, chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ en comparaison aux souris *WNK1*$^{+/i1lox}$. En accord avec cette hypothèse, le blocage de NKCC2 par une injection intrapéritonéale de furosémide (100µg/10g) entraîne une moindre excrétion de sodium et de chlore chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ mais n'augmente pas leur calciurie alors qu'elle augmente très nettement celle des souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ (Figure 5 de l'article et Figure 18).

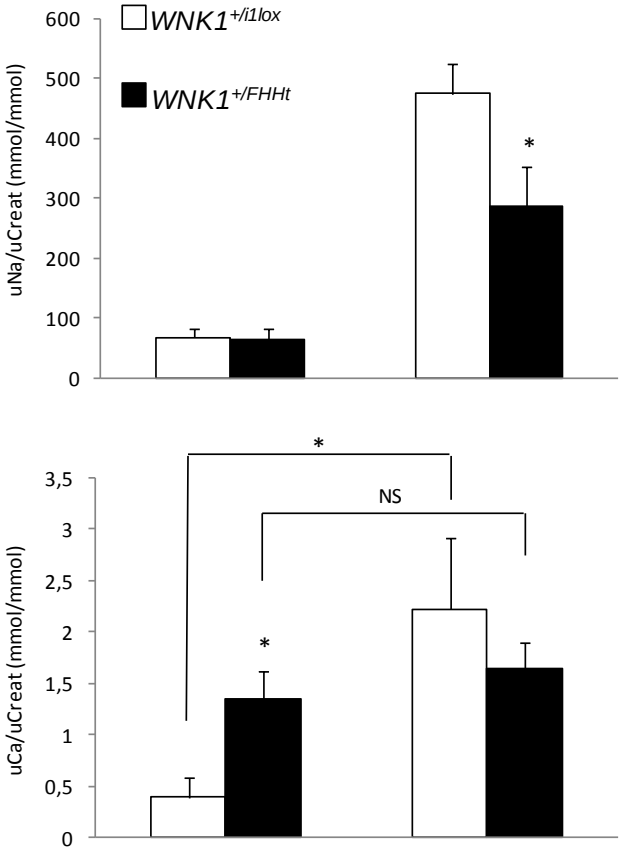


Figure 18 : L'activité de NKCC2 est diminuée chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$. Excrétion urinaire de sodium (A) et de calcium (B) deux heures après l'injection intrapéritonéale de sérum physiologique (véhicule, 50 µL/10g) ou de furosémide (100 µg/10g), chez des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ (noir, n=6) et souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ (blanc, n=6). (A) La réponse natriurétique à l'injection de furosémide est moindre chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$. (B) La différence basale de calciurie s'efface suite à l'injection de furosémide.

L'ensemble de ces résultats suggère que la calciurie des souris HHF serait secondaire à une diminution du transport passif du calcium au moins dans l'anse de Henlé, en raison d'une inhibition de NKCC2, elle-même réactionnelle à l'augmentation de l'activité de NCC. Le mécanisme serait donc similaire à celui suggéré par l'équipe d'Uchida pour expliquer l'hypercalciurie des souris "WNK4-HHF" [134]. Nous n'avons pas étudié le transport de sodium dans le tubule proximal, en particulier par NHE3, dans notre modèle murin.

Ce mécanisme est à rapprocher de celui qui est retenu pour expliquer l'hypocalciurie secondaire à une inhibition constitutive ou pharmacologique de NCC. En effet, l'hypercalciurie de l'HHF est le miroir de l'hypocalciurie du syndrome de Gitelman ou d'un traitement par les diurétiques thiazidiques. Depuis les travaux du groupe de R. Bindels [215], il est admis que le mécanisme à l'origine de l'hypocalciurie en cas d'inactivation de NCC est une augmentation du transport passif de calcium dans le tubule proximal, qui fait lui-même suite à une réabsorption de sel augmentée dans ce segment, phénomène de contre-régulation à la perte sodée dans le tubule distal. Les parts respectives du transport passif dans le tubule proximal ou l'anse de Henlé sont cependant encore inconnues, que ce soit dans le cas d'une inactivation ou celui d'une activation de NCC.

- ***Nouveaux résultats***

Nous avons quantifié l'expression de NKCC2 par RT-qPCR dans les tubules microdisséqués et dans la fraction membranaire du cortex rénal; celle-ci est identique entre les deux groupes de souris (Figure 19). De même, le transporteur TRPV5 ne voit pas son expression modifiée chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$. Cependant le niveau d'expression des transporteurs ne préjuge pas de leur activité, modulée par des phénomènes post-transcriptionnels. Nous avons également quantifié l'expression protéique du NKCC2 par western blot, cependant le niveau d'expression, en particulier chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$, est

très variable (figure 19C). Il serait notamment important de quantifier le niveau de phosphorylation de NKCC2, meilleur reflet de son activité.

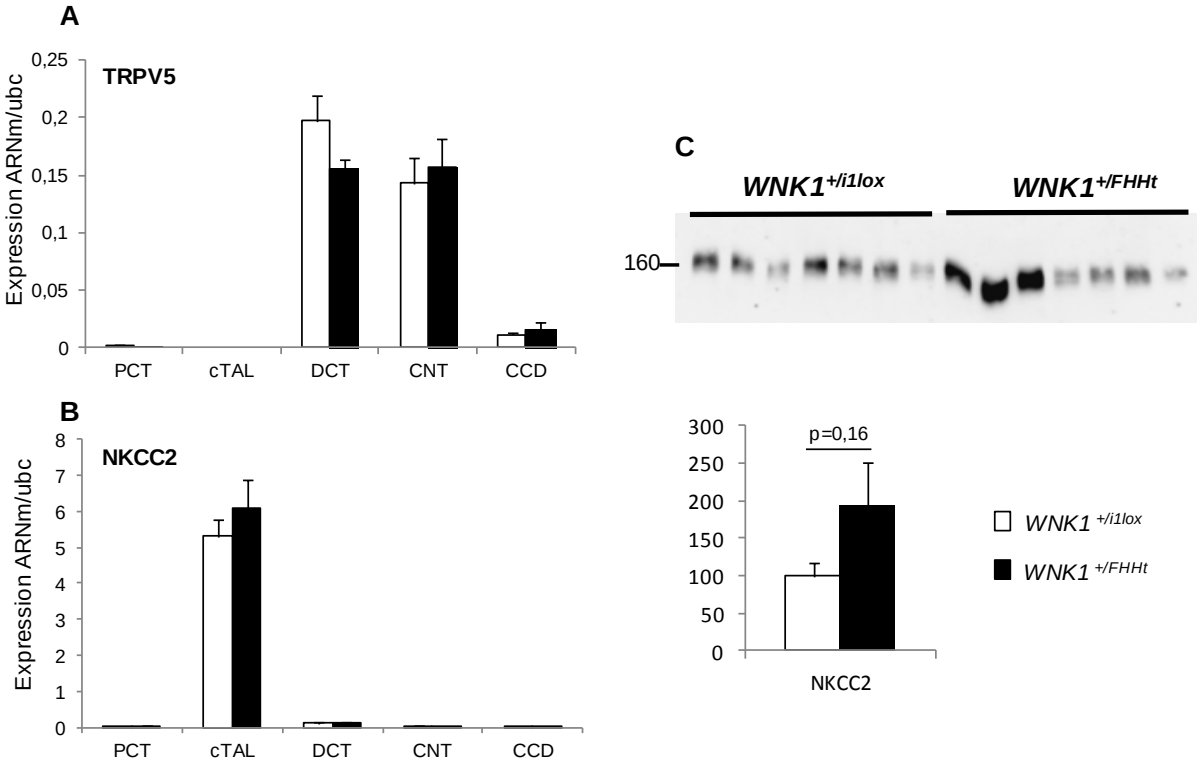


Figure 19 : Profil d'expression de TRPV5 (A) et NKCC2 (B) dans les segments tubulaires corticaux microdisséqués des souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ (n=6) et les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=6). Les niveaux d'expression sont relatifs au gène de référence, l'ubiquitine C. PCT: Tubule Contourné Proximal- cTAL: branche ascendante large corticale de l'anse de Henlé– DCT: Tubule Contourné Distal– CNT: Tubule Connecteur– CCD: Canal Collecteur Cortical.C : Western Blot réalisés avec un anticorps dirigé contre NKCC2 sur des protéines issues de cortex rénal enrichi en fraction membranaire.

Les sorties de calcium étant plus élevées chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$, avec une calcémie et une PTH comparables aux souris contrôles, les entrées de calcium, à partir des stocks osseux ou alimentaires, doivent être supérieurs. L'étude des marqueurs de remodelage osseux n'a pas encore été faite; en revanche, nous avons étudié la densité minérale osseuses des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ en comparaison aux souris *WNK1*$^{+/i1lox}$, sur des souris mâles de 3 mois et de un an, en collaboration avec le Dr Valérie Geoffroy (Inserm U606, Hôpital Lariboisière,

Paris). A 3 mois comme à un an, nous n'avons pas mis en évidence de différence de densité minérale osseuse entre les deux groupes, que ce soit au tibia, au fémur ou au rachis (Figure 20).

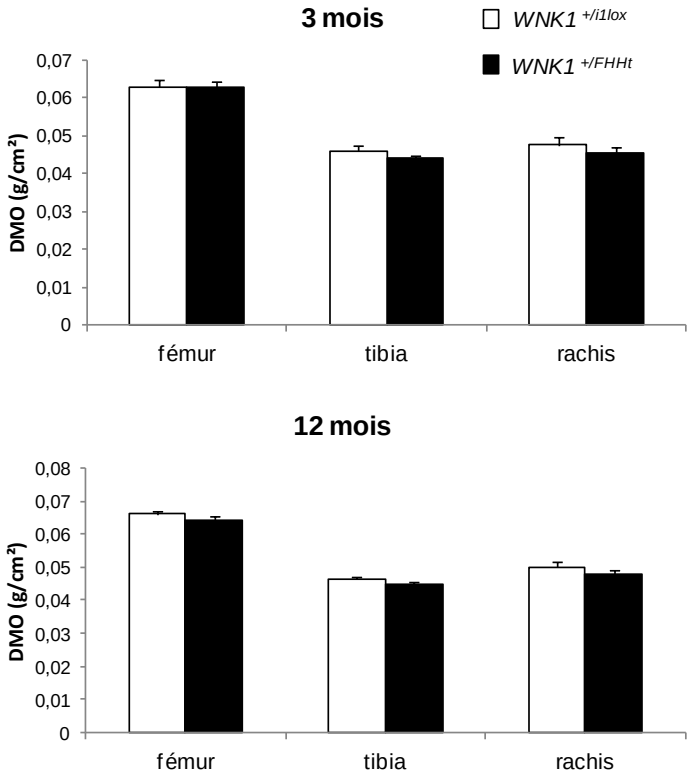


Figure 20 : Les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ ont la même densité minérale osseuse que les souris *WNK1*$^{+/i1lox}$. Densité minérale osseuse (DMO) au fémur, au rachis et au tibia, mesurée à 3 mois (graphique du haut) sur des souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ (n=8, en noir) et les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=10, en gris clair) et mesurée à 12 mois (graphique du bas) sur un groupe différent de souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ (n=8, en noir) et les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ (n=8, en gris clair). Les valeurs de DMO mesurées aux trois sites ne sont pas statistiquement différentes entre les deux groupes, ni à 3 mois, ni à un an.

Cette technique est peut-être d'une sensibilité insuffisante pour mettre en évidence une différence minime de minéralisation osseuse. Cependant, ce résultat montre que la calciurie supérieure chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ ne provient pas d'une résorption osseuse augmentée ni ne la provoque secondairement. La calciurie élevée des souris n'étant pas compensée par une résorption osseuse excessive, on peut supposer que l'absorption digestive de calcium est

supérieure. Comme le montre la figure 21, le « delta de calciurie » entre un régime sans calcium et un régime normocalcique est supérieur chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$, témoignant d'une absorption digestive de calcium augmentée. Cependant, on note aussi sur la figure 21A que la différence de calciurie entre les deux groupes de souris, même si elle est moindre, persiste en régime sans calcium. Cela démontre l'existence d'une fuite rénale de calcium primitive, l'hyperabsorption digestive étant probablement secondaire à cette fuite rénale.

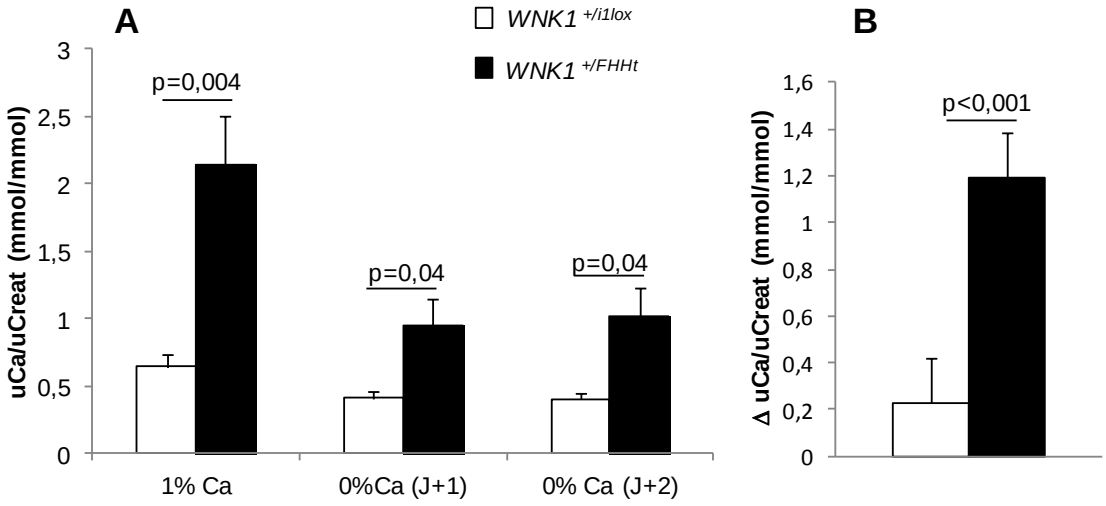


Figure 21 : L'hypercalciurie des souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ persiste sous régime pauvre en calcium.

A : Calciurie sur recueil de 24 heures en régime normocalcique (1% Ca^{2+} – 0,54%Na^{+}) puis après passage à régime pauvre en calcium (0,03% Ca^{2+} – 0,45% Na^{+}). J+1=H12-H24 , J+2=H24-H48. La calciurie demeure significativement supérieure chez *WNK1*$^{+/FHHt}$ en l'absence de tout apport alimentaire de calcium. Recueils réalisés sur 6 souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ et 6 souris *WNK1*$^{+/i1lox}$ placées en cages à métabolisme. B : Variation de calciurie, exprimée en mmol/mmol créatininurie, entre le régime pauvre en calcium (J+1) et le régime normocalcique. La variation nettement supérieure chez les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ traduit une absorption digestive de calcium supérieure.

Afin de poursuivre l'exploration du métabolisme calcique de notre modèle, plusieurs expériences sont prévues à court terme. Nous souhaitons ainsi doser les marqueurs de

remodelage osseux ainsi que le calcitriol. La compréhension du mécanisme à l'origine de l'hypercalciurie dans ce modèle permettra de progresser dans la connaissance plus générale de la régulation rénale du transport de calcium comme l'a permis l'étude de l'hypocalciurie du syndrome de Gitelman.

Conclusions et perspectives

Mon travail de thèse a porté sur WNK1 et son rôle dans l'homéostasie. Cette kinase suscite un intérêt majeur depuis qu'il a été montré en 2001 que sa mutation était responsable de l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (HHF), maladie rare qui associe une hypertension à une hyperkaliémie et une acidose métabolique hyperchlorémique. L'identification de *WNK1* comme l'un des gènes en cause dans l'HHF signait ainsi son implication dans la régulation de la pression artérielle, de la kaliémie et de l'équilibre acido-basique. Depuis cette découverte, dont le hasard de l'histoire des sciences a voulu qu'elle suive d'un an celle de la première description de la kinase, WNK1 a fait l'objet de nombreux travaux, aussi bien moléculaires que fonctionnels *in vitro*. Très peu d'études *in vivo* ont cependant été réalisées pour mieux comprendre les fonctions de *WNK1* et le lien physiopathologique entre sa mutation et les symptômes de l'HHF.

L'objectif principal de ma thèse était donc de générer puis d'étudier un modèle murin d'HHF par mutation analogue à celle présentée par les patients, à savoir une délétion hétérozygote du premier intron de *WNK1*. En parallèle de la génération de ce modèle murin, nous souhaitions étudier en détail les phénomènes d'épissage alternatif auxquels est soumis *WNK1*, aspect peu exploré qui nous paraissait pourtant essentiel à une meilleure compréhension des fonctions de la kinase.

Epissage alternatif de WNK1 : conclusions

Si l'existence des deux isoformes L-WNK1 et KS-WNK1, exprimées sous le contrôle de deux promoteurs alternatifs, avait été bien établie, aucune étude n'avait caractérisé en détail les phénomènes d'épissage alternatifs et surtout le profil d'expression des isoformes ainsi générées. Nous avons ainsi pu établir que *WNK1* est un gène à 33 exons et non 28 comme classiquement décrit ; parmi ces 33 exons, 9 sont soumis à épissage alternatif, certains exprimés de manière ubiquitaire, d'autres exprimés uniquement ou préférentiellement dans certains tissus. Nous avons de plus montré que ces phénomènes sont en grande partie

conservés entre l'homme et la souris. L'aboutissement de ce travail a nécessité de développer et de valider une nouvelle méthodologie. En effet, nous avons mis au point une technique basée sur une analyse spécifique des résultats de qPCR afin de pouvoir établir, au-delà du profil d'expression tissulaire de chaque exon ou isoforme, les proportions respectives de chaque variant au sein d'un tissu donné.

Isoformes de WNK1 : perspectives

Ce travail a deux impacts principaux : il est tout d'abord un support utile pour toutes les équipes qui s'intéressent au rôle de WNK1 dans le rein ou dans les autres organes puisqu'il définit chez l'homme et la souris les proportions respectives de chaque isoforme dans un large panel de tissus. Nous avons ainsi, en collaboration avec le laboratoire du Professeur Gamba au Mexique, entrepris de reprendre les travaux *in vitro* pour comprendre les liens fonctionnels entre les isoformes rénales de WNK1 et NCC, à la lumière de ces nouvelles données. Les résultats préliminaires sont très encourageants. Par ailleurs, au-delà de *WNK1*, ce travail ouvre des perspectives de par la nouvelle méthodologie qu'il développe. Cette méthode peut trouver une utilité dans de larges domaines puisqu'elle permet, pour tout gène qui donne naissance à plusieurs isoformes, de déterminer les proportions respectives des variants exprimés dans une condition ou un tissu donné.

