Conference Report

*Alberto Bettinelli, M.D.*
Director of the Department of Pediatrics, S. Lepoldo Mandic Hospital, Merate (Lecco). Previously M.D. at the Department of Pediatric Dialysis, De Marchi Clinic of the University of Milan

*Silvana Tedeschi, PhD*
Laboratory of Medical Genetics, Istituti Clinici di Perfezionamento, Milan

Conference date and venue: 6 February 2003, "P. Balestrazzi Hall", Faculty of Medicine, University of Parma, Parma. Introduced by Prof. Anita Ammenti

# Hypokalemia and hypomagnesemia of hereditary renal tubular origin. Bartter and Gitelman syndromes

In 1962 Bartter et al. (1) described 2 normotensive patients with hyperaldosteronism and hyperplasia of the iuxtaglomerular apparatus, metabolic alkalosis, hyperreninemia and resistence to the pressor effects of angiotensin II. Four years later Gitelman et al. (2) observed 3 adults with muscle weakness due to potassium deficiency and chronic dermatitis attributed to magnesium deficiency secondary to urinary magnesium loss. All 3 patients had hyperaldosteronism and hyperreninemia. They also had hypocalciuria although this findings was disregarded for many years. Additional signs and symptoms reported in hypomagnesemic and hypokalemic patients were tetanic episodes, paresthesias and joint pain with chondrocalcinosis. Two patients with Bartter syndrome (BS) and hypercalciuria, in whom nephrocalcinosis was later detected were described by Fanconi et al. (3) in 1971. In the period 1975-1985 many studies investigated the pathogenesis of BS. A defect in NaCl reabsorption in the loop of Henle was considered the initial cause of the abnormalities in BS. In 1985 Seyberth et al (4) focused on a prenatal form of BS characterized by polyhydramnios leading to premature delivery, and marked hypercalciuria resulting in nephrocalcinosis. The same Authors also demonstrated that one of the hallmarks of all forms of BS is renal hyperprostaglandinism; the pathogenesis of this altera-

# *Ipopotassiemie ed ipomagnesiemie di origine renale tubulare. Le sindromi di Bartter e di Gitelman*

*Nel 1962 Bartter e coll. (1) descrissero 2 pazienti normotesi con iperaldosteronismo ed iperplasia dell'apparato iuxtaglomerulare, alcalosi metabolica, iper-reninemia e resistenza agli effetti pressori dell'angiotensina II. Quattro anni dopo Gitelman e coll. (2) osservarono 3 adulti con astenia muscolare dovuta ad ipopotassiemia associata a dermatite cronica attribuita ad ipomagnesiemia secondaria a perdita urinaria di magnesio. Tutti e 3 i pazienti avevano iperaldosteronismo ed iper-reninemia. Essi inoltre erano ipocalciurici, sebbene questa caratteristica fu per molti anni trascurata. Ulteriori segni e sintomi riportati nei pazienti con ipomagnesiemia ed ipopotassiemia erano rappresentati da tetania, parestesie, dolori articolari e condrocalcinosi. Due pazienti con sindrome di Bartter (BS) ed ipercalciuria, in cui venne più tardi riscontrata nefrocalcinosi, furono descritti da Fanconi e coll. (3) nel 1971. Nel periodo 1975-1985 molti studi investigarono la patogenesi della BS. La causa primitiva delle anomalie presenti nella BS fu considerata nel difetto di riassorbimento di NaCl nell'ansa di Henle. Nel 1985 Seyberth e coll. (4) segnalarono la forma prenatale di BS caratterizzata da polidramnios, parto pre-termine, marcata ipercalciuria risultante in nefrocalcinosi. Gli stessi Autori dimostrarono anche che una delle caratteristiche di tutte le forme di BS era rappresentata dall'iperprostaglandinismo; la patogenesi di questa alterazione necessita di una estensiva spie-*

tion needs an extensive explanation. In the period 1985-1990 it became even clearer that the so-called BS was in fact a heterogeneous group characterized by primary renal tubular disorders associated with hypokalemic metabolic alkalosis and hyperreninemia with normotension. In some cases prenatal-neonatal diagnosis was possible in the presence of important signs and symptoms such as polyhydramnios, polyuria and dehydration. In other patients diagnosis was made during childhood due to the appearance of tetanic crises or growth failure. Other subjects were completely asymptomatic and the diagnosis was made in adolescent or adult life following blood tests prescribed for intercurrent diseases. In 1987 Rodriguez Soriano et al. (5) observed that in the patients reported by Gitelman et al more than 20 years earlier (2), in addition to hypokalemia and hypomagnesemia of renal tubular origin, the striking finding was a decrease of urinary calcium excretion. The authors speculated that the dissociation of renal calcium from magnesium transport, the moderate degree of sodium, chloride and potassium wasting, the exaggerated natriuresis and kaliuresis after furosemide, all pointed to a hereditary defect in the distal tubule, which closely resembles the effect of chronic administration of a thiazide diuretic. This finding, i.e. hypocalciuria, offers a differential criterion from BS. The latter might caused by an intrinsic impairment of NaCl reabsorption in the ascending limb of the loop of Henle, which mimics the effects of Henle loop diuretics (furosemide, bumetanide). We evaluated the diagnostic values of calcium excretion levels in 34 pediatric patients with primary renal tubular hypokalemic metabolic alkalosis, divided into 2 groups: BS was hypothesized in 18 patients with normal-high molar urinary calcium/creatinine ratio and Gitelman syndrome in 16 with a low ratio and hypomagnesemia (6). Some clinically important differences were observed. Patients with a diagnosis of BS were often born after pregnancies complicated by polyhydramnios, were delivered prematurely, and had growth failure, polyuria and polydipsia. Patients with GS had tetanic episodes at school age. We concluded that BS and GS are 2 distint variants of primary renal tubular hypokalemic alkalosis and are distinguished on the basis of urinary calcium levels. A new recent definition of reference values for hypocalciuria was published: values of molar urinary