Génération et étude d'un modèle murin d'HHF : conclusions

Parallèlement à ce travail, nous avons pu générer le modèle murin de délétion hétérozygote du premier intron de *WNK1*. Dans un premier temps, nous avons caractérisé le phénotype de ces souris et ainsi établi qu'elles présentent des troubles analogues à ceux des patients, à savoir une pression artérielle plus élevée, une hyperkaliémie et une acidose métabolique hyperchlorémique. De ce fait, ce modèle est extrêmement utile, à la fois pour mieux comprendre la maladie, mais plus généralement la physiopathologie du néphron distal

et le rôle de WNK1 *in vivo*. Nous avons établi que la délétion hétérozygote du premier intron de *WNK1* entraîne une surexpression de l'isoforme L-WNK1 dans le DCT et le CNT. Cette seule modification d'expression entraîne une activation très nette du co-transporteur NCC. L'inhibition de NCC par les diurétiques thiazidiques corrige le phénotype.

Génération et étude d'un modèle murin d'HHF : perspectives

Ce modèle va permettre, au-delà de cette description initiale, d'étudier de nombreux aspects physiopathologiques de l'HHF. Nous souhaitons ainsi établir le lien entre WNK1 et NCC : s'agit-il d'une activation directe même si une telle possibilité n'a jamais été démontrée *in vitro* ? Ou bien l'activation de NCC par L-WNK1 est-elle indirecte, *via* SPAK et/ou WNK4 ? D'une part, nous étudions l'expression et la phosphorylation de SPAK dans le DCT et cTAL par immunohistochimie. D'autre part, nous générons actuellement, par croisement de notre modèle murin avec des souris porteuses d'une mutation inactivatrice de WNK4 [131], un nouveau modèle qui permettra pour la première fois de tester *in vivo* le rôle de WNK4 dans l'activation de NCC par WNK1.

Les autres questions que ce modèle murin permettra d'aborder sont multiples. Les troubles métaboliques associés à l'hypertension dans l'HHF sont incomplètement élucidés. C'est notamment le cas de l'hyperkaliémie. Le mécanisme classiquement retenu pour expliquer l'hyperkaliémie est qu'une moindre quantité de sodium serait délivrée aux segments d'aval suite à l'activation de NCC, d'où une moindre activité d'ENaC et une moindre éléctronégativité luminale, moteur de la sécrétion tubulaire distale de potassium par ROMK. Cependant, l'activité diminuée d'ENaC n'a jamais été démontrée, et au contraire les souris $WNK4^{+/PHA2}$ auraient une activité accrue du canal ENaC [129]. Nous n'avons pas non plus mis en évidence une expression ou une activité diminuée de ENaC, ce qui est par ailleurs difficile à envisager en présence d'un niveau d'aldostérone plus élevé que chez les souris contrôles. Un point débattu est de savoir si l'hyperkaliémie de l'HHF est uniquement

secondaire à l'activation de NCC, comme le suggère sa correction par les diurétiques thiazidiques, ou si elle est partiellement induite par une action directe des WNKs sur l'activité de ROMK, démontrée par de nombreuses études *in vitro* [27,84,86,88]. Nous avons débuté une étude du métabolisme potassique sur notre modèle murin, en particulier en soumettant les souris à deux semaines de régime riche en potassium (4% K^+). Nous étudions actuellement l'expression protéique des canaux ROMK et des trois sous-unités des canaux BKCa sur les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$, sur deux séries de souris : soumises à un régime normal ou après deux semaines de régime riche en potassium. Notons un résultat préliminaire particulièrement intéressant : contrairement aux souris transgéniques HHF par mutation de *WNK4* [128], qui voient leur kaliémie augmenter drastiquement après une semaine de régime riche en potassium (5% K^+), les souris *WNK1*$^{+/FHHt}$ maintiennent une kaliémie stable sous régime riche en potassium. On peut faire l'hypothèse que la diurèse massive induite par ce régime active les canaux BKCa sensibles au flux. Ces résultats sont cependant très préliminaires et nous ne pouvons pas à ce stade proposer de mécanisme explicatif sur les troubles de la régulation potassique associés à l'HHF.

Un autre trouble métabolique de l'HHF peu étudié et inexpliqué est l'hypercalciurie. Nous avons pu établir que l'hypercalciurie est probablement en rapport avec un défaut primitif de réabsorption tubulaire de calcium. En effet, elle persiste sous régime sans calcium, éliminant une étiologie digestive, et il n'y a pas d'ostéoporose, plaidant en défaveur d'un trouble osseux au premier plan. Les marqueurs de remodelage osseux et le calcitriol restent à doser. Nos premières explorations suggèrent que l'hypercalciurie pourrait être en rapport avec une activité diminuée de NKCC2 et donc un transport passif de calcium diminué dans l'anse de Henlé, mais cette hypothèse est à confirmer, idéalement par une étude directe du transport de calcium dans ce segment sur tubules microperfusés.

S'il autorise une meilleure compréhension des troubles métaboliques de l'HHF, notre modèle est en outre un outil très intéressant pour étudier les voies de signalisation impliquant WNK1. Si SPAK et OSR1 ont été identifiés depuis plusieurs années et étudiés en détails, les cibles de WNK1 *in vivo* sont très probablement beaucoup plus nombreuses. Nous allons donc débuter à très court terme des études de protéomique et phosphoprotéomique en collaboration avec l'équipe du Dr Jesse Rinehart à l'Université de Yale (New Haven, USA). Cette étude sera faite sur des tubules isolés et non sur du rein total, afin d'en optimiser la résolution.

En conclusion, mon travail de thèse a permis de mieux connaître la kinase WNK1, en particulier l'ensemble des isoformes qu'elle génère et leur profil d'expression chez l'homme et la souris. Il a également permis de mieux comprendre la physiopathologie de l'HHF par mutation de *WNK1*. Les perspectives ouvertes par ces travaux sont grandes et le modèle murin sera un outil d'étude précieux dans les années qui viennent.

Le très grand intérêt international suscité par les kinases WNK1 et WNK4 fait souvent oublier que leurs mutations n'expliquent que dans une très faible minorité des cas d'HHF, la plupart des cas restant jusqu'à présent génétiquement inexpliqués. Au début de l'année 2012, une nouvelle page s'est ouverte avec la découverte de deux nouveaux gènes en cause dans l'HHF, qui expliquent à eux deux plus de la moitié des cas : Kelch-like 3 (*KLHL3*) et cullin3 (*CUL3*). Notons que certaines mutations de *KLHL3* sont de transmission autosomique récessive et que les mutations *CUL3* sont fréquemment *de novo*. Les deux protéines appartiennent à un complexe d'ubiquitination qui pourrait modifier l'expression à la membrane de NCC en régulant sa dégradation. Ces travaux viennent donc ajouter deux nouveaux acteurs clés dans les voies de régulation des transports ioniques du néphron distal et ouvrir ainsi de nouvelles perspectives physiopathologiques et thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Achard JM, Disse-Nicodeme S, Fiquet-Kempf B, Jeunemaitre X (2001) Phenotypic and genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension (Gordon syndrome). Clin Exp Pharmacol Physiol 28: 1048-1052.

2. Gordon RD (1986) The syndrome of hypertension and hyperkalaemia with normal GFR. A unique pathophysiological mechanism for hypertension? Clin Exp Pharmacol Physiol 13: 329-333.

3. Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM, Fournier A, et al. (2000) A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. Am J Hum Genet 67: 302-310.

4. Mayan H, Munter G, Shaharabany M, Mouallem M, Pauzner R, et al. (2004) Hypercalciuria in familial hyperkalemia and hypertension accompanies hyperkalemia and precedes hypertension: description of a large family with the Q565E WNK4 mutation. J Clin Endocrinol Metab 89: 4025-4030.

5. Paver WK, Pauline GJ (1964) Hypertension and Hyperpotassaemia without Renal Disease in a Young Male. Med J Aust 2: 305-306.

6. Arnold JE, Healy JK (1969) Hyperkalemia, hypertension and systemic acidosis without renal failure associated with a tubular defect in potassium excretion. Am J Med 47: 461-472.

7. Schambelan M, Sebastian A, Rector FC, Jr. (1981) Mineralocorticoid-resistant renal hyperkalemia without salt wasting (type II pseudohypoaldosteronism): role of increased renal chloride reabsorption. Kidney Int 19: 716-727.

8. Take C, Ikeda K, Kurasawa T, Kurokawa K (1991) Increased chloride reabsorption as an inherited renal tubular defect in familial type II pseudohypoaldosteronism. N Engl J Med 324: 472-476.

9. Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, et al. (1997) Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. Nat Genet 16: 202-205.

10. Disse-Nicodeme S, Desitter I, Fiquet-Kempf B, Houot AM, Stern N, et al. (2001) Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. J Hypertens 19: 1957-1964.

11. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, et al. (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. Science 293: 1107-1112.

12. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, et al. (2000) WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. J Biol Chem 275: 16795-16801.

13. Golbang AP, Murthy M, Hamad A, Liu CH, Cope G, et al. (2005) A new kindred with pseudohypoaldosteronism type II and a novel mutation (564D>H) in the acidic motif of the WNK4 gene. Hypertension 46: 295-300.

14. Gong H, Tang Z, Yang Y, Sun L, Zhang W, et al. (2008) A patient with pseudohypoaldosteronism type II caused by a novel mutation in WNK4 gene. Endocrine 33: 230-234.

15. Zhang C, Wang Z, Xie J, Yan F, Wang W, et al. (2011) Identification of a Novel WNK4 Mutation in Chinese Patients with Pseudohypoaldosteronism Type II. Nephron Physiol 118: p53-61.

16. Farfel A, Mayan H, Melnikov S, Holtzman EJ, Pinhas-Hamiel O, et al. (2011) Effect of age and affection status on blood pressure, serum potassium and stature in familial hyperkalaemia and hypertension. Nephrol Dial Transplant 26: 1547-1553.

17. Mayan H, Melnikov S, Novikov I, Holtzman EJ, Farfel Z (2009) Familial hyperkalemia and hypertension: pathogenetic insights based on lithium clearance. J Clin Endocrinol Metab 94: 3010-3016.

18. Mayan H, Mouallem M, Shaharabany M, Pauzner R, Farfel Z (2005) Resolution of hypertension during pregnancy in familial hyperkalemia and hypertension with the WNK4 Q565E mutation. Am J Obstet Gynecol 192: 598-603.

19. Mayan H, Vered I, Mouallem M, Tzadok-Witkon M, Pauzner R, et al. (2002) Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. J Clin Endocrinol Metab 87: 3248-3254.

20. Achard JM, Warnock DG, Disse-Nicodeme S, Fiquet-Kempf B, Corvol P, et al. (2003) Familial hyperkalemic hypertension: phenotypic analysis in a large family with the WNK1 deletion mutation. Am J Med 114: 495-498.

21. Boyden LM, Choi M, Choate KA, Nelson-Williams CJ, Farhi A, et al. (2012) Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. Nature 482: 98-102.

22. Louis-Dit-Picard H, Barc J, Trujillano D, Miserey-Lenkei S, Bouatia-Naji N, et al. (2012) KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. Nat Genet 44: 456-460.

23. Verissimo F, Jordan P (2001) WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. Oncogene 20: 5562-5569.

24. Xu BE, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ, et al. (2002) Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. J Biol Chem 277: 48456-48462.

25. Zagorska A, Pozo-Guisado E, Boudeau J, Vitari AC, Rafiqi FH, et al. (2007) Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. J Cell Biol 176: 89-100.

26. Min X, Lee BH, Cobb MH, Goldsmith EJ (2004) Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. Structure 12: 1303-1311.

27. Murthy M, Cope G, O'Shaughnessy KM (2008) The acidic motif of WNK4 is crucial for its interaction with the K channel ROMK. Biochem Biophys Res Commun 375: 651-654.

28. Wang Z, Yang CL, Ellison DH (2004) Comparison of WNK4 and WNK1 kinase and inhibiting activities. Biochem Biophys Res Commun 317: 939-944.

29. Woolfson DN (2005) The design of coiled-coil structures and assemblies. Adv Protein Chem 70: 79-112.

30. Salah Z, Alian A, Aqeilan RI (2012) WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. Front Biosci 17: 331-348.

31. Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, et al. (2005) Properties of WNK1 and implications for other family members. J Biol Chem 280: 26653-26658.

32. Delaloy C, Lu J, Houot AM, Disse-Nicodeme S, Gasc JM, et al. (2003) Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. Mol Cell Biol 23: 9208-9221.

33. O'Reilly M, Marshall E, Speirs HJ, Brown RW (2003) WNK1, a gene within a novel blood pressure control pathway, tissue-specifically generates radically different isoforms with and without a kinase domain. J Am Soc Nephrol 14: 2447-2456.

34. Xu Q, Modrek B, Lee C (2002) Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. Nucleic Acids Res 30: 3754-3766.

35. Delaloy C, Hadchouel J, Imbert-Teboul M, Clemessy M, Houot AM, et al. (2006) Cardiovascular expression of the mouse WNK1 gene during development and adulthood revealed by a BAC reporter assay. Am J Pathol 169: 105-118.

36. Danziger N, Prkachin KM, Willer JC (2006) Is pain the price of empathy? The perception of others' pain in patients with congenital insensitivity to pain. Brain 129: 2494-2507.

37. Shekarabi M, Girard N, Riviere JB, Dion P, Houle M, et al. (2008) Mutations in the nervous system--specific HSN2 exon of WNK1 cause hereditary sensory neuropathy type II. J Clin Invest 118: 2496-2505.

38. Loggia ML, Bushnell MC, Tetreault M, Thiffault I, Bherer C, et al. (2009) Carriers of recessive WNK1/HSN2 mutations for hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 (HSAN2) are more sensitive to thermal stimuli. J Neurosci 29: 2162-2166.

39. Sun X, Gao L, Yu RK, Zeng G (2006) Down-regulation of WNK1 protein kinase in neural progenitor cells suppresses cell proliferation and migration. J Neurochem 99: 1114-1121.

40. Hong C, Moorefield KS, Jun P, Aldape KD, Kharbanda S, et al. (2007) Epigenome scans and cancer genome sequencing converge on WNK2, a kinase-independent suppressor of cell growth. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 10974-10979.

41. Jun P, Hong C, Lal A, Wong JM, McDermott MW, et al. (2009) Epigenetic silencing of the kinase tumor suppressor WNK2 is tumor-type and tumor-grade specific. Neuro Oncol 11: 414-422.

42. Holden S, Cox J, Raymond FL (2004) Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). Gene 335: 109-119.

43. Glover M, Zuber AM, O'Shaughnessy KM (2009) Renal and brain isoforms of WNK3 have opposite effects on NCCT expression. J Am Soc Nephrol 20: 1314-1322.

44. Verissimo F, Silva E, Morris JD, Pepperkok R, Jordan P (2006) Protein kinase WNK3 increases cell survival in a caspase-3-dependent pathway. Oncogene 25: 4172-4182.

45. Gagnon KB, England R, Delpire E (2006) Volume sensitivity of cation-Cl- cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. Am J Physiol Cell Physiol 290: C134-142.

46. Ahlstrom R, Yu AS (2009) Characterization of the kinase activity of a WNK4 protein complex. Am J Physiol Renal Physiol 297: F685-692.

47. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR (2005) The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. Biochem J 391: 17-24.

48. Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, et al. (2004) Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4690-4694.

49. Choate KA, Kahle KT, Wilson FH, Nelson-Williams C, Lifton RP (2003) WNK1, a kinase mutated in inherited hypertension with hyperkalemia, localizes to diverse Cl- -transporting epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 663-668.

50. Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, et al. (2003) Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 680-684.

51. Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, et al. (2004) WNK4 regulates apical and basolateral Cl- flux in extrarenal epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 2064-2069.

52. Ohno M, Uchida K, Ohashi T, Nitta K, Ohta A, et al. (2011) Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. Histochem Cell Biol 136: 25-35.

53. Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, et al. (2005) WNK3 modulates transport of Cl- in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 16783-16788.

54. Rinehart J, Kahle KT, de Los Heros P, Vazquez N, Meade P, et al. (2005) WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl- cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 16777-16782.

55. Meneton P, Loffing J, Warnock DG (2004) Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. Am J Physiol Renal Physiol 287: F593-601.

56. McCormick JA, Yang CL, Ellison DH (2008) WNK kinases and renal sodium transport in health and disease: an integrated view. Hypertension 51: 588-596.

57. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, et al. (1994) Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. J Biol Chem 269: 17713-17722.

58. Gamba G (2009) The thiazide-sensitive Na+-Cl- cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. Am J Physiol Renal Physiol 297: F838-848.

59. Sandberg MB, Maunsbach AB, McDonough AA (2006) Redistribution of distal tubule Na+-Cl- cotransporter (NCC) in response to a high-salt diet. Am J Physiol Renal Physiol 291: F503-508.

60. Vallon V, Schroth J, Lang F, Kuhl D, Uchida S (2009) Expression and phosphorylation of the Na+-Cl- cotransporter NCC in vivo is regulated by dietary salt, potassium, and SGK1. Am J Physiol Renal Physiol 297: F704-712.

61. Frindt G, Houde V, Palmer LG (2011) Conservation of Na+ vs. K+ by the rat cortical collecting duct. Am J Physiol Renal Physiol 301: F14-20.

62. Frindt G, Palmer LG (2010) Effects of dietary K on cell-surface expression of renal ion channels and transporters. Am J Physiol Renal Physiol 299: F890-897.

63. Sandberg MB, Riquier AD, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA, Maunsbach AB (2007) ANG II provokes acute trafficking of distal tubule Na+-Cl(-) cotransporter to apical membrane. Am J Physiol Renal Physiol 293: F662-669.

64. Velazquez H, Bartiss A, Bernstein P, Ellison DH (1996) Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by rat renal distal tubules. Am J Physiol 270: F211-219.

65. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, et al. (1996) Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. Nat Genet 12: 24-30.

66. Mayan H, Attar-Herzberg D, Shaharabany M, Holtzman EJ, Farfel Z (2008) Increased urinary Na-Cl cotransporter protein in familial hyperkalaemia and hypertension. Nephrol Dial Transplant 23: 492-496.

67. Eaton DC, Malik B, Bao HF, Yu L, Jain L (2010) Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. Proc Am Thorac Soc 7: 54-64.

68. Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, et al. (2002) Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. J Biol Chem 277: 37871-37880.

69. Amorim JB, Bailey MA, Musa-Aziz R, Giebisch G, Malnic G (2003) Role of luminal anion and pH in distal tubule potassium secretion. Am J Physiol Renal Physiol 284: F381-388.