*gazione. Nel periodo 1985-1990 divenne sempre più chiaro che la cosiddetta BS risultava in un gruppo eterogeneo di malattie tubulari renali con alcalosi metabolica ipopotassiemica, iper-reninemia e normotensione. In alcuni casi una diagnosi prenatale-neonatale era possibile in presenza di importanti segni e sintomi quali polidramnios, poliuria e disidratazione. In altri pazienti la diagnosi veniva effettuata nell'infanzia per la comparsa di crisi tetaniche o ritardo di crescita. Altri soggetti erano completamente asintomatici e la diagnosi veniva formulata nell'adolescenza o nell'età adulta in seguito ad esami ematologici prescritti per malattie intercorrenti. Nel 1987 Rodriguez Soriano e coll. (5) osservarono che nei pazienti riportati da Gitelman più di 20 anni prima (2) in aggiunta all'ipopotassiemia ed ipomagnesiemia di origine renale tubulare, la caratteristica principale era rappresentata dall'ipocalciuria. Gli autori specularono che la dissociazione del trasporto del calcio da quello del magnesio, la moderata perdita di sodio, cloro e potassio, e l'esagerata natriuresi e kaliuresi dopo furosemide erano in accordo con un difetto ereditario nel tubulo distale, che assomigliava all'effetto secondario alla somministrazione cronica di diuretici tiazidici. L'ipocalciuria offre un criterio differenziale dalla BS. Quest'ultima poteva essere causata da un difetto intrinseco nel riassorbimento di NaCl nel tratto ascendente dell'ansa di Henle che assomiglia all'effetto di diuretici dell'ansa (furosemide, bumetanide). Abbiamo valutato il valore diagnostico dell'escrezione del calcio in 34 pazienti pediatrici con ipopotassiemia primitiva renale-tubulare ed alcalosi metabolica, divisi in 2 gruppi: la BS veniva ipotizzata in 18 pazienti con valori normali elevati del rapporto molare urinario calcio/creatinina mentre una GS veniva ipotizzata in 16 pazienti con ipocalciuria ed ipomagnesiemia (6). Venivano rilevate importanti differenze cliniche nei 2 gruppi. I pazienti con una diagnosi di BS erano spesso nati prematuramente, dopo gravidanze complicate con polidramnios e presentavano ritardato accrescimento, poliuria e polidipsia. I pazienti con GS avevano presentato crisi tetaniche in età scolare. Le conclusioni erano che le sindromi di BS e GS rappresentavano 2 diverse varianti di alcalosi ipopotassiemica renale tubulare e che erano distinguibili sulla base dell'escrezione urinaria di calcio. Una nuova recente definizione dei valori di riferimento per l'ipocalciuria è stata recentemente pubblicata: valori di rapporto molare urinario calcio/creatinina <0.27 (cioè 0.010 in mg/mg) per lattanti e inferiori a 0.12 (cioè*

calcium/creatinine <0.27 (i.e. 0.010 in mg/mg) for infants and <0.12 (i.e. 0.044 mg/mg) for children >5 years were suggested to define the hypocalciuria (7).

**The molecular approach** originated from the observation of similar biochemical features in patients with GS and BS and subjects receiving thiazide and Henle loop diuretics respectively.

Initially, it was possible to identify the protein altered in GS and the gene SLC12A3 coding for this cotransporter (8, 9). Successively, all the genes encoding proteins found altered in BS type I, II and III were cloned (10-13). All the four genes exhibit autosomal recessive inheritance trait.