70. Rodriguez-Soriano J, Vallo A, Dominguez MJ (1989) "Chloride-shunt" syndrome: an overlooked cause of renal hypercalciuria. Pediatr Nephrol 3: 113-121.

71. Cai H, Cebotaru V, Wang YH, Zhang XM, Cebotaru L, et al. (2006) WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. Kidney Int 69: 2162-2170.

72. Golbang AP, Cope G, Hamad A, Murthy M, Liu CH, et al. (2006) Regulation of the expression of the Na/Cl cotransporter by WNK4 and WNK1: evidence that accelerated dynamin-dependent endocytosis is not involved. Am J Physiol Renal Physiol 291: F1369-1376.

73. Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH (2003) WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. J Clin Invest 111: 1039-1045.

74. Yang SS, Yamauchi K, Rai T, Hiyama A, Sohara E, et al. (2005) Regulation of apical localization of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter by WNK4 in polarized epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 330: 410-414.

75. San-Cristobal P, Ponce-Coria J, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G (2008) WNK3 and WNK4 amino-terminal domain defines their effect on the renal Na+-Cl- cotransporter. Am J Physiol Renal Physiol 295: F1199-1206.

76. Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, Ellison DH (2005) Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. J Clin Invest 115: 1379-1387.

77. Subramanya AR, Liu J, Ellison DH, Wade JB, Welling PA (2009) WNK4 Diverts the Thiazide-sensitive NaCl Cotransporter to the Lysosome and Stimulates AP-3 Interaction. J Biol Chem 284: 18471-18480.

78. Zhou B, Zhuang J, Gu D, Wang H, Cebotaru L, et al. (2010) WNK4 enhances the degradation of NCC through a sortilin-mediated lysosomal pathway. J Am Soc Nephrol 21: 82-92.

79. Zhou B, Wang D, Feng X, Zhang Y, Wang Y, et al. (2012) WNK4 inhibits NCC protein expression through MAPK ERK1/2 signaling pathway. Am J Physiol Renal Physiol 302: F533-539.

80. Cruz-Rangel S, Melo Z, Vazquez N, Meade P, Bobadilla NA, et al. (2011) Similar effects of all WNK3 variants on SLC12 cotransporters. Am J Physiol Cell Physiol 301: C601-608.

81. Yang CL, Zhu X, Ellison DH (2007) The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. J Clin Invest 117: 3403-3411.

82. Anselmo AN, Earnest S, Chen W, Juang YC, Kim SC, et al. (2006) WNK1 and OSR1 regulate the Na+, K+, 2Cl- cotransporter in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 10883-10888.

83. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, et al. (2005) WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. J Biol Chem 280: 42685-42693.

84. Cope G, Murthy M, Golbang AP, Hamad A, Liu CH, et al. (2006) WNK1 affects surface expression of the ROMK potassium channel independent of WNK4. J Am Soc Nephrol 17: 1867-1874.

85. Lazrak A, Liu Z, Huang CL (2006) Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 1615-1620.

86. Wade JB, Fang L, Liu J, Li D, Yang CL, et al. (2006) WNK1 kinase isoform switch regulates renal potassium excretion. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 8558-8563.

87. He G, Wang HR, Huang SK, Huang CL (2007) Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1. J Clin Invest 117: 1078-1087.

88. Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, et al. (2003) WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K+ secretion. Nat Genet 35: 372-376.

89. Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, MacGregor GG, Wilson FH, et al. (2006) WNK3, a kinase related to genes mutated in hereditary hypertension with hyperkalaemia, regulates the K+ channel ROMK1 (Kir1.1). J Physiol 571: 275-286.

90. Wang HR, Liu Z, Huang CL (2008) Domains of WNK1 kinase in the regulation of ROMK1. Am J Physiol Renal Physiol 295: F438-445.

91. Zeng WZ, Babich V, Ortega B, Quigley R, White SJ, et al. (2002) Evidence for endocytosis of ROMK potassium channel via clathrin-coated vesicles. Am J Physiol Renal Physiol 283: F630-639.

92. Liu Z, Wang HR, Huang CL (2009) Regulation of ROMK channel and K+ homeostasis by kidney-specific WNK1 kinase. J Biol Chem 284: 12198-12206.

93. Xu BE, Stippec S, Chu PY, Lazrak A, Li XJ, et al. (2005) WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 10315-10320.

94. Naray-Fejes-Toth A, Snyder PM, Fejes-Toth G (2004) The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na+ transport. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 17434-17439.

95. Ring AM, Cheng SX, Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, et al. (2007) WNK4 regulates activity of the epithelial Na+ channel in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 4020-4024.

96. Kahle KT, Macgregor GG, Wilson FH, Van Hoek AN, Brown D, et al. (2004) Paracellular Cl- permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 14877-14882.

97. Ohta A, Yang SS, Rai T, Chiga M, Sasaki S, et al. (2006) Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. Biochem Biophys Res Commun 349: 804-808.

98. Tatum R, Zhang Y, Lu Q, Kim K, Jeansonne BG, et al. (2007) WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl(-) permeability. FEBS Lett 581: 3887-3891.

99. Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, et al. (2009) Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. Cell 138: 525-536.

100. Adragna NC, Di Fulvio M, Lauf PK (2004) Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. J Membr Biol 201: 109-137.

101. Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, et al. (2007) WNK4 kinase is a negative regulator of K+-Cl- cotransporters. Am J Physiol Renal Physiol 292: F1197-1207.

102. de Los Heros P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, et al. (2006) WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 1976-1981.

103. Russell JM (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. Physiol Rev 80: 211-276.

104. Ponce-Coria J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, et al. (2008) Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 8458-8463.

105. Fu Y, Subramanya A, Rozansky D, Cohen DM (2006) WNK kinases influence TRPV4 channel function and localization. Am J Physiol Renal Physiol 290: F1305-1314.

106. Jiang Y, Cong P, Williams SR, Zhang W, Na T, et al. (2008) WNK4 regulates the secretory pathway via which TRPV5 is targeted to the plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun 375: 225-229.

107. Jiang Y, Ferguson WB, Peng JB (2007) WNK4 enhances TRPV5-mediated calcium transport: potential role in hypercalciuria of familial hyperkalemic hypertension caused by gene mutation of WNK4. Am J Physiol Renal Physiol 292: F545-554.

108. Zhang W, Na T, Peng JB (2008) WNK3 positively regulates epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6 via a kinase-dependent pathway. Am J Physiol Renal Physiol 295: F1472-1484.

109. Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, et al. (2006) Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. Biochem J 397: 223-231.

110. Yang SS, Lo YF, Yu IS, Lin SW, Chang TH, et al. (2010) Generation and analysis of the thiazide-sensitive Na+ -Cl- cotransporter (Ncc/Slc12a3) Ser707X knockin mouse as a model of Gitelman syndrome. Hum Mutat 31: 1304-1315.

111. Rafiqi FH, Zuber AM, Glover M, Richardson C, Fleming S, et al. (2010) Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. EMBO Mol Med 2: 63-75.

112. Choe KP, Strange K (2007) Evolutionarily conserved WNK and Ste20 kinases are essential for acute volume recovery and survival after hypertonic shrinkage in Caenorhabditis elegans. Am J Physiol Cell Physiol 293: C915-927.

113. Gagnon KB, England R, Delpire E (2006) Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl cotransporter. Mol Cell Biol 26: 689-698.

114. Piechotta K, Garbarini N, England R, Delpire E (2003) Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na+-K+-2Cl- cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. J Biol Chem 278: 52848-52856.

115. Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HK, Moleleki N, Vandewalle A, et al. (2008) Activation of the thiazide-sensitive Na+-Cl- cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. J Cell Sci 121: 675-684.

116. Yan Y, Merlin D (2008) Ste20-related proline/alanine-rich kinase: a novel regulator of intestinal inflammation. World J Gastroenterol 14: 6115-6121.

117. Richardson C, Sakamoto K, de los Heros P, Deak M, Campbell DG, et al. (2011) Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. J Cell Sci 124: 789-800.

118. Filippi BM, de los Heros P, Mehellou Y, Navratilova I, Gourlay R, et al. (2011) MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases. EMBO J 30: 1730-1741.

119. Dimke H, San-Cristobal P, de Graaf M, Lenders JW, Deinum J, et al. (2011) gamma-Adducin stimulates the thiazide-sensitive NaCl cotransporter. J Am Soc Nephrol 22: 508-517.

120. Shao L, Ren H, Wang W, Zhang W, Feng X, et al. (2008) Novel SLC12A3 mutations in Chinese patients with Gitelman's syndrome. Nephron Physiol 108: p29-36.

121. Hisamoto N, Moriguchi T, Urushiyama S, Mitani S, Shibuya H, et al. (2008) Caenorhabditis elegans WNK-STE20 pathway regulates tube formation by modulating ClC channel activity. EMBO Rep 9: 70-75.

122. Hadchouel J, Delaloy C, Faure S, Achard JM, Jeunemaitre X (2006) Familial hyperkalemic hypertension. J Am Soc Nephrol 17: 208-217.

123. Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, Richter LJ, Piggott J, et al. (2003) Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 14109-14114.

124. Bergaya S, Faure S, Baudrie V, Rio M, Escoubet B, et al. (2011) WNK1 Regulates Vasoconstriction and Blood Pressure Response to {alpha}1-Adrenergic Stimulation in Mice. Hypertension.

125. Xie J, Wu T, Xu K, Huang IK, Cleaver O, et al. (2009) Endothelial-Specific Expression of WNK1 Kinase Is Essential for Angiogenesis and Heart Development in Mice. Am J Pathol.

126. Liu Z, Xie J, Wu T, Truong T, Auchus RJ, et al. (2011) Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models. Hum Mol Genet 20: 855-866.

127. Hadchouel J, Soukaseum C, Busst C, Zhou XO, Baudrie V, et al. (2010) Decreased ENaC expression compensates the increased NCC activity following inactivation of the kidney-specific isoform of WNK1 and prevents hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 18109-18114.

128. Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, et al. (2006) Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. Nat Genet 38: 1124-1132.

129. Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, et al. (2007) Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. Cell Metab 5: 331-344.

130. Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, et al. (2008) Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. Kidney Int 74: 1403-1409.

131. Castaneda-Bueno M, Cervantes-Perez LG, Vazquez N, Uribe N, Kantesaria S, et al. (2012) Activation of the renal Na+:Cl- cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 7929-7934.

132. McCormick JA, Mutig K, Nelson JH, Saritas T, Hoorn EJ, et al. (2011) A SPAK isoform switch modulates renal salt transport and blood pressure. Cell Metab 14: 352-364.

133. Chiga M, Rafiqi FH, Alessi DR, Sohara E, Ohta A, et al. (2011) Phenotypes of pseudohypoaldosteronism type II caused by the WNK4 D561A missense mutation are dependent on the WNK-OSR1/SPAK kinase cascade. J Cell Sci 124: 1391-1395.

134. Yang SS, Hsu YJ, Chiga M, Rai T, Sasaki S, et al. (2010) Mechanisms for hypercalciuria in pseudohypoaldosteronism type II-causing WNK4 knock-in mice. Endocrinology 151: 1829-1836.

135. Ohta A, Rai T, Yui N, Chiga M, Yang SS, et al. (2009) Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion, and lowers blood pressure. Hum Mol Genet.

136. Yang SS, Lo YF, Wu CC, Lin SW, Yeh CJ, et al. (2010) SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. J Am Soc Nephrol 21: 1868-1877.

137. Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, et al. (2011) Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. Clin Exp Nephrol 15: 195-202.

138. O'Reilly M, Marshall E, Macgillivray T, Mittal M, Xue W, et al. (2006) Dietary electrolyte-driven responses in the renal WNK kinase pathway in vivo. J Am Soc Nephrol 17: 2402-2413.

139. Elvira-Matelot E, Zhou XO, Farman N, Beaurain G, Henrion-Caude A, et al. (2010) Regulation of WNK1 expression by miR-192 and aldosterone. J Am Soc Nephrol 21: 1724-1731.

140. van der Lubbe N, Lim CH, Meima ME, van Veghel R, Rosenbaek LL, et al. (2012) Aldosterone does not require angiotensin II to activate NCC through a WNK4-SPAK-dependent pathway. Pflugers Arch 463: 853-863.

141. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA (1999) Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. J Clin Invest 104: R19-23.

142. Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, et al. (2007) An SGK1 site in WNK4 regulates Na+ channel and K+ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K+ homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 4025-4029.

143. Rozansky DJ, Cornwall T, Subramanya AR, Rogers S, Yang YF, et al. (2009) Aldosterone mediates activation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. J Clin Invest.

144. Saccomani G, Mitchell KD, Navar LG (1990) Angiotensin II stimulation of Na(+)-H+ exchange in proximal tubule cells. Am J Physiol 258: F1188-1195.

145. San-Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, et al. (2009) Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 4384-4389.

146. van der Lubbe N, Lim CH, Fenton RA, Meima ME, Jan Danser AH, et al. (2011) Angiotensin II induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter independent of aldosterone. Kidney Int 79: 66-76.

147. Talati G, Ohta A, Rai T, Sohara E, Naito S, et al. (2010) Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and in vivo mouse kidney. Biochem Biophys Res Commun 393: 844-848.

148. Vitari AC, Deak M, Collins BJ, Morrice N, Prescott AR, et al. (2004) WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. Biochem J 378: 257-268.

149. Jiang ZY, Zhou QL, Holik J, Patel S, Leszyk J, et al. (2005) Identification of WNK1 as a substrate of Akt/protein kinase B and a negative regulator of insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 cells. J Biol Chem 280: 21622-21628.

150. Xu BE, Stippec S, Lazrak A, Huang CL, Cobb MH (2005) WNK1 activates SGK1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and non-catalytic mechanism. J Biol Chem 280: 34218-34223.

151. Cheng CJ, Huang CL (2011) Activation of PI3-kinase stimulates endocytosis of ROMK via Akt1/SGK1-dependent phosphorylation of WNK1. J Am Soc Nephrol 22: 460-471.

152. Song J, Hu X, Riazi S, Tiwari S, Wade JB, et al. (2006) Regulation of blood pressure, the epithelial sodium channel (ENaC), and other key renal sodium transporters by chronic insulin infusion in rats. Am J Physiol Renal Physiol 290: F1055-1064.

153. Mu S, Shimosawa T, Ogura S, Wang H, Uetake Y, et al. (2011) Epigenetic modulation of the renal beta-adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. Nat Med 17: 573-580.

154. Li C, Li Y, Liu H, Sun Z, Lu J, et al. (2008) Glucocorticoid repression of human with-no-lysine (K) kinase-4 gene expression is mediated by the negative response elements in the promoter. J Mol Endocrinol 40: 3-12.

155. Delaloy C, Elvira-Matelot E, Clemessy M, Zhou XO, Imbert-Teboul M, et al. (2008) Deletion of WNK1 first intron results in misregulation of both isoforms in renal and extrarenal tissues. Hypertension 52: 1149-1154.

156. Leviel F, Hubner CA, Houillier P, Morla L, El Moghrabi S, et al. (2010) The Na+-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na+ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. J Clin Invest 120: 1627-1635.

157. Guyton AC (1991) Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. Science 252: 1813-1816.

158. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV, Jr., Scheel KW, Manning RD, Jr., et al. (1972) Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. Am J Med 52: 584-594.

159. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. Cell 104: 545-556.

160. Rossier BC (2003) Negative regulators of sodium transport in the kidney: key factors in understanding salt-sensitive hypertension? J Clin Invest 111: 947-950.

161. Osborn JW, Averina VA, Fink GD (2009) Current computational models do not reveal the importance of the nervous system in long-term control of arterial pressure. Exp Physiol 94: 389-396.

162. Huang CL, Kuo E, Toto RD (2008) WNK kinases and essential hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens 17: 133-137.

163. Kahle KT, Wilson FH, Lalioti M, Toka H, Qin H, et al. (2004) WNK kinases: molecular regulators of integrated epithelial ion transport. Curr Opin Nephrol Hypertens 13: 557-562.

164. Newhouse SJ, Wallace C, Dobson R, Mein C, Pembroke J, et al. (2005) Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension study. Hum Mol Genet 14: 1805-1814.

165. Han Y, Fan X, Sun K, Wang X, Wang Y, et al. (2011) Hypertension associated polymorphisms in WNK1/WNK4 are not associated with hydrochlorothiazide response. Clin Biochem.

166. Newhouse S, Farrall M, Wallace C, Hoti M, Burke B, et al. (2009) Polymorphisms in the WNK1 gene are associated with blood pressure variation and urinary potassium excretion. PLoS One 4: e5003.

167. Tobin MD, Raleigh SM, Newhouse S, Braund P, Bodycote C, et al. (2005) Association of WNK1 gene polymorphisms and haplotypes with ambulatory blood pressure in the general population. Circulation 112: 3423-3429.

168. Tobin MD, Timpson NJ, Wain LV, Ring S, Jones LR, et al. (2008) Common variation in the WNK1 gene and blood pressure in childhood: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. Hypertension 52: 974-979.

169. Osada Y, Miyauchi R, Goda T, Kasezawa N, Horiike H, et al. (2009) Variations in the WNK1 gene modulates the effect of dietary intake of sodium and potassium on blood pressure determination. J Hum Genet.

170. Kokubo Y, Kamide K, Inamoto N, Tanaka C, Banno M, et al. (2004) Identification of 108 SNPs in TSC, WNK1, and WNK4 and their association with hypertension in a Japanese general population. J Hum Genet 49: 507-515.

171. Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E (2005) WNK1 kinase polymorphism and blood pressure response to a thiazide diuretic. Hypertension 46: 758-765.

172. Erlich PM, Cui J, Chazaro I, Farrer LA, Baldwin CT, et al. (2003) Genetic variants of WNK4 in whites and African Americans with hypertension. Hypertension 41: 1191-1195.

173. Kamide K, Takiuchi S, Tanaka C, Miwa Y, Yoshii M, et al. (2004) Three novel missense mutations of WNK4, a kinase mutated in inherited hypertension, in Japanese hypertensives: implication of clinical phenotypes. Am J Hypertens 17: 446-449.

174. Sun ZJ, Li Y, Lu JY, Ding Q, Liang Y, et al. (2009) Association of Ala589Ser polymorphism of WNK4 gene with essential hypertension in a high-risk Chinese population. J Physiol Sci 59: 81-86.

175. Benjafield AV, Katyk K, Morris BJ (2003) Association of EDNRA, but not WNK4 or FKBP1B, polymorphisms with essential hypertension. Clin Genet 64: 433-438.

176. Speirs HJ, Morris BJ (2004) WNK4 intron 10 polymorphism is not associated with hypertension. Hypertension 43: 766-768.

177. Mendes AI, Mascarenhas MR, Matos S, Sousa I, Ferreira J, et al. (2011) A WNK4 gene variant relates to osteoporosis and not to hypertension in the Portuguese population. Mol Genet Metab 102: 465-469.

178. Manunta P, Lavery G, Lanzani C, Braund PS, Simonini M, et al. (2008) Physiological interaction between alpha-adducin and WNK1-NEDD4L pathways on sodium-related blood pressure regulation. Hypertension 52: 366-372.

179. Wang Y, O'Connell JR, McArdle PF, Wade JB, Dorff SE, et al. (2009) From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 226-231.

180. Coffman TM (2006) A WNK in the kidney controls blood pressure. Nat Genet 38: 1105-1106.

181. Yue P, Lin DH, Pan CY, Leng Q, Giebisch G, et al. (2009) Src family protein tyrosine kinase (PTK) modulates the effect of SGK1 and WNK4 on ROMK channels. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 15061-15066.

182. Yue P, Sun P, Lin DH, Pan C, Xing W, et al. (2011) Angiotensin II diminishes the effect of SGK1 on the WNK4-mediated inhibition of ROMK1 channels. Kidney Int 79: 423-431.

183. Schieffer B, Paxton WG, Chai Q, Marrero MB, Bernstein KE (1996) Angiotensin II controls p21ras activity via pp60c-src. J Biol Chem 271: 10329-10333.

184. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Zietse R, Unwin RJ, et al. (2012) Pathogenesis of calcineurin inhibitor-induced hypertension. J Nephrol 25: 269-275.

185. Melnikov S, Mayan H, Uchida S, Holtzman EJ, Farfel Z (2011) Cyclosporine metabolic side effects: association with the WNK4 system. Eur J Clin Invest.

186. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Furstenberg A, Yang CL, et al. (2011) The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. Nat Med 17: 1304-1309.

187. Xu BE, Lee BH, Min X, Lenertz L, Heise CJ, et al. (2005) WNK1: analysis of protein kinase structure, downstream targets, and potential roles in hypertension. Cell Res 15: 6-10.

188. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, et al. (2012) Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. Clin Exp Nephrol.

189. Boutros M, Kiger AA, Armknecht S, Kerr K, Hild M, et al. (2004) Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in Drosophila cells. Science 303: 832-835.

190. Bjorklund M, Taipale M, Varjosalo M, Saharinen J, Lahdenpera J, et al. (2006) Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. Nature 439: 1009-1013.

191. Conery AR, Harlow E (2010) High-throughput screens in diploid cells identify factors that contribute to the acquisition of chromosomal instability. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 15455-15460.

192. Tu SW, Bugde A, Luby-Phelps K, Cobb MH (2011) WNK1 is required for mitosis and abscission. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 1385-1390.

193. Xu BE, Stippec S, Lenertz L, Lee BH, Zhang W, et al. (2004) WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. J Biol Chem 279: 7826-7831.

194. Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, et al. (2003) Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. BMC Dev Biol 3: 11.

195. Moniz S, Jordan P (2010) Emerging roles for WNK kinases in cancer. Cell Mol Life Sci 67: 1265-1276.

196. Zeng G, Gao L, Suetake K, Joshi RM, Yu RK (2002) Variations in gene expression patterns correlated with phenotype of F-11 tumor cells whose expression of GD3-synthase is suppressed. Cancer Lett 178: 91-98.

197. Zeng G, Gao L, Xia T, Gu Y, Yu RK (2005) Expression of the mouse WNK1 gene in correlation with ganglioside GD3 and functional analysis of the mouse WNK1 promoter. Gene 344: 233-239.

198. Mendes AI, Matos P, Moniz S, Jordan P (2010) Protein kinase WNK1 promotes cell surface expression of glucose transporter GLUT1 by regulating a Tre-2/USP6-BUB2-Cdc16 domain family member 4 (TBC1D4)-Rab8A complex. J Biol Chem 285: 39117-39126.

199. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, et al. (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science 314: 268-274.

200. Stephens P, Edkins S, Davies H, Greenman C, Cox C, et al. (2005) A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. Nat Genet 37: 590-592.

201. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, et al. (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature 446: 153-158.

202. Davies H, Hunter C, Smith R, Stephens P, Greenman C, et al. (2005) Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. Cancer Res 65: 7591-7595.

203. Lee H, Caterina MJ (2005) TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. Pflugers Arch 451: 160-167.

204. Qiao Y, Liu X, Harvard C, Hildebrand MJ, Rajcan-Separovic E, et al. (2008) Autism-associated familial microdeletion of Xp11.22. Clin Genet 74: 134-144.

205. Zhang Z, Xu X, Zhang Y, Zhou J, Yu Z, et al. (2009) LINGO-1 interacts with WNK1 to regulate nogo-induced inhibition of neurite extension. J Biol Chem 284: 15717-15728.

206. Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, et al. (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nat Genet 25: 139-140.

207. Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P (1998) Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. Transgenic Res 7: 105-112.

208. Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ (2011) Molecular basis of epithelial Ca2+ and Mg2+ transport: insights from the TRP channel family. J Physiol 589: 1535-1542.

209. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2002) Molecular mechanism of active Ca2+ reabsorption in the distal nephron. Annu Rev Physiol 64: 529-549.

210. Semmekrot B, Monnens L, Theelen BG, Rascher W, Gabreels F, et al. (1987) The syndrome of hypertension and hyperkalaemia with normal glomerular function (Gordon's syndrome). A pathophysiological study. Pediatr Nephrol 1: 473-478.

211. Stratton JD, McNicholas TA, Farrington K (1998) Recurrent calcium stones in Gordon's syndrome. Br J Urol 82: 925.

212. Gordon RD, Hodsman GP (1986) The syndrome of hypertension and hyperkalaemia without renal failure: long term correction by thiazide diuretic. Scott Med J 31: 43-44.

213. Xiao P, Chen Y, Jiang H, Liu YZ, Pan F, et al. (2008) In vivo genome-wide expression study on human circulating B cells suggests a novel ESR1 and MAPK3 network for postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res 23: 644-654.

214. Dvorak MM, De Joussineau C, Carter DH, Pisitkun T, Knepper MA, et al. (2007) Thiazide diuretics directly induce osteoblast differentiation and mineralized nodule formation by interacting with a sodium chloride co-transporter in bone. J Am Soc Nephrol 18: 2509-2516.

215. Nijenhuis T, Vallon V, van der Kemp AW, Loffing J, Hoenderop JG, et al. (2005) Enhanced passive Ca2+ reabsorption and reduced Mg2+ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. J Clin Invest 115: 1651-1658.

Annexes : autres publications

Pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type 2 by *WNK1* mutations

Sonia Bergaya[a,b], *Emmanuelle Vidal-Petiot*[a,b], *Xavier Jeunemaitre*[a,b,c], *and Juliette Hadchouel*[a,b]

Purpose of review
Pseudohypoaldosteronism type 2 (PHA2) is a rare autosomal dominant form of human arterial hypertension, associated with hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis. *WNK1* and *WNK4* are two of the genes mutated in PHA2 patients. This review focuses on the mechanisms by which deletions of the first intron of *WNK1* found in PHA2 patients trigger the disease.

Recent findings
The *WNK1* gene gives rise to a ubiquitous kinase (L-WNK1) and to a shorter kinase-defective isoform, KS-WNK1 (for kidney-specific WNK1), expressed only in the distal convoluted tubule (DCT) and connecting tubule. *WNK1* first intron deletion leads to overexpression of L-WNK1 in the DCT and ubiquitous ectopic expression of KS-WNK1. The increased expression of L-WNK1 in the DCT results in increased activity of the Na–Cl cotransporter (NCC) and thus hypervolemia and hypertension. Contrarily, the mechanisms underlying the hyperkalemia and metabolic acidosis remain unclear.

Summary
As particularly small doses of thiazide diuretics, inhibitors of NCC activity, correct both the blood pressure and metabolic disorders in PHA2 patients, it was believed that increased NCC was directly responsible for all PHA2 features. Studies performed in mouse models of KS-WNK1 inactivation or WNK4-related PHA2, however, have revealed that the situation is much more complex.

Keywords
epithelial sodium channel, hypertension, Na–Cl cotransporter, renal outer medullary potassium channel

INTRODUCTION

Secretion of the mineralocorticoid hormone aldosterone is physiologically stimulated by changes in blood volume and pressure, via angiotensin II, and changes in plasma K^+, directly sensed by K^+ channels expressed in the adrenal cortex. In the first case, aldosterone promotes Na^+ reabsorption without altering K^+ balance while it stimulates K^+ secretion but does not affect Na^+ homeostasis following an increase in plasma K^+. Pseudohypoaldosteronism type 2 (PHA2), also known as Gordon's syndrome or familial hyperkalemic hypertension, is a rare autosomal dominant disease which associates net positive Na^+ balance with renal K^+ retention as patients display hypertension, hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis [1]. These features are intriguing as hyperaldosteronism usually leads to increased Na^+ reabsorption and K^+ secretion, whereas hypoaldosteronism results in hypovolemia and hyperkalemia. Thus, identification of the pathophysiological mechanisms leading to the development of PHA2 should contribute to a better understanding of the so called 'aldosterone paradox' [2].

Two of the genes responsible for PHA2, *WNK1* and *WNK4*, were identified 10 years ago [3]. They encode two of the four members of the WNK [with no lysine (K)] family of serine–threonine kinases. The discovery of these mutations in a renal form of hypertension was unexpected as WNK1 had been identified only one year before through a search for new kinases of the MEK (MAPK or mitogen activated

[a]INSERM UMRS 970, Paris Cardiovascular Research Center (PARCC), [b]University Paris-Descartes and [c]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département de Génétique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Correspondence to Juliette Hadchouel, INSERM U970, 56 rue Leblanc, F-75015 Paris, France. Tel: +33 1 53 98 80 73; fax: +33 1 53 98 79 53; e-mail: juliette.hadchouel@inserm.fr

Curr Opin Nephrol Hypertens 2012, 21:39–45
DOI:10.1097/MNH.0b013e32834d2fde

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

KEY POINTS

- WNK1 is a serine–threonine kinase, which regulates Na^+, K^+ and Cl^- handling in the distal nephron.
- Large deletions of the first intron of the *WNK1* gene lead to overexpression of L-WNK1 in the distal convoluted tubule, thereby triggering the development of pseudohypoaldosteronism type 2 (PHA2).
- Hypertension in PHA2 patients is caused by increased activity of the thiazide-sensitive Na–Cl cotransporter, following L-WNK1 activation.
- The mechanisms leading to hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis in PHA2 patients still remain to be defined.

protein kinase kinase) family in the rat brain [4] or by the 'differential display' technique in colorectal cancer cell lines [5].

This review focuses on WNK1. We will first describe the consequences of *WNK1* PHA2 mutations on the expression of the kinase and then try to analyse how this deregulation of WNK1 expression could trigger the disease.

WNK1 PSEUDOHYPOALDOSTERONISM TYPE 2 MUTATIONS MODIFY ITS PATTERN OF EXPRESSION

While the mutations found in *WNK4* are missense mutations, those found in *WNK1* do not affect the coding sequence. They are large deletions of the first intron of *WNK1* (22 and 41 kbp of a 60 kbp intron; Fig. 1a). Quantitative RT-PCR showed that WNK1 mRNA level is increased in the leucocytes of PHA2 patients when compared with controls [3].

The *WNK1* gene gives rise to several isoforms through the use of alternative promoters and several alternatively spliced exons [6,7]. The long isoform (L-WNK1), containing the whole kinase domain, is expressed ubiquitously, even in the nephron, wherein it is found at a low level in all segments. A shorter isoform, lacking kinase activity, is expressed in the distal convoluted tubule (DCT) and, to a lesser extent, in the connecting tubule (CNT), and is therefore called KS-WNK1, for kidney-specific WNK1 (Fig. 1a).

The clinical investigations could not allow the determination of which isoform is overexpressed and where. We therefore generated a mouse model bearing a transgene containing the mouse *WNK1* gene deleted from the first intron and two reporter genes to monitor the changes in expression of L-WNK1 and KS-WNK1 [8]. Deletion of *WNK1* first intron leads to a three-fold increase in L-WNK1 expression in the DCT and to KS-WNK1 ubiquitous expression, albeit at low levels.

The intronic deletion therefore induces a 'KS-WNK1-like' pattern of expression for L-WNK1, in addition to its normal expression, and *vice versa*. As depicted in Fig. 1a, KS-WNK1 transcription starts just upstream of exon 4a, specific to KS-WNK1 and located in intron 4. L-WNK1 (pP, proximal promoter) and KS-WNK1 promoters (rP, renal promoter) are therefore located upstream and downstream of intron 1, respectively. The deregulation of WNK1 isoforms expression could thus be explained by the deletion of one or several intronic insulators. An insulator is defined as a sequence that ensures position-independent transcription by insulating the expression of a gene from the effect of neighbouring sequences. In the case of *WNK1*, an insulator would prevent interaction between L-WNK1 ubiquitous regulatory elements and KS-WNK1 DCT-specific ones (Fig. 1b). We identified one insulator (C5, Fig. 1b) whose deletion could lead to an interaction between regulatory modules controlling L-WNK1 and KS-WNK1 expression, resulting in L-WNK1 overexpression in the DCT-CNT and ubiquitous expression of KS-WNK1.

It is important to note that, in the DCT of control mice, KS-WNK1 transcript level is 80 times that of L-WNK1. Some studies have suggested that the L-WNK1-to-KS-WNK1 ratio could play a crucial role in the regulation of ion transport by WNKs in the DCT. However, in our mouse model, and probably in PHA2 individuals, KS-WNK1 expression remains much higher than that of L-WNK1 in the DCT. We are currently unable to explain or understand the massive expression of KS-WNK1 in the DCT. One possibility is that it interacts with molecules other than L-WNK1. As detailed below, KS-WNK1 acts as a dominant-negative of L-WNK1 [9], and one study showed that it could also interfere with WNK3 [10] (Fig. 2). We therefore believe that the net increase in L-WNK1 expression in the DCT underlies PHA2. There is currently no animal model of WNK1-related PHA2 available, but in-vitro studies support this hypothesis.

ACTIVATION OF Na–Cl COTRANSPORTER AND HYPERTENSION IN PSEUDOHYPOALDOSTERONISM TYPE 2

One defining feature of PHA2 patients is their sensitivity to small doses of thiazide diuretics, which correct both the blood pressure (BP) and metabolic disorders. Thiazide diuretics block the activity of the Na–Cl cotransporter (NCC), specifically expressed in the DCT. In addition, PHA2 is the mirror image of Gitelman syndrome, which features salt wasting,

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

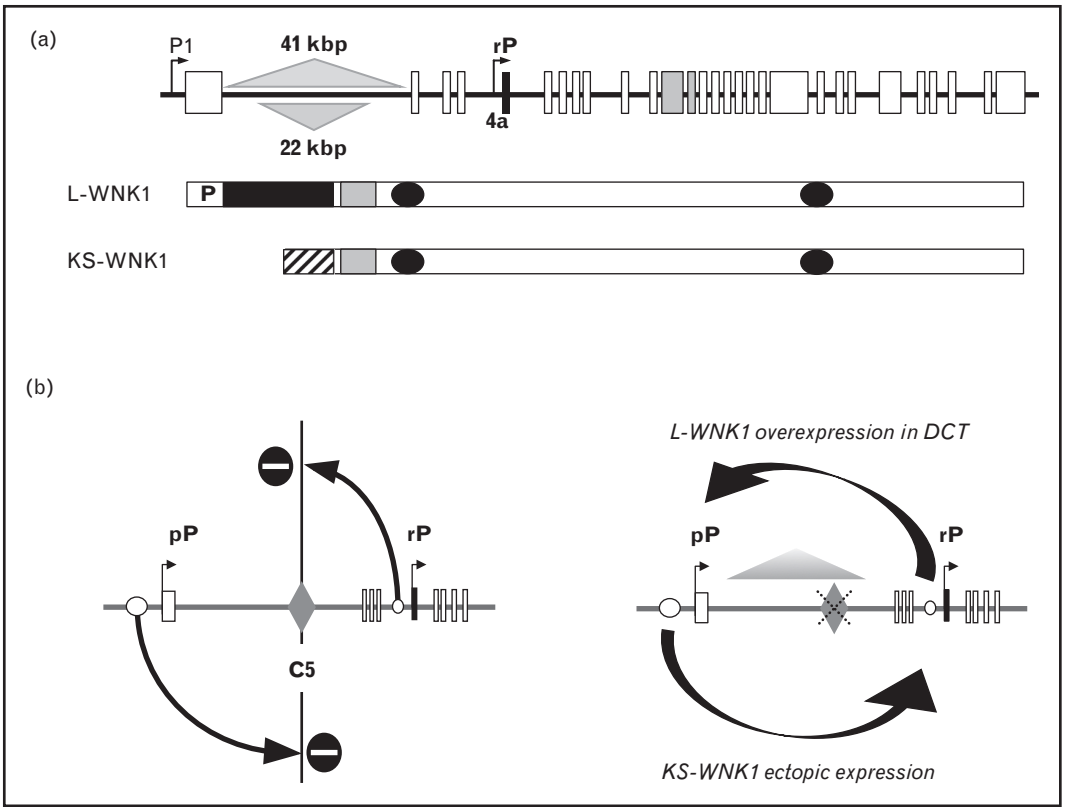


FIGURE 1. Schematic representation of the *WNK1* gene and consequences of pseudohypoaldosteronism type 2 mutations on the expression of the kinase. (a) Upper panel: schematic representation of the *WNK1* gene. Two promoters, pP (proximal promoter) and rP (renal promoter) control respectively the expression of a long isoform (L-WNK1), containing the whole kinase domain, and of kidney-specific isoform (KS-WNK1), the transcription of which starts at exon 4a (black rectangle) and which therefore lacks the major part of the kinase domain, encoded by exons 1–7. In addition, exons 9, 11 and 12 (grey rectangles) are alternatively spliced, giving rise to additional isoforms. The grey triangles represent the mutations identified in PHA2 patients, which correspond to large deletions of *WNK1* first intron (44 or 22 kbp in the American or French family, respectively). Lower panel: schematic representation of WNK1 isoforms. In addition to the kinase domain (black rectangle), L-WNK1 contains an auto-inhibitory domain (grey rectangle), N-terminal proline region ('P') and two coiled-coil domains (black circles). The latter three domains are present in KS-WNK1, whereas the N-terminal proline rich region is absent and the kinase domain is truncated (hatched rectangle). (b) Model of *WNK1* normal (left) and pathological (right) transcriptional regulation. The C5 insulator (grey rhombus) prevents interactions between L-WNK1 and KS-WNK1 regulatory elements (white ovals). Its deletion leads to *L-WNK1* overexpression in the distal convoluted tubule (DCT) and *KS-WNK1* ectopic expression in extrarenal tissues.

hypokalemia and metabolic alkalosis and is due to mutations in the gene encoding NCC [11]. Increased NCC expression and/or activity therefore seem to be a key feature of PHA2 pathogenesis. Accordingly, Mayan *et al.* [12] found an increased NCC quantity in urinary exosomes of PHA2 patients compared with unrelated controls. Studies performed in mouse models also support this hypothesis. Two models of WNK4-related PHA2 have been characterized [13,14]. They exhibit all the clinical features of the disease and increased NCC activity (Table 1) [13–16,17▪▪]. As in patients, genetic or pharmacological NCC inhibition results in the correction of all disorders. The following model has consequently been proposed: increased electroneutral Na^+/Cl^- reabsorption by NCC would result not only in hypervolemia and thus hypertension but also in a decreased electrogenic Na^+ reabsorption through the epithelial sodium (Na) channel (ENaC) and thus an impaired electrochemical gradient essential for K^+ secretion by the renal outer medullary potassium (K) channel (ROMK), thereby leading to hyperkalemia. H^+ secretion would be similarly impaired, thus explaining the metabolic acidosis.