The identification of mutations in the SLC12A3 gene clarified the molecular basis of GS. Defects in the thiazide-sensitive Na+/Cl- cotransporter (NCCT) are caused by mutations, leading to impaired reabsorption of sodium chloride in the distal convoluted tubule and responsible for the Gitelman phenotype. The exon-intron organization of the SLC12A3 gene has been determined and revealed that the human NCCT is encoded by 26 exons. Sequence analysis predicted a protein composed by 1021 aminoacids, distributed in 12 putative transmembrane domains with intracellular amino- and carboxytermini. Various loss of function mutations have been detected in affected individuals but not in normal controls. The mutations include single base substitutions affecting either residues highly conserved among the species or splice sites that probably cause exon skipping. Nonsense mutations (premature stop codon) as well as deletions/insertions leading to a frameshift were identified. Frameshift, nonsense and splice site mutations lead to truncated proteins whereas the effect of missense mutations remains to be investigated in functional tests.

In contrast to GS, BS exhibits a vast genetic heterogeneity because the two antenatal forms (Bartter type I and II) and the classic Bartter Syndrome (type III) are caused by mutations affecting three different genes: SLC12A1, KCNJ1 and CLCNKB expressed in the thick ascending limb of Henle. They respectively encode the Na+/K+/2Cl- co-transporter (NKCC2), the renal potassium channel (ROMK) and the renal chloride channel (ClC-Kb). All these transmembrane proteins have similar structure, with transmembrane domains and intracellular amino- and carboxytermini.

*0.044 mg/mg ) per bambini sopra ai 5 anni sono stati proposti per definire l'ipocalciuria (7).*

***L'approccio molecolare** è originato dall'osservazione di alterazioni biochimiche simili in pazienti con GS e BS e soggetti che ricevevano terapia rispettivamente con diuretici tiazidici e dell'ansa.*

*Inizialmente, è stato possibile identificare la proteina alterata nella GS ed il gene SLC12A3 che codifica per questo cotrasportatore (8, 9). Successivamente, sono stati clonati tutti i geni codificanti le proteine trovate alterate nella BS tipo I, II e III (10-13). Per i quattro geni sono state osservate modalità di trasmissione autosomica recessiva. L'identificazione di mutazioni del gene SLC12A3 hanno permesso di chiarire le basi molecolari della GS. Difetti del cotrasportatore Na+/Cl- tiazide-sensibile (NCCT) sono causati da mutazioni che alterano il riassorbimento di sodio cloruro nel tubulo convoluto distale e sono responsabili del fenotipo Gitelman. È stata definita l'organizzazione introne-esone del gene SLC12A3 da cui è emerso che l'NCCT umano è codificato da 26 esoni. L'analisi di sequenza prevede una proteina composta da 1021 aminoacidi distribuiti in 12 domini putativi transmembrana con estremità amino e carbossiterminale intracellulari. Varie mutazioni con perdita di funzione della proteina sono state identificate in individui affetti ma mai in controlli normali. Le mutazioni sono sostituzioni di singole basi a carico di residui altamente conservati attraverso le speci o a carico di siti di splicing che portano probabilmente ad un salto di esone. Sono state identificate anche mutazioni nonsense che creano un codone di stop prematuro così come delezioni/inserzioni che causano un frameshift (slittamento di lettura). Mutazioni frameshift, nonsense e su siti di splicing portano a proteine tronche mentre l'effetto delle mutazioni missense deve essere ancora analizzato con test funzionali.*

*A differenza della GS, la BS mostra un'ampia eterogeneità genetica poiché le due forme antenatali (tipo I e II) e la forma classica della sindrome di Bartter (tipo III) sono causate da mutazioni che colpiscono tre diversi geni: l'SLC12A1, il KCNJ1ed il CLCNKB espressi nel tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle. Codificano rispettivamente per il cotrasportatore Na+/K+/2Cl- (NKCC2), i canali renali del potassio (ROMK) e del cloro (ClC-Kb). Tutte queste proteine transmembrana presentano una struttura simile, con domini transmembrana ed estremità amino e carbossiterminali intracellulari. L'ana-*

Molecular analysis demonstrated characteristic mutational patterns for each gene. In GS and BS type I the majority of variants are represented by missense mutations (aminoacid substitutions) with no preferential mutation hot spot along the transmembrane protein. A particularity was demonstrated in the ROMK channel (Bartter type II) that is encoded by five exons producing five distinct transcripts. Almost all mutations reported so far in the KCNJ1 gene are located in exon 5 and alter all predicted isoforms of the channel. The CLCNKB gene presents a high degree of homology (94%) with CLCNKA, a gene located 11kb apart from CLCNKB, coding for another channel member of the vast ClC family. The closeness causes unequal crossing-over that results in frequent homozygous deletions of the entire gene with significantly impaired transport of chloride across the basolateral membrane through the chloride channel ClC-Kb.

**Treatment.** If great recent advances are obtained in the molecular genetics knowledges of these diseases, the treatment has remained quite the same of about 20 years ago. In neonates and infants with BS large amounts of fluids and electrolytes are given by intravenous or oral routes. The amount required in a stable condition may be extimated approximately 3 mmol/kg body weight of both sodium and potassium chloride. If the growth is insufficient and/or hypokalemia relevant (especially <3 mmol/l) Indomethacin is the first drug of choice; the dose remain to be tested for each patient (from 0.5 to 5 mg/kg/day in 3 doses); such a drug