Studies performed in *Xenopus laevis* oocytes and mammalian cell lines showed that L-WNK1 stimulates NCC membrane expression and activity (see below). The increased expression of L-WNK1 in the DCT of PHA2 patients would therefore lead to increased NCC activity, thereby triggering PHA2.

A first series of in-vitro studies showed that L-WNK1 does not directly regulate NCC activity

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

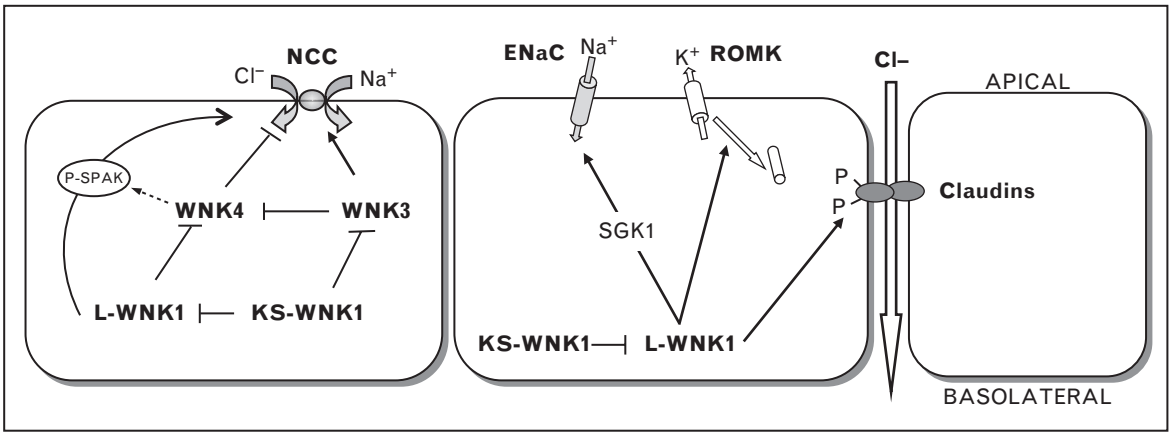


FIGURE 2. Regulation of ion transport by WNK1 in the distal nephron. In the distal convoluted tubule (DCT), the two WNK1 isoforms (L-WNK1 and KS-WNK1) interact with WNK3 and WNK4 to regulate the Na–Cl cotransporter (NCC). L-WNK1 and WNK3 activate whereas WNK4 and KS-WNK1 inhibit the cotransporter. L-WNK1 relieves NCC from WNK4-mediated inhibition; KS-WNK1 inhibits both L-WNK1 and WNK3. In addition, L-WNK1 phosphorylates SPAK, which in turn phosphorylates and activates NCC. WNK4 can also phopshorylate SPAK, suggesting that the two pathways are not independent. In the distal part of the DCT, the connecting tubule and the cortical collecting duct, L-WNK1 also regulates epithelial sodium channel (ENaC) and renal outer medullary potassium channel (ROMK) activity as well as paracellular Cl^- transport, via the phosphorylation of claudins. L-WNK1 could activate ENaC by phosphorylating SGK1 while it inhibits ROMK membrane expression and therefore activity.

but relieves the cotransporter from WNK4-mediated degradation through a lysosomal pathway [18,19]. However, L-WNK1 could also regulate NCC via the phosphorylation of SPAK (STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase [20,21]), which in turn interacts with and phosphorylates NCC, thus stimulating its activity. These two pathways are probably not independent as WNK4 is able to phosphorylate SPAK *in vitro* and SPAK phosphorylation is increased in WNK4-PHA2 mice. The physiological importance of SPAK in the regulation of NCC activity has recently been demonstrated *in vivo* [22▪]. L-WNK1-specific inactivation in mice, generated by gene-trap [23▪,24], does not allow the assessment of NCC regulation by L-WNK1 as it results in embryonic death [24,25], but data obtained in a mouse model of KS-WNK1 inactivation strongly suggest that L-WNK1 is indeed an activator of NCC *in vivo* (Table 1).

As described above, KS-WNK1 is devoid of kinase activity. It however binds to and inhibits L-WNK1 through the action of its inhibitory domain located downstream of the kinase domain (Fig. 1a). Accordingly, KS-WNK1 indirectly inhibits NCC by inhibiting L-WNK1 *in vitro* [9]. The inhibitory effect of KS-WNK1 has been demonstrated *in vivo* in mouse models of KS-WNK1 inactivation or overexpression [15,16]. While *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice exhibit increased NCC phosphorylation and membrane expression, transgenic mice overexpressing KS-WNK1 in the whole distal nephron show decreased NCC phosphorylation and expression. The mechanisms by which NCC modulation is achieved in these models have not been clearly

Table 1. Summary of the phenotypic and molecular characteristics of the different models discussed in the text

		Plasma			NCC		ENaC			
Model	BP	K^+	Cl^-	A/B	Exp.	Act.	Exp.	Act.	ROMK	BKCa
PHA2 patients	↑	↑	↑	Acidosis	↑	↑	ND	↑	ND	ND
TgWNK4^{PHAII} [13]	↑	↑	↑	Acidosis	↑	↑	Normal	↑ (colon)	Normal	ND
Wnk4$^{D561A/+}$ [14]	↑	↑	↑	Acidosis	↑	↑	↑	↑	↑	↑
KS-WNK1$^{-/-}$[15,16]	Normal	Normal	Normal	Normal	↑	↑	↓	↓	↑	↑
Kir5.1$^{-/-}$[17▪▪]	Normal	↓	↑	Acidosis	=	↑	ND	Normal	ND	ND

A/B, acid–base; Act., activity; Exp., expression; BKCa, big conductance calcium-activated potassium (K) channel; BP, blood pressure; ENaC, epithelial sodium channel; NCC, Na–Cl cotransporter; ND, not determined; PHA2, pseudohypoaldosteronism type 2; ROMK, renal outer medullary potassium channel.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

established. We quantified SPAK phosphorylation in *KS-WNK1*$^{-/-}$ and were surprised to observe a slight decrease in phosphorylation rather than the expected increase on the Ser383 residue [15]. L-WNK1 can phosphorylate the Thr243 and Ser383 residues of mouse SPAK *in vitro*. While the requirement of the Thr residue for NCC phosphorylation is clearly demonstrated [22▪], the function of the Ser residue is unknown. We therefore recently quantified the level of phosphorylation of the Thr243 residue and found that it is similar between *KS-WNK1*$^{+/+}$ and *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice (Fig. 3). Increased phosphorylation of NCC in *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice does not therefore seem to involve SPAK. The alternative mechanism by which this is achieved remains to be identified.

As described above, activation of NCC is believed to be an important factor for PHA2 pathogenesis. Surprisingly, *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice do not exhibit hyperkalemic hypertension nor hyperchloremic metabolic acidosis despite increased NCC activity (Table 1), evidenced by the decreased aldosterone level [15] and salt-sensitive elevation of BP [16]. We proposed two hypotheses to explain this result: the level of NCC activation reached following KS-WNK1 inactivation is not sufficient, or NCC activation is necessary but not sufficient to induce PHA2. We tested the first hypothesis by comparing the level of expression and phosphorylation of NCC in *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice with that of the WNK4-PHA2 model generated by R. Lifton's group (*TgWNK4*^{PHAII}). This experiment was complicated by the fact that the models were not on the same genetic background and that control mice from the two groups have a different level of NCC expression and phosphorylation at baseline. We therefore compared only the fold activation relative to their own controls. This study did not support a striking difference between the two models and thus favoured the second hypothesis about the implication of additional factors in WNK1-related PHA2.

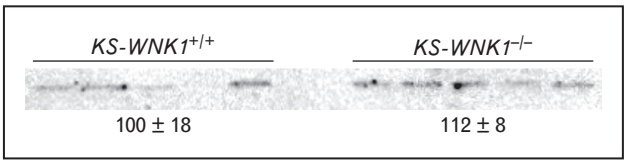


FIGURE 3. Phosphorylation of the Thr243 residue of SPAK is not modified in *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice. Immunoblot of plasma membranes-enriched fractions isolated from the renal cortex of control and *KS-WNK1*$^{-/-}$ males ($n = 5$ per group) incubated with antiphospho-SPAK Thr243 antibody. Densitometric analysis shows that phosphorylation of SPAK on this residue is not modified in *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice compared with controls. Data are mean ± SEM. As reported in [22▪], the phosphorylation level of this residue is very low in the kidney, thus explaining the weak signal obtained on this immunoblot.

HYPERKALEMIA IN PSEUDOHYPOALDOSTERONISM TYPE 2

The hyperkalemic effect of pharmacological or genetic inhibition of ENaC and, inversely, the hypokalemic effect of ENaC activation have been well described in humans and mice. Consequently, the hyperkalemia and metabolic acidosis in PHA2 patients are thought to result from the decreased Na^+ reabsorption by ENaC, consecutive to the increased Na^+ reabsorption by NCC in the DCT. Several sets of data, however, suggest that the situation is more complex. First, in *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice, ENaC expression and activity are decreased, as shown by their absence of response to amiloride, an ENaC blocker, but this inhibition does not result in hyperkalemia. Second, three studies have shown that ENaC is activated in both humans [26] and mice [14,27] bearing PHA2-causing mutations. In particular, Yang *et al.* [14] showed that ENaC expression, measured by immunoblotting, and activity in microperfused cortical collecting ducts (CCD) of WNK4-PHA2 mice are increased and yet these mice display hyperkalemia. This activation could be a direct consequence of the PHA2 mutation, as shown in *Xenopus* oocytes [27]. It is possible however that the decreased flow rate and Na^+ delivery to the CNT and CCD, consecutive to an increased Na^+ reabsorption in the DCT, would lead to a reduced Na^+ reabsorption even by an activated channel, thus inhibiting K^+ secretion. This hypothesis, which remains to be tested by careful measurements of these parameters, is however not supported by the absence of hyperkalemia in individuals submitted to Na^+ depletion and, again, in *KS-WNK1*$^{-/-}$ mice.

Finally, coming back to L-WNK1, in-vitro studies have shown that L-WNK1 can activate ENaC via SGK1 phosphorylation [28]. The increased L-WNK1 in the DCT would then again stimulate rather than inhibit ENaC activity in this segment. In conclusion, ENaC inhibition does not seem to be a satisfying explanation for the hyperkalemia observed in PHA2 mice and patients.

In-vitro studies have shown that L-WNK1 and WNK4 could inhibit ROMK membrane expression by enhancing its clathrin-mediated endocytosis [29–32]. Again, KS-WNK1 inhibits L-WNK1 and therefore stimulates ROMK activity, as demonstrated *in vivo* in mice overexpressing KS-WNK1 in the whole distal nephron [33]. The increased expression of L-WNK1 in the DCT of PHA2 patients could thus strongly inhibit K^+ secretion by ROMK in this

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

segment. Hyperkalemia is, however, corrected by the administration of thiazide diuretics in PHA2 patients, strongly suggesting that primary inhibition of ROMK by WNKs is not responsible for this disorder.

A third possible explanation is the existence of a chloride shunt which would inhibit K^+ secretion by altering the lumen negative transepithelial voltage. A strong kaliuretic response is indeed induced by perfusion of Na^+ bicarbonate or sulfate but not by NaCl in PHA2 patients and WNK4-PHA2 mice [14,34,35]. L-WNK1 stimulates paracellular chloride permeability *in vitro* by increasing the phoshorylation of claudin-4, a pore-forming tight-junction protein that exhibits channel-like properties such as charge and size selectivity [36]. The mechanisms by which this is achieved remain to be defined.

It is of interest to briefly describe here yet another intriguing mouse model, which recently highlighted again the complex coordinated regulation of Na^+, K^+, Cl^- and acid–base handling by the distal nephron [17▪▪]. This model was generated by inactivation of the Kir5.1 K^+ channel, present at the basolateral membrane of cells in the thick ascending limb of Henle's loop, DCT, CNT and CCD. Like PHA2 mice, it displays hyperchloremic metabolic acidosis and normal BP but this time associated with hypokalemia (Table 1). NCC activity is increased, whereas that of ENaC is unchanged, but chronic administration of thiazide diuretics corrects only the metabolic acidosis, not the K^+ loss.

ADDITIONAL WNK FUNCTION OUTSIDE THE KIDNEY

L-WNK1 is expressed in the cardiovascular system [37]. Interestingly, heterozygous *L-WNK1*$^{+/-}$ mice display a decreased BP with no alteration in their kidney function, suggesting that L-WNK1 could regulate BP in mice independently of its renal action and that vascular L-WNK1 could contribute to BP regulation. We showed that *L-WNK1* haploinsufficiency strongly alters BP and vasoconstriction responses following α1-adrenergic receptors activation and almost abolishes the pressure-induced contractile (myogenic) response, an obligatory physiological adaptation to systemic BP variation for maintaining blood flow perfusion of organs [23▪]. These alterations are associated with decreased phosphorylation of SPAK and Na–K–2Cl cotransporter 1 (NKCC1). Interestingly, a similar phenotype is observed in *SPAK* knock-out mice [38]. The contribution of vascular L-WNK1 and SPAK to the development of PHA2 remains to be demonstrated.

WNK4 is also expressed in the vasculature, wherein it reduces vasoconstriction in response to α1-adrenergic receptors stimulation through the inhibition of transient receptor potential canonical channel 3 (TRPC3) activity [39▪]. As WNK4-PHA2 mutants fail to inhibit TRPC3 *in vitro*, impaired inhibition of vascular TRPC3 could contribute to the high BP observed in WNK4-related PHA2 patients, but this needs to be formally demonstrated in PHA2 mice and patients.

CONCLUSION

In conclusion, the net increase in the expression of the kinase isoform of WNK1 triggers the development of PHA2 in patients carrying a deletion of a large portion of *WNK1* first intron. If the hypertension can be easily explained by increased Na^+ reabsorption via the Na^+–Cl^- cotransporter NCC, whose activity is stimulated by L-WNK1, the mechanisms underlying the hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis remain obscure. Once a WNK1-PHA2 mouse model becomes available, further in-depth studies of integrated Na^+, K^+, Cl^- and acid–base handling by the distal nephron using what are often thought of as 'out-of-date' techniques such as microperfusion, micropuncture and electrophysiology will be needed in combination with novel technologies, such as phosphoproteomics, to unravel the mechanisms by which *WNK1* PHA2 mutations trigger the development of these disorders.

Acknowledgements

We thank C. Büsst for her critical reading of the manuscript. This work was supported by INSERM, ANR-05-MRAR-010-01, the EUNEFRON European Network, and the Fondation Leducq Transatlantic Network on Hypertension.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:
- ▪ of special interest
- ▪▪ of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (p. 108).

1. Gordon RD, Klemm SA, Tunny TJ. et al. Gordon's syndrome: a sodium-volume-dependent form of hypertension with a genetic basis. In: Brenner JHLaBM, editor. Hypertension: pathology, diagnosis and management, 2nd ed. Raven Press Ltd: New York; 1995. pp. 2111–2113.
2. Arroyo JP, Ronzaud C, Lagnaz D, *et al.* Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. Physiology (Bethesda) 2011; 26:115–123.
3. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, *et al.* Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. Science 2001; 293:1107–1112.
4. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, *et al.* WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. J Biol Chem 2000; 275:16795–16801.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

5. Verissimo F, Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multicellular organisms. Oncogene 2001; 20:5562–5569.
6. Delaloy C, Lu J, Houot AM, *et al.* Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. Mol Cell Biol 2003; 23:9208–9221.
7. O'Reilly M, Marshall E, Macgillivray T, *et al.* Dietary electrolyte-driven responses in the renal WNK kinase pathway in vivo. J Am Soc Nephrol 2006; 17:2402–2413.
8. Delaloy C, Elvira-Matelot E, Clemessy M, *et al.* Deletion of WNK1 first intron results in misregulation of both isoforms in renal and extrarenal tissues. Hypertension 2008; 52:1149–1154.
9. Subramanya AR, Yang CL, Zhu X, Ellison DH. Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 290:F619–F624.
10. Yang CL, Zhu X, Ellison DH. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. J Clin Invest 2007; 117:3403–3411.
11. Vargas-Poussou R, Dahan K, Kahila D, *et al.* Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. J Am Soc Nephrol 2011; 22:693–703.
12. Mayan H, Attar-Herzberg D, Shaharabany M, *et al.* Increased urinary Na-Cl cotransporter protein in familial hyperkalaemia and hypertension. Nephrol Dial Transplant 2008; 23:492–496.
13. Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, *et al.* Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. Nat Genet 2006; 38:1124–1132.
14. Yang SS, Morimoto T, Rai T, *et al.* Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. Cell Metab 2007; 5:331–344.
15. Hadchouel J, Soukaseum C, Busst C, *et al.* Decreased ENaC expression compensates the increased NCC activity following inactivation of the kidney-specific isoform of WNK1 and prevents hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:18109–18114.
16. Liu Z, Xie J, Wu T, *et al.* Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models. Hum Mol Genet 2011; 20:855–866.
17. ▪▪ Paulais M, Bloch-Faure M, Picard N, *et al.* Renal phenotype in mice lacking the Kir5.1 (Kcnj16) K+ channel subunit contrasts with that observed in SeSAME/EAST syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:10361–10366.

This article reports the characterization of a mouse model bearing a null mutation of the gene encoding the Kir5.1 K^+ channel. This channels usually functions as a heterodimer with Kir4.1, mutations of which lead to the development of the EAST/SESAME syndrome. The phenotype of this model illustrates again the complexity of coordinated Na^+, K^+, Cl^- and acid–base handling by the distal nephron.

18. Subramanya AR, Liu J, Ellison DH, *et al.* WNK4 diverts the thiazide-sensitive NaCl cotransporter to the lysosome and stimulates AP-3 interaction. J Biol Chem 2009; 284:18471–18480.
19. Zhou B, Zhuang J, Gu D, *et al.* WNK4 enhances the degradation of NCC through a sortilin-mediated lysosomal pathway. J Am Soc Nephrol 2009; 21:82–92.
20. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, *et al.* WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. J Biol Chem 2005; 280:42685–42693.
21. Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HK, *et al.* Activation of the thiazide-sensitive Na+-Cl- cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. J Cell Sci 2008; 121:675–684.
22. ▪ Rafiqi FH, Zuber AM, Glover M, *et al.* Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. EMBO Mol Med 2010; 2:63–75.

Using a very elegant knock-in strategy, the authors demonstrate the physiological relevance of NCC phosphorylation by the SPAK kinase in mice.

23. ▪ Bergaya S, Faure S, Baudrie V, et al. WNK1 regulates vasoconstriction and blood pressure response to {alpha}1-adrenergic stimulation in mice. Hypertension 2011; 3:439–445.

Together with reference [39▪], this article describes a role for the WNKs kinases outside of the renal tissue, that is in the vasculature. Using in-vivo and ex-vivo techniques, the authors show that L-WNK1 regulates vasocontriction specifically in response to α1-adrenergic stimulation in mice.

24. Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, *et al.* Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:14109–14114.
25. Xie J, Wu T, Xu K, *et al.* Endothelial-specific expression of WNK1 kinase is essential for angiogenesis and heart development in mice. Am J Pathol 2009; 175:1315–1327.
26. Farfel Z, Mayan H, Yaacov Y, *et al.* WNK4 regulates airway Na+ transport: study of familial hyperkalaemia and hypertension. Eur J Clin Invest 2005; 35:410–415.
27. Ring AM, Cheng SX, Leng Q, *et al.* WNK4 regulates activity of the epithelial Na+ channel in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:4020–4024.
28. Xu BE, Stippec S, Chu PY, *et al.* WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:10315–10320.
29. Cope G, Murthy M, Golbang AP, *et al.* WNK1 affects surface expression of the ROMK potassium channel independent of WNK4. J Am Soc Nephrol 2006; 17:1867–1874.
30. Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, *et al.* WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K+ secretion. Nat Genet 2003; 35:372–376.
31. Lazrak A, Liu Z, Huang CL. Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:1615–1620.
32. Wade JB, Fang L, Liu J, *et al.* WNK1 kinase isoform switch regulates renal potassium excretion. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:8558–8563.
33. Liu Z, Wang HR, Huang CL. Regulation of ROMK channel and K+ homeostasis by kidney-specific WNK1 kinase. J Biol Chem 2009; 284:12198–12206.
34. Schambelan M, Sebastian A, Rector FC Jr. Mineralocorticoid-resistant renal hyperkalemia without salt wasting (type II pseudohypoaldosteronism): role of increased renal chloride reabsorption. Kidney Int 1981; 19:716–727.
35. Take C, Ikeda K, Kurasawa T, Kurokawa K. Increased chloride reabsorption as an inherited renal tubular defect in familial type II pseudohypoaldosteronism. N Engl J Med 1991; 324:472–476.
36. Ohta A, Yang SS, Rai T, *et al.* Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. Biochem Biophys Res Commun 2006; 349:804–808.
37. Delaloy C, Hadchouel J, Imbert-Teboul M, *et al.* Cardiovascular expression of the mouse WNK1 gene during development and adulthood revealed by a BAC reporter assay. Am J Pathol 2006; 169:105–118.
38. Yang SS, Lo YF, Wu CC, *et al.* SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. J Am Soc Nephrol 2010; 21:1868–1877.
39. ▪ Park HW, Kim JY, Choi SK, *et al.* Serine-threonine kinase with-no-lysine 4 (WNK4) controls blood pressure via transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) in the vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:10750–10755.

This article describes a role for WNK4 outside of the renal tissue that is in the vasculature. Using in-vivo and ex-vivo techniques, the authors show that WNK4 modulates blood pressure by restricting Ca^{2+} influx via the transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) channel in the vasculature.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

nature genetics

KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron

Hélène Louis-Dit-Picard[1–3,38*], Julien Barc[4–6,38], Daniel Trujillano[7,8,38], Stéphanie Miserey-Lenkei[9], Nabila Bouatia-Naji[1,2], Olena Pylypenko[9], Geneviève Beaurain[1–3], Amélie Bonnefond[10,11], Olivier Sand[10,11], Christophe Simian[3], Emmanuelle Vidal-Petiot[1,2], Christelle Soukaseum[1,2], Chantal Mandet[1,2], Françoise Broux[12], Olivier Chabre[13], Michel Delahousse[14], Vincent Esnault[15,16], Béatrice Fiquet[17], Pascal Houillier[2,18,19], Corinne Isnard Bagnis[20], Jens Koenig[21], Martin Konrad[21], Paul Landais[2,22,23], Chebel Mourani[24], Patrick Niaudet[2,22], Vincent Probst[4–6,25], Christel Thauvin[26,27], Robert J Unwin[28], Steven D Soroka[29], Georg Ehret[30,31], Stephan Ossowski[32], Mark Caulfield[33], International Consortium for Blood Pressure (ICBP)[34], Patrick Bruneval[1,2,35], Xavier Estivill[7,8,36], Philippe Froguel[10,11,37], Juliette Hadchouel[1,2,39], Jean-Jacques Schott[4–7,25,39] & Xavier Jeunemaitre[1–3,39]

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.

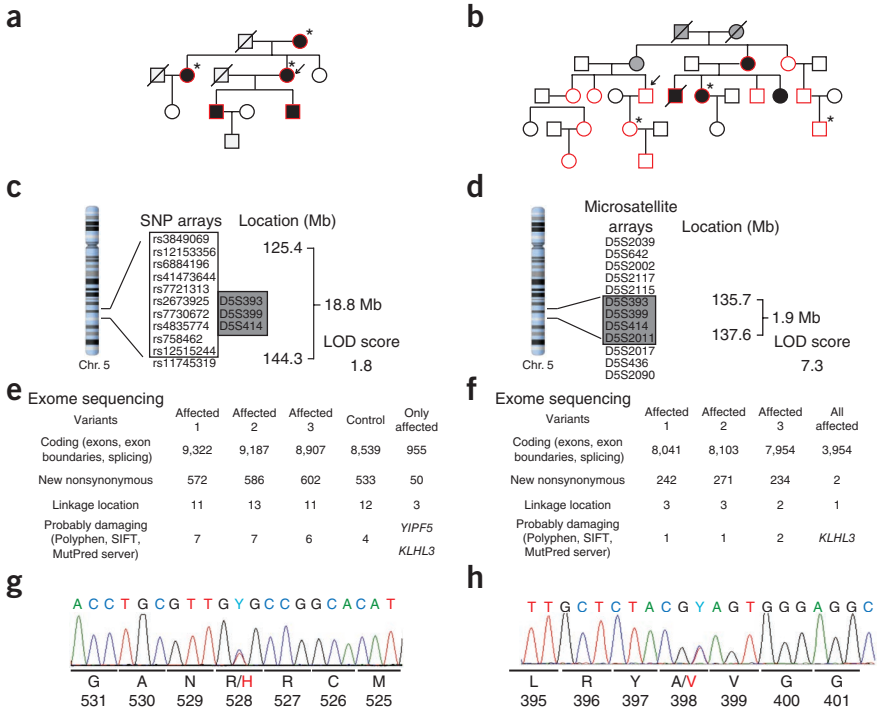
Familial hyperkalemic hypertension (FHHt) is a Mendelian form of arterial hypertension that is partially explained by mutations in *WNK1* and *WNK4* that lead to increased activity of the Na^+-Cl^- cotransporter (NCC) in the distal nephron. Using combined linkage analysis and whole-exome sequencing in two families, we identified *KLHL3* as a third gene responsible for FHHt. Direct sequencing of 43 other affected individuals revealed 11 additional missense mutations that were associated with heterogeneous phenotypes and diverse modes of inheritance. Polymorphisms at *KLHL3* were not associated with blood pressure. The KLHL3 protein belongs to the BTB-BACK-kelch family of actin-binding proteins that recruit substrates for Cullin3-based ubiquitin ligase complexes. KLHL3 is coexpressed with NCC and downregulates NCC expression at the cell surface. Our study establishes a role for KLHL3 as a new member of the complex signaling pathway regulating ion homeostasis in the distal nephron and indirectly blood pressure.

Arterial hypertension is a complex trait, influenced by both genetic and environmental factors. The crucial role of ion transport in the distal nephron in the regulation of blood pressure has been highlighted by the discovery of mutations in genes involved in this process in Mendelian hypertensive disorders[1], as well as by the well-known influence of dietary salt on blood pressure in the general population[2]. Familial hyperkalemic hypertension, also known as pseudohypoaldosteronism type 2 or Gordon's syndrome (MIM 145260), is a rare autosomal dominant disease in which a net positive sodium ion balance is associated with renal potassium ion retention, resulting in hypertension, hyperkalemia and hyperchloremic metabolic acidosis[3]. Ten years ago, mutations causing FHHt were identified in the *WNK1* and *WNK4* genes, which encode two members of the with-no-lysine (WNK) serine-threonine kinases family, revealing a new pathway for renal ion control and blood pressure regulation[4]. The clinical features of FHHt strongly suggest that this syndrome is caused by altered ion transport in the distal nephron. Accordingly, studies in mice have shown that increased membrane expression and activity of the NCC cotransporter, responsible for Na^+-Cl^- reabsorption in the distal convoluted tubule (DCT), have a crucial role in the development of FHHt[5,6].

Mutations in *WNK1* and *WNK4* are found in only a minority of French families with FHHt. In addition, there is phenotypic heterogeneity among individuals with FHHt[7]. We experienced difficulties in assessing the disease status at susceptibility gene(s) in the first-degree relatives of affected individuals in the remaining families, suggesting a lack of penetrance, frequent *de novo* mutations or autosomal recessivity. We eventually carried out linkage analyses combined with whole-exome sequencing (WES) in two informative families (**Fig. 1**). The first family, recruited in Paris (Ped01), included five affected individuals—all with hypertension, metabolic acidosis and hyperkalemia—and seven unaffected individuals (**Fig. 1a**). Using a SNP-based linkage approach, six suggestive linkage regions (maximum logarithm of odds (LOD) score = 1.8 in all linked regions) were identified in this panel. In total, linked regions spanned 35.6 Mb and included 325 protein-coding genes (**Fig. 1c** and **Supplementary Table 1**). Because the number of positional candidate genes was so high, we carried out WES of genomic DNA from one unaffected and three affected family members and identified 50 new coding variants not reported in dbSNP, HapMap (accessed in September 2010), the 1000 Genomes draft database or the eight exomes from European individuals[8] or found in the unaffected individual (**Fig. 1e**). Three missense mutations mapped to a linkage region on chromosome 5q31,

*A full list of author affiliations appears at the end of the paper.

Received 19 December 2011; accepted 9 February 2012; published online 11 March 2012; corrected after print 22 March 2012; doi:10.1038/ng.2218



Variants	Affected 1	Affected 2	Affected 3	Control	Only affected
Coding (exons, exon boundaries, splicing)	9,322	9,187	8,907	8,539	955
New nonsynonymous	572	586	602	533	50
Linkage location	11	13	11	12	3
Probably damaging (Polyphen, SIFT, MutPred server)	7	7	6	4	*YIPF5* *KLHL3*

Variants	Affected 1	Affected 2	Affected 3	All affected
Coding (exons, exon boundaries, splicing)	8,041	8,103	7,954	3,954
New nonsynonymous	242	271	234	2
Linkage location	3	3	2	1
Probably damaging (Polyphen, SIFT, MutPred server)	1	1	2	*KLHL3*

Figure 1 Combined linkage analysis and whole-exome sequencing in two FHHt pedigrees identified mutations in *KLHL3*. Filled symbols, individuals with hypertension; red delimited symbols, individuals with hyperkalemia; filled gray symbols, individuals of unknown status. Arrows indicate index cases. Asterisks indicate exome-sequenced individuals. (**a**) Ped01, family affected by FHHt from Paris. (**b**) Ped02, family affected by FHHt from Nantes. (**c**,**d**) Detailed linkage region on chr. 5 according to SNP (**c**) and microsatellite (**d**) analysis. Locations refer to the hg19 reference genome. Results from the microsatellite analysis are superimposed on those from the SNP analysis for comparison. (**e**,**f**) Total numbers of identified variants per sequenced individual in Ped01 (**e**) and Ped02 (**f**) shown by mutation category. (**g**,**h**) Confirmed mutations in *KLHL3* are indicated in red on the chromatograms for the c.1583G>A (encoding p.Arg528His) (**g**) and c.1193C>T (encoding p.Ala398Val) (**h**) mutations. Y: C or T.

and two were predicted *in silico* to be damaging (by PolyPhen-2, Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT) and the MutPred Server). A screen for additional mutations in the *YIPF5* gene in this region excluded this locus as causative, as no additional mutations were identified in individuals with Gordon's syndrome. The other missense mutation (c.1583G>A (encoding p.Arg528His)) was located in *KLHL3* (**Fig. 1g**). A second, larger family (Ped02; **Fig. 1b**), recruited in Nantes, had a milder phenotype, with only 3 out of 14 affected individuals suffering from arterial hypertension and with only a modest but significant increase in kalemia in these individuals relative to unaffected family members (5.1 ± 0.3 mmol/l versus 4.1 ± 0.3 mmol/l; $P = 6.4 \times 10^{-9}$; **Supplementary Table 2**). Linkage analysis using microsatellite markers identified one significantly associated region on chromosome 5q31 (maximum LOD score = 7.3 at $\theta = 0$ and 80% penetrance, $P = 6.9 \times 10^{-9}$; **Fig. 1d**). WES performed on three genetically distant family members (**Fig. 1f**) identified one new missense variant predicted to be damaging within the linkage interval (**Fig. 1h**), which corresponded to another variant (c.1193C>T (p.Ala398Val)) in *KLHL3*.

We then extended our analysis of the 15 exons of *KLHL3* to 43 additional individuals with FHHt (index cases). Direct sequencing identified 11 additional nonsynonymous mutations in 14 index cases (33%) (**Supplementary Table 3**). In eight families that seemed to have autosomal dominant transmission of FHHt, a heterozygous *KLHL3* missense mutation segregated with the disease (**Supplementary Fig. 1**). There were also four consanguineous cases bearing three different homozygous missense mutations. On average, the recessive cases were diagnosed at an earlier age (2.5 months to 17 years) than those with heterozygous mutations (15–56 years) and had a more severe phenotype.

Because of the phenotypic heterogeneity associated with these mutations, we searched for *KLHL3* mutations in 1,232 individuals with essential hypertension (HYPERGENE cohort[9]) and 800 normotensive individuals. Direct sequencing of the coding sequence of *KLHL3* revealed only one deleterious mutation (encoding a p.Val438Ile alteration) in a hypertensive subject with mild hyperkalemia (5.1 mmol/l), indicating that the missense mutations observed in individuals with FHHt are rare in the hypertensive population of European descent. No mutations were found in normotensive subjects. In addition, we tested the association between SNPs at the *KLHL3* locus and blood pressure using the resources of the International Consortium on Blood Pressure (ICBP). A total of 794 SNPs in 69,000 subjects, spread over 1 Mb of *KLHL3*, showed no significant association with systolic or diastolic blood pressure or with both traits combined, when results were adjusted for age, gender and body mass index (**Supplementary Table 4**), suggesting that common variation in *KLHL3* has no significant impact on blood pressure regulation in healthy populations.

KLHL3 (encoding kelch-like 3) is a human homolog of the *Drosophila melanogaster kel* gene, and little is known about its functions[10]. The protein is composed of three domains (**Fig. 2a**): (i) a bric-a-brac, tramtrack, broad complex (BTB) domain, involved in oligomerization of the protein[11], (ii) a BTB and C-terminal kelch (BACK) domain and (iii) a kelch domain containing six kelch repeats forming a symmetrical six-bladed β propeller. The BTB and BACK domains interact with Cullin3, a key component of ubiquitin ligase complexes[12]. The kelch domain is a protein-protein interaction module, whose partners include actin (for a review, see ref. 13).

All mutated amino acids were conserved in human KLHL2, the closest homolog of KLHL3, and in the *D. melanogaster* KEL protein (**Supplementary Fig. 2**). Only one of the mutations was found to affect the BACK domain and could alter the stability of the domain's loops (**Fig. 2b**). The other 12 mutations were located within sequences encoding the kelch domain, with one of these affecting a residue in one of the four antiparallel β strands (strand b) that make up each propeller blade; the other 11 mutations specifically affected the b-c and d-a loops that connect the corresponding β strands (**Fig. 2c**). Three-dimensional modeling revealed the likely structure of the kelch domain in KLHL3, showing that the a-b and c-d loops occur on one side of the domain, whereas the intrablade b-c loops and the interblade d-a loops are present on the opposite side (**Fig. 2d**). The interblade d-a loops are buried in the protein core and make extensive interactions with both neighboring blades, keeping the integrity of the protein structure. The KLHL3 kelch domain structure showed that 8 of the 12 mutations affected residues that were located at the surface, with these residues forming two clusters, one on top

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.

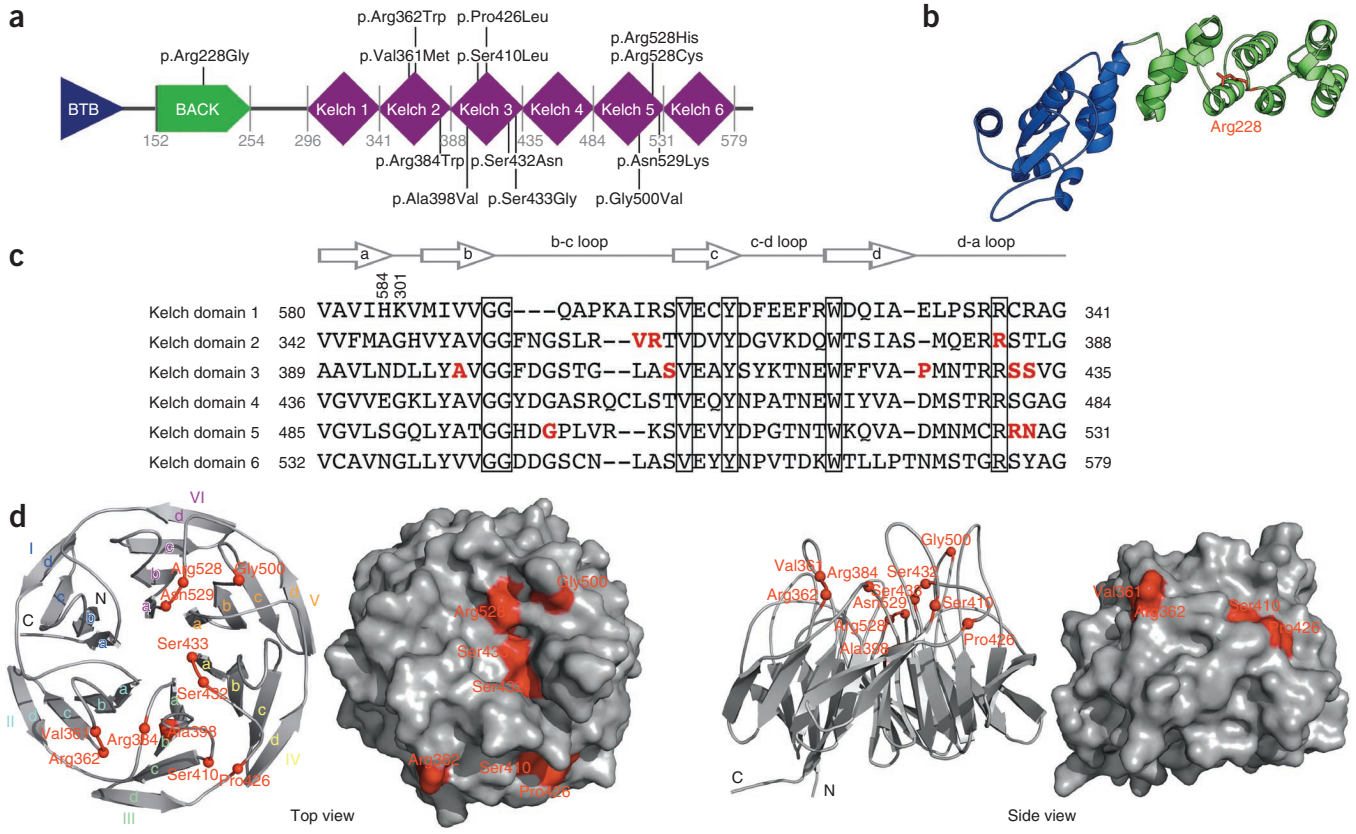


Figure 2 Localization of altered residues in KLHL3. (**a**) Schematic representation of the KLHL3 protein (blue triangle, BTB domain; green arrow, BACK domain; purple rhombs, kelch domain). The coordinates of the different domains are shown in gray, and the positions of the altered residues are shown in black. (**b**) Homology model of the KLHL3 BTB-BACK domain constructed on the basis of similarity between this domain in KLHL3 and KLHL11. The Arg228 residue altered in FHHt is indicated in red. (**c**) Sequence alignment of the six kelch motifs of KLHL3. The distribution of secondary structure elements is shown above. Residues that we determined to be altered in FHHt are shown in red. The residues conserved between kelch motifs are boxed. (**d**) Homology model of the KLHL3 kelch domain and prediction of the structural context of FHHt-associated mutations. The model was constructed on the basis of similarity between the kelch domains of KLHL3 and KLHL2. The model is shown in two orientations (top and side views) and is represented as a cartoon (left) and as the solvent-accessible surface of the protein (right). The identified amino-acid alterations (red) are clustered on the side of the protein with the b-c and d-a loops.

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.

of the β propeller and the other on the side (**Fig. 2d**), suggesting that these mutations may modify the interaction of the kelch domain with its partners or affect its overall structure (**Supplementary Table 5**). In addition, three altered serine residues were located in strong protein kinase A (PKA) or C (PKC) consensus phosphorylation motifs.

The regulation of KLHL3 activity by phosphorylation has not been investigated. However, self-association of muskelin, another kelch-like protein, is inhibited by PKC-mediated phosphorylation of two residues predicted to lie in surface-exposed loops on the same side of the β propeller as the serine residues in KLHL3 (ref. 14), suggesting that modified phosphorylation of KLHL3 may impair its function.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) showed that *KLHL3* was widely expressed, with the highest level of expression being detected in the cerebellum (**Supplementary Fig. 3**). As FHHt is caused by perturbed ion transport in the distal nephron, we established the renal expression pattern of *KLHL3*, performing qRT-PCR on segments isolated

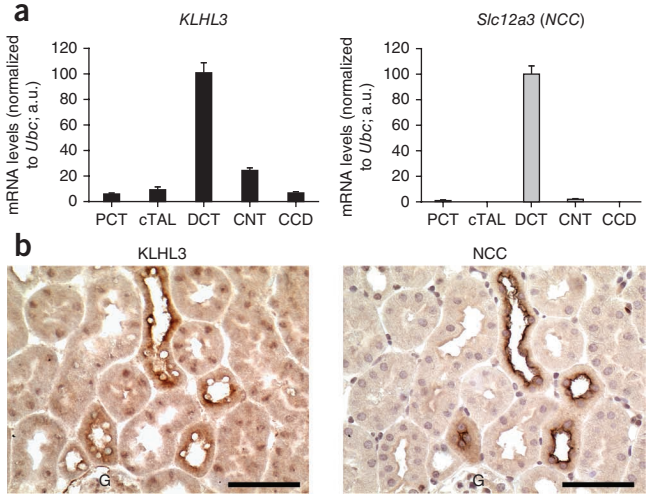


Figure 3 KLHL3 is expressed in the distal nephron. (**a**) qRT-PCR on RNA extracted from microdissected mouse cortical nephron segments shows that *KLHL3* is expressed highly in the DCT but also in the connecting tubule (CNT), albeit at a lower level. The expression of *Slc12a3* (encoding NCC), which was restricted to the DCT, was assessed in the same extracts to show the absence of cross-contamination between segments during dissection. PCT, proximal convoluted tubule; cTAL, cortical thick ascending limb of Henle's loop; CCD, cortical collecting duct. Data are shown as mean ± s.e.m. (**b**) Localization of KLHL3 in the mouse kidney cortex. Staining of mouse kidney serial sections with antibodies to KLHL3 or NCC showed that KLHL3 is coexpressed with NCC at the apical side of DCT cells. G, glomerulus, a.u., arbitrary units. Scale bars, 100 μm.

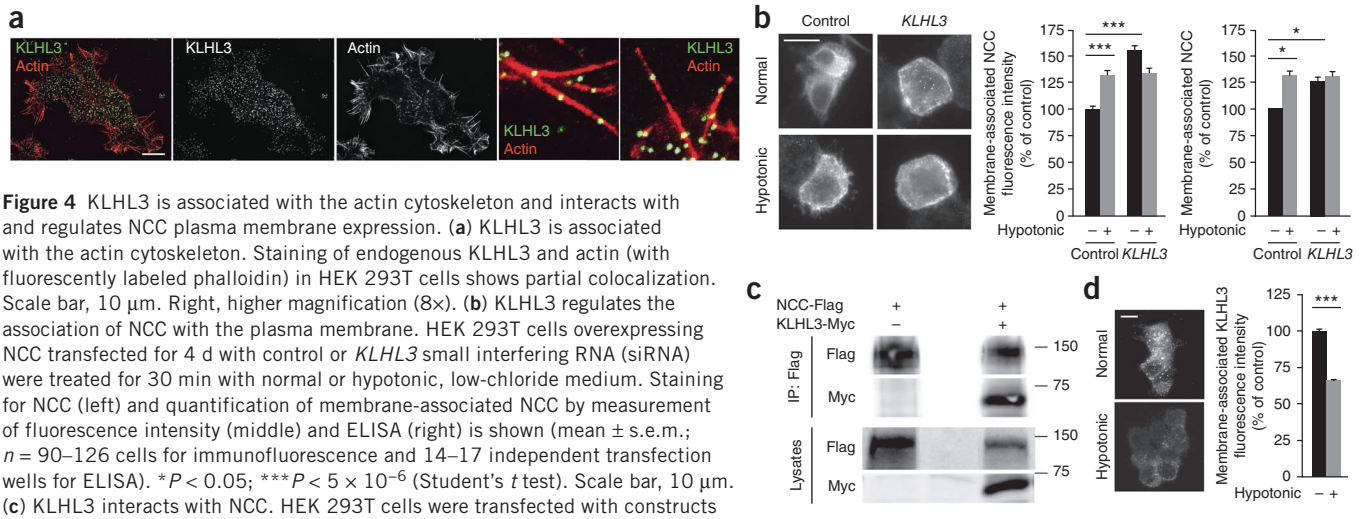


Figure 4 KLHL3 is associated with the actin cytoskeleton and interacts with and regulates NCC plasma membrane expression. (**a**) KLHL3 is associated with the actin cytoskeleton. Staining of endogenous KLHL3 and actin (with fluorescently labeled phalloidin) in HEK 293T cells shows partial colocalization. Scale bar, 10 µm. Right, higher magnification (8×). (**b**) KLHL3 regulates the association of NCC with the plasma membrane. HEK 293T cells overexpressing NCC transfected for 4 d with control or *KLHL3* small interfering RNA (siRNA) were treated for 30 min with normal or hypotonic, low-chloride medium. Staining for NCC (left) and quantification of membrane-associated NCC by measurement of fluorescence intensity (middle) and ELISA (right) is shown (mean ± s.e.m.; $n = 90–126$ cells for immunofluorescence and 14–17 independent transfection wells for ELISA). $^{*}P < 0.05$; $^{***}P < 5 \times 10^{-6}$ (Student's *t* test). Scale bar, 10 µm. (**c**) KLHL3 interacts with NCC. HEK 293T cells were transfected with constructs encoding Flag-tagged human NCC (NCC-Flag) alone or in combination with Myc-tagged mouse KLHL3 (KLHL3-Myc). At 48 h after transfection, cells were lysed, and NCC was immunoprecipitated and subjected to immunoblot analysis with the indicated antibodies. (**d**) Staining of endogenous KLHL3 in HEK 293T cells treated for 30 min with normal or hypotonic, low-chloride buffer. Quantification of membrane-associated KLHL3 fluorescence intensity was performed (mean ± s.e.m.; $n = 99–125$ cells). $^{***}P < 1 \times 10^{-10}$ (Student's *t* test). Scale bars, 10 µm.

from the mouse cortical nephron. *KLHL3* was highly expressed in the DCT and, to a lesser extent, in the connecting tubule (**Fig. 3a**). Of note, this pattern of expression paralleled that of *Slc12a3* encoding the NCC cotransporter, which was expressed specifically in the DCT. qRT-PCR for markers specific to particular nephron segments was performed to verify that each nephron sample was appropriately prepared (**Supplementary Fig. 4**). Immunohistochemistry studies performed on serial mouse kidney sections with antibodies directed against KLHL3 and NCC confirmed that the major site of KLHL3 protein expression in the kidney was the DCT and showed that KLHL3 protein was mainly present on the apical side of DCT cells (**Fig. 3b**).

Several kelch proteins bind actin or are associated with actin filaments[11,15]. Human embryonic kidney cells (HEK 293T) were co-labeled with a KLHL3-specific antibody (**Supplementary Fig. 5**) and with fluorescently tagged phalloidin, a fungal toxin that specifically associates with actin. Endogenous KLHL3 was observed as punctate structures uniformly distributed in the cytosol, with a pool of KLHL3-punctated structures found to be specifically associated with peripheral actin bundles (**Fig. 4a**). The same observation was made in mDCT cells isolated from mouse DCTs[16] (**Supplementary Fig. 6**).

As NCC has a crucial role in the development of FHHt[5,6], we hypothesized that mutations in *KLHL3* could increase NCC membrane localization. Sodium chloride depletion induces a redistribution of NCC from subapical cytoplasmic vesicles to the apical membrane in the rat kidney[17]. In agreement with this, hypotonic, low-chloride medium induced a 1.3- to 1.5-fold increase in NCC membrane expression in HEK 293T cells transfected with a construct encoding NCC (**Fig. 4b**). Inhibition of *KLHL3* expression by RNA interference (**Supplementary Fig. 5**) produced a similar increase in NCC membrane expression in cells maintained in control medium, and exposure of *KLHL3* knockdown cells to hypotonic stress did not further increase NCC membrane localization (**Fig. 4b**). Comparable results were obtained in mDCT cells (**Supplementary Fig. 6**). These experiments show that KLHL3 inhibits NCC membrane expression. Furthermore, we determined that KLHL3 and NCC interact by showing co-immunoprecipitation of Flag-tagged human NCC and Myc-tagged mouse KLHL3 in HEK 293T cells (**Fig. 4c**), thus suggesting that KLHL3 could, at least in part, be responsible for directly regulating NCC surface expression. We then asked whether KLHL3 cell surface expression could be regulated, as that of NCC, by changes in extracellular tonicity. Immunofluorescence experiments in HEK 293T cells showed that hypotonicity decreased the expression of endogenous KLHL3 at the plasma membrane by 30% (**Fig. 4d**). These data suggest that decreased KLHL3 expression in the membrane compartment is required to increase NCC surface localization.

KLHL3 could regulate NCC membrane expression by at least two mechanisms. Numerous studies have reported that the insertion and/or retrieval of ion channels and transporters at the apical surface of the nephron is microtubule dependent[18], although this has not been shown for NCC. As a pool of KLHL3 is associated with the actin cytoskeleton, probably through its C-terminal kelch domain[11], KLHL3 could thus participate in the regulation of NCC trafficking. KLHL3 also possesses a BTB-BACK domain that is involved in substrate recruitment to Cullin3-containing ubiquitin ligase complexes[19]. KLHL3 may therefore recruit NCC for ubiquitination by this complex, thereby promoting its proteasomal degradation. *In vitro* studies have recently shown that NCC is targeted for ubiquitination by different pathways[20,21]. While this manuscript was under review, another study reported the identification of similarly clustered FHHt-causing mutations in *KLHL3*, as well as splice-site mutations in *CUL3* (ref. 22), supporting the ubiquitination hypothesis. Our study extends these results by identifying NCC as one of the targets of KLHL3. It remains to be seen whether altered ubiquitination is the only mechanism by which KLHL3 regulates NCC or if other pathways are involved.

In conclusion, we determined that mutations in *KLHL3* encoding the kelch-like protein KLHL3 are responsible for a Mendelian form of hypertension and identify KLHL3 as a new regulator of NCC membrane localization. As was the case with WNK proteins ten years ago, the discovery of mutations affecting an unsuspected player in ion transport in the distal nephron opens a new and promising research field in the pathophysiology of hypertension.

URLs. MERLIN, http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Merlin/index.html; SimWalk2 v2.91, http://www.genetics.ucla.edu/software/simwalk.

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at http://www.nature.com/naturegenetics/.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Büsst for her critical reading of the manuscript, E. Clauser, F. Auradé and C. Auzan for helpful discussions, E. Durand, S. Lecointe and F. De Graeve for their contribution to whole-exome sequencing and M. Longépée-Dupas for assistance in family screening. This work was supported by INSERM, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR; 05-MRAR-010-01), the European Union Framework Programme 7 through the HYPERGENE project (HEALTH-F4-2007-201550) and through the GEUVADIS project (HEALTH-261123), the Leducq Foundation (Transatlantic Network on Hypertension; 07 CVD 01), the Fondation Leducq Trans-Atlantic Network of Excellence (05 CVD 01; Preventing Sudden Death), the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire and Biotronik and the Ministry of Science and Innovation (MICINN; SAF2008-00357).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.L.-D.-P. designed, performed and analyzed the data of the genetic analyses and immunoblotting experiments, and wrote the corresponding parts of the manuscript. J.B. designed, performed and analyzed the data of the genetic analyses (Ped02). D.T. together with S.O. and X.E. designed, performed and analyzed the WES of the Ped02 kindred. S.M.-L. designed and performed the *in vitro* and immunofluorescence experiments, and wrote the corresponding parts of the manuscript. N.B.-N. designed the WES for the Ped01 kindred and participated in the interpretation of the genetic analyses (exome sequencing of Ped01 and association studies) and in the writing of the manuscript. O.P. designed, performed and analyzed KLHL3 modeling and the prediction of the consequences of *KLHL3* mutations. G.B. participated in the collection of the families with FHHt and to the analysis of previous candidate genes. V.E. collected and characterized the first members of the Nantes FHHt family. A.B. contributed to the WES of Ped01. O.S. performed the bioinformatics analyses of WES in Ped01. C. Simian performed the sequencing of hypertensive and normotensive individuals. E.V.-P. designed, performed and analyzed the qRT-PCR experiments. C. Soukaseum provided technical help to H.L.-D.-P. C. Mandet performed the immunohistochemistry. F.B., O.C., M.D., B.F., P.H., J.K., M.K., P.L., C. Mourani, P.N., V.P., C.T., R.J.U., S.D.S. and C.I.B. recruited families with FHHt. G.E. and M.C. designed, performed and analyzed the association study of *KLHL3* and blood pressure within the ICBP. P.B. designed and analyzed the immunohistochemistry experiments. P.F. designed and analyzed WES. J.-J.S. designed and analyzed the genetic study and wrote the corresponding parts of the manuscript. X.J. and J.H. designed the study, analyzed data and co-wrote the manuscript. X.J. organized the entire study.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at http://www.nature.com/naturegenetics/.
Reprints and permissions information is available online at http://www.nature.com/reprints/index.html.

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.

1. Lifton, R.P., Gharavi, A.G. & Geller, D.S. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104**, 545–556 (2001).
2. Meneton, P., Jeunemaitre, X., de Wardener, H.E. & MacGregor, G.A. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol. Rev.* **85**, 679–715 (2005).
3. Gordon, R.D. *et al.* Gordon's syndrome: a sodium-volume-dependent form of hypertension with a genetic basis. in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (eds. Laragh, J.H. & Brenner, B.M.) 2111–2113 (Raven Press, 1995).
4. Wilson, F.H. *et al.* Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* **293**, 1107–1112 (2001).
5. Lalioti, M.D. *et al.* Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat. Genet.* **38**, 1124–1132 (2006).
6. Yang, S.S. *et al.* Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a *Wnk4*$^{D561A/+}$ knockin mouse model. *Cell Metab.* **5**, 331–344 (2007).
7. Hadchouel, J., Delaloy, C., Faure, S., Achard, J.M. & Jeunemaitre, X. Familial hyperkalemic hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 208–217 (2006).
8. Ng, S.B. *et al.* Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* **461**, 272–276 (2009).
9. Charru, A., Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Corvol, P. & Chatellier, G. HYPERGENE: a clinical and genetic database for genetic analysis of human hypertension. *J. Hypertens.* **12**, 981–985 (1994).
10. Lai, F. *et al.* Molecular characterization of *KLHL3*, a human homologue of the *Drosophila kelch* gene. *Genomics* **66**, 65–75 (2000).
11. Soltysik-Espanola, M. *et al.* Characterization of Mayven, a novel actin-binding protein predominantly expressed in brain. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2361–2375 (1999).
12. Kigoshi, Y., Tsuruta, F. & Chiba, T. Ubiquitin ligase activity of Cul3-KLHL7 protein Is attenuated by autosomal dominant retinitis pigmentosa causative mutation. *J. Biol. Chem.* **286**, 33613–33621 (2011).
13. Adams, J., Kelso, R. & Cooley, L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol.* **10**, 17–24 (2000).
14. Prag, S., De Arcangelis, A., Georges-Labouesse, E. & Adams, J.C. Regulation of post-translational modifications of muskelin by protein kinase C. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 366–378 (2007).
15. Kelso, R.J., Hudson, A.M. & Cooley, L. *Drosophila* Kelch regulates actin organization via Src64-dependent tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* **156**, 703–713 (2002).
16. Friedman, P.A. & Gesek, F.A. Stimulation of calcium transport by amiloride in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int.* **48**, 1427–1434 (1995).
17. Frindt, G. & Palmer, L.G. Surface expression of sodium channels and transporters in rat kidney: effects of dietary sodium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F1249–F1255 (2009).
18. Hamm-Alvarez, S.F. & Sheetz, M.P. Microtubule-dependent vesicle transport: modulation of channel and transporter activity in liver and kidney. *Physiol. Rev.* **78**, 1109–1129 (1998).
19. Pintard, L., Willems, A. & Peter, M. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J.* **23**, 1681–1687 (2004).
20. Arroyo, J.P. *et al.* Nedd4–2 modulates renal Na^+-Cl^- cotransporter via the aldosterone-SGK1-Nedd4–2 pathway. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1707–1719 (2011).
21. Ko, B. *et al.* RasGRP1 stimulation enhances ubiquitination and endocytosis of the sodium-chloride cotransporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F300–F309 (2010).
22. Boyden, L.M. *et al.* Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* **482**, 98–102 (2012).

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche Scientifique (UMRS) 970, Paris–Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC), Paris, France. [2]Faculty of Medicine, Université Paris Descartes, Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur (PRES) Sorbonne Paris Cité, Paris, France. [3]Département de Génétique, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Paris, France. [4]INSERM, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1087, Institut du Thorax, Université de Nantes, Nantes, France. [5]Faculty of Medicine, Université de Nantes, Nantes, France. [6]Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Équipe de Recherche Labellisée (ERL) 3147, Nantes, France. [7]Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CGR) and Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. [8]Public Health and Epidemiology Network Biomedical Research Center (CIBERESP), Barcelona, Spain. [9]CNRS, UMR 144, Institut Curie, Paris, France. [10]CNRS, UMR 8199, Lille Pasteur Institute, Lille, France. [11]Faculty of Medicine, Lille Nord de France University, Lille, France. [12]Département de Pédiatrie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Charles Nicolle, Université de Rouen, Rouen, France. [13]CHU de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble, France. [14]Département de Nephrologie, Hopital Foch, Suresnes, France. [15]Service de Néphrologie, CHU de Nice, Hôpital Pasteur, Nice, France. [16]Faculty of Medicine, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France. [17]Service d'Hypertension et Médecine Vasculaire, AP-HP, HEGP, Paris, France. [18]Service d'Explorations Fonctionnelles Rénales, AP-HP, HEGP, Paris, France. [19]INSERM, UMR S872–Institut des Cordeliers, Paris, France. [20]Nephrology Department, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpétrière, Paris, France. [21]Department of General Pediatrics, University Children's Hospital Münster, Münster, Germany. [22]Services de Néphrologie et Néphrologie Pédiatrique, AP-HP, Hôpital Necker, Paris, France. [23]INSERM, U507, Hôpital Necker, Paris, France. [24]Departement de Pediatrie, Hotel Dieu de France, Beirut, Lebanon. [25]Service de Cardiologie Nantes, CHU de Nantes, Institut du Thorax, Nantes, France. [26]CHU de Dijon, Centre de Génétique, Dijon, France. [27]Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, Dijon, France. [28]Centre for Nephrology, University College London Medical School, Royal Free Campus and Hospital, London, UK. [29]Faculty of Medicine, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. [30]McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA. [31]Cardiology, Department of Specialties of Internal Medicine, Geneva University, Geneva, Switzerland. [32]Genomic and Epigenomic Variation in Disease Group, CGR and Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. [33]Clinical Pharmacology and The Genome Centre, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, UK. [34]A full list of members is provided in the **Supplementary Note**. [35]Service d'Anatomo Pathologie, AP-HP, HEGP, Paris, France. [36]Department of Health and Life Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. [37]Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, UK. [38]These authors contributed equally to this work. [39]These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to X.J. (xavier.jeunemaitre@inserm.fr).

ONLINE METHODS

Study subjects. Affected individuals were recruited at the Department of Genetics of the Hôpital Européen Georges Pompidou as well as at other Departments of Nephrology located in France, Canada, Germany, UK and Lebanon. Genetic testing and research was performed according to the French ethic law published in 2001 (articles L.1110-4 al 1 CSP and R 1131-14 CSP). Hypertensive patients were involved through the following ethics committee: Comité de Protection des Personnes (CPP), Paris-Cochin. Informed written consent was obtained from all study participants.

Linkage analyses. Linkage in Ped01 was analyzed using markers generated by the 250K Affymetrix array. We excluded non-polymorphic and low-frequency (minor allele frequency (MAF) < 0.1) SNPs. To decrease the SNPs list to a manageable set of 49,187 SNPs for linkage analysis, we applied a filter using the Baysian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier (BRLMM) and have only analyzed SNPs with BRLMM = 0.15. We applied the 1 Mb to 1 centimorgan conversion before analysis as recommended[23]. Checks for Mendelian errors and parametric linkage analyses were computed by MERLIN[24] under a rare dominant model with full penetrance (100%) and a disease allele frequency of 0.0005. In Ped02, we used microsatellites (ABI PRISM Linkage Mapping Set Version 2; Applied Biosystems) that were generated by PCR and loaded on an ABI3730 sequencer (Applied Biosystems). Genotypes were analyzed using GeneMapper Software v4.0 (Applied Biosystems). Multipoint parametric linkage analyses were performed with SimWalk2 v2.91 (ref. 25) to avoid family size restriction through easyLINKAGE Plus software (version 5.08)[26] under an autosomal dominant model with 80% penetrance and a disease allele frequency of 0.001.

Whole-exome sequencing

Ped01. Capture and sequencing were performed as described[27]. Briefly, coding exons from 3 µg of genomic DNA were captured using the Agilent SureSelect Human All Exon kit, following the manufacturer's protocol. DNA was sheared by acoustic fragmentation (Covaris) and purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), and fragment quality was assessed (Agilent 2100 Bioanalyzer). The exome library was sequenced on the Illumina Genome Analyzer IIx in 76-bp paired-end reads using two channels in order to reach a mean depth of coverage of at least 100× (ref. 27). Sequence reads were mapped to the human reference genome (UCSC NCBI36/hg18) using ELANDv2 software (Illumina). Variant detection was performed with CASAVA software (version 1.6; Illumina), and candidate variants were filtered to have a CASAVA quality threshold of 10 and depth of 86. CASAVA filtered out duplicate reads and reads without matched pairs. The efficiency of the capture was, on average, 93.3% (with the percentage of regions mean coverage > 8×).

Ped02. DNA (3 µg) was used to build a shotgun sequencing library. Exome capture was carried out using the SureSelect Human All Exon System using the manufacturer's protocol version 1.0 that is compatible with Illumina paired-end sequencing. Exome-enriched genomes were multiplexed by flow cell for 101-bp paired-end read sequencing according to the protocol for the Hiseq 2000 sequencer (version 1.7.0; Illumina) to allow a minimum coverage of 30×. Reads were aligned to the human reference genome (UCSC NCBI36/hg19) using the Burrows-Wheeler Aligner (version 0.5.9). Functional annotation of high-quality variants was performed using Annovar[28], thereby comparing predicted variants to the dbSNP132 and 1000 Genomes Project data sets, identifying conservation around variants with phastCons[29], applying a segmental duplication filter, generating gene annotation (exon-intron-UTR) and identifying amino-acid substitutions and splice-site variants on the basis of UCSC Genome Browser tracks, as well as creating multiple estimates of the impact of amino-acid substitutions on the structure and function of proteins. Functionality predictions were assessed with PolyPhen-2 (ref. 30), SIFT[31] and MutPred[32].

Direct sequencing of *KLHL3* was performed using the primers listed in **Supplementary Table 6**.

International Consortium on Blood Pressure *in silico* analysis. Data sets and methods have been described previously[33]. Briefly, we looked at the association of all common variants (MAF > 0.01) located in *KLHL3* and the intergenic regions upstream and downstream of *KLHL3* with systolic and diastolic blood pressure in meta-analyses in up to 69,395 individuals of European ancestry. In individual cohorts, association was assessed using linear regression adjusted for age, gender, body mass index and principal components, when applicable.

Modeling. A model of the KLHL3 kelch domain was generated on the basis of its similarity (82% identity) with the kelch domain of KLHL2 (Protein Data Bank (PDB) 2xn4) using the MODELLER program[34]. Similarly, a model of the BTB-BACK domain of KLHL3 was generated on the basis of its similarity (29% identity) to the BTB-BACK domain of KLHL11 (PDB 3i3n).

Quantitative RT-PCR. The pattern of expression of *KLHL3* in a panel of human tissues (BD Clontech) was established by qRT-PCR with intercalation of SYBR Green (Eurogentec) using the $2^{\Delta C_T}$ formula, with 18S ribosomal RNA as the reference gene. qRT-PCR on mouse microdissected nephron segments from six adult males was performed as previously described[35], with *Ubc* (encoding ubiquitin-C) as the reference gene. Primer sequences are given in **Supplementary Table 6**.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded mouse kidney sections using rabbit antibodies to KLHL3 (Proteintech, 16951-1-AP) or NCC (a gift from D. Ellison, Oregon Health and Science University) and ABC Peroxidase Staining (Vector Laboratories).

Plasmids. pcDNAF-mNCC was generated by subcloning the untagged mouse cDNA encoding NCC into pcDNAF, derived from pcDNA3.1 (Life Technologies), by deletion of the *neo*^{r} cassette. A second plasmid was a gift from D. Alessi (University of Dundee)[36] and encoded Flag-tagged human NCC. A pCMV6-mKLHL3 (Origene) plasmid encoded Myc- and Flag-tagged mouse KLHL3. We deleted the Flag tag by subcloning the HindIII-EcoRV digestion fragment of pCMV6-mKLHL3 into the same plasmid digested with HindIII-PmeI.

Cell culture and transfection. HEK 293T or mDCT cells were grown either in DMEM or DMEM/F12 medium (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; AbCys), 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine. For expression of NCC, HEK 293T or mDCT cells were transfected using either FuGENE6 (Roche) or Effectene (Qiagen) following the manufacturer's instructions. For silencing experiments, HEK 293T or mDCT cells were transfected with siRNA targeting *KLHL3* (a specific SMARTpool that was chemically synthesized by Dharmacon) twice at 24-h intervals using RNAimax (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Cells were incubated in hypotonic buffer as described previously[36].

Immunofluorescence. Cells grown on 12-mm coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. To study KLHL3 localization and association with actin, cells were permeabilized with 0.05% saponin before staining. To study NCC and KLHL3 membrane localization, cells were directly processed for immunofluorescence as previously described[37]. The following primary antibodies were used: rabbit antibody to KLHL3 (1:200; AbCam, AB86390) and rabbit antibody to NCC (1:200; Millipore, AB3553). Fluorescently coupled secondary antibodies were obtained from Jackson Immunoresearch. Coverslips, mounted in Mowiol, were examined under a three-dimensional deconvolution microscope (Leica, DM-RXA2) equipped with a piezo z-drive (Physik Instrument) and a 100× 1.4 NA-PL-APO objective lens for optical sectioning. Three-dimensional multicolor image stacks were acquired using Metamorph software (MDS) through a cooled charge-coupled device (CCD) camera (Photometrics Coolsnap HQ). For deconvolution, cell images were acquired as described previously[38].

Quantification of fluorescence intensity. Images of 83–220 cells per condition were acquired using the same parameters, without automatic scaling and gain adjustment and avoiding saturated pixels. NCC or KLHL3 absolute intensity fluorescence at the cell surface area, defined by actin labeling, was measured using ImageJ software (NIH Image).

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.

ELISAs. HEK 293 cells treated with control or *KLHL3* siRNA and then transfected with pcDNAF-NCC were seeded into polyallylamine-coated 96-well plates. After 24 h, cells were treated with 50 µl of normal or hypotonic buffer for 30 min at 37 °C and then placed at 4 °C. After blocking for 30 min in cold 1% BSA in PBS, cells were incubated with rabbit antibody to NCC or KLHL3 in 50 µl of 1% BSA in PBS for 6 h at 4 °C. Cells were fixed for 30 min by direct addition of 50 µl of cold 8% paraformaldehyde to the medium and were washed with PBS. Staining was quenched for 15 min at room temperature with 50 mM NH_4Cl in PBS. After several washes in PBS, cells were incubated with horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody (1:10,000) in 50 µl of 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature. After three washes with PBS, 50 µl of 3,3′,5,5′ tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for Membranes (Sigma Aldrich, T0565), pre-equilibrated to room temperature, was added to the wells for ~30 min (until a blue color developed). The reaction was stopped with an equal volume of 2 N HCl, and the optical density at 515 nm was determined on a plate reader. To normalize for cell density, the reading for TMB-HCl alone was subtracted from sample reads, and cells were incubated for at least 15 min at room temperature in 50 µl of 0.3% Janus Green B. After extensive washing with distilled water, 100 µl of 2 N HCl was added to each well, and plates were incubated at room temperature for at least 1 h to dissolve the Janus Green B. The optical density at 595 nm was then measured. The fact that we failed to detect a signal above background with an antibody raised against the cytosolic protein Rab6 showed the specificity of our assay. Conversely, we obtained a strong signal with an antibody directed against the transferrin receptor, which was not affected by incubation in the hypotonic medium.

Coimmunoprecipitation. After 48 h of transfection with plasmids expressing tagged KLHL3 and NCC, cells were incubated in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.27 M sucrose, 0.1% 2-mercaptoethanol and protease inhibitors (1:100 dilution of Protease Inhibitors Cocktail (Sigma-Aldrich)) for 1 h on ice. Lysates were clarified by centrifugation at 4 °C for 10 min at 1,000*g*. The Flag-tagged proteins were affinity purified by overnight incubation with anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma Aldrich) (500–1,000 µg of cell lysate with 40 µl of suspension). After three washes in 1 ml of ice-cold lysis buffer without 2-mercaptoethanol, the bound proteins were eluted by incubation for 5 min at 95 °C in SDS-PAGE sample buffer (5×; 0.47 M sucrose, 10% SDS, 5 mM EDTA, 300 mM Tris, pH 8.8, 0.25% Bromophenol blue and 130 mM DTT). Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes (0.45 µm) for 2 h and incubated with mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (1:2,000; Sigma Aldrich) or with antibody to c-Myc (1:1,000; Roche Applied Science, clone 9E10, F1804).

23. Ulgen, A. & Li, W. Comparing single-nucleotide polymorphism marker-based and microsatellite marker-based linkage analyses. *BMC Genet.* **6** (suppl. 1), S13 (2005).
24. Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O. & Cardon, L.R. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* **30**, 97–101 (2002).
25. Sobel, E. & Lange, K. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am. J. Hum. Genet.* **58**, 1323–1337 (1996).
26. Lindner, T.H. & Hoffmann, K. easyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses. *Bioinformatics* **21**, 405–407 (2005).
27. Bonnefond, A. *et al.* Molecular diagnosis of neonatal diabetes mellitus using next-generation sequencing of the whole exome. *PLoS One* **5**, e13630 (2010).
28. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**, e164 (2010).
29. Siepel, A. *et al.* Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* **15**, 1034–1050 (2005).
30. Adzhubei, I.A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
31. Ng, P.C. & Henikoff, S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3812–3814 (2003).
32. Li, B. *et al.* Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* **25**, 2744–2750 (2009).
33. Ehret, G.B. *et al.* Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* **478**, 103–109 (2011).
34. Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins* **23**, 318–326 (1995).
35. Cheval, L. *et al.* Atlas of gene expression in the mouse kidney: new features of glomerular parietal cells. *Physiol. Genomics* **43**, 161–173 (2011).
36. Richardson, C. *et al.* Activation of the thiazide-sensitive Na^+-Cl^- cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J. Cell Sci.* **121**, 675–684 (2008).
37. Del Nery, E. *et al.* Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* **7**, 394–407 (2006).
38. Loïodice, I. *et al.* The entire Nup107–160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3333–3344 (2004).

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.

doi:10.1038/ng.2218

Corrigendum: *KLHL3* mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron

Hélène Louis-Dit-Picard, Julien Barc, Daniel Trujillano, Stéphanie Miserey-Lenkei, Nabila Bouatia-Naji, Olena Pylypenko, Geneviève Beaurain, Amélie Bonnefond, Olivier Sand, Christophe Simian, Emmanuelle Vidal-Petiot, Christelle Soukaseum, Chantal Mandet, Françoise Broux, Olivier Chabre, Michel Delahousse, Vincent Esnault, Béatrice Fiquet, Pascal Houillier, Corinne Isnard Bagnis, Jens Koenig, Martin Konrad, Paul Landais, Chebel Mourani, Patrick Niaudet, Vincent Probst, Christel Thauvin, Robert J Unwin, Steven D Soroka, Georg Ehret, Stephan Ossowski, Mark Caulfield, International Consortium for Blood Pressure (ICBP), Patrick Bruneval, Xavier Estivill, Philippe Froguel, Juliette Hadchouel, Jean-Jacques Schott & Xavier Jeunemaitre
Nat. Genet. **44, 458–462 (2012); published online 11 March 2012; corrected after print 22 March 2012**

In the version of this article initially published, two references were omitted, resulting in several statements being incorrectly attributed in the Online Methods. In the 'Ped01' subsection of the 'Whole-exome sequencing' section, two statements were attributed to ref. 21. The correct reference for these statements has been added as ref. 27. In the 'Ped02' subsection of the 'Whole-exome sequencing' section, Annovar was incorrectly attributed to ref. 22. The correct reference has been added as ref. 28. As a result of the addition of these two references, former refs. 27–36 have been renumbered as refs. 29–38, respectively, in the text and reference list. In addition, author affiliation 7 was incorrectly given as Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CGR), Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. The correct affiliation is Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CGR) and Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. Similarly, affiliation 32 was incorrectly given as Genomic and Epigenetic Variation in Disease Group, Center for Genomic Regulation, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain. The correct affiliation is Genomic and Epigenetic Variation in Disease Group, CGR and Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. These corrections have been made in the HTML and PDF versions of the article.

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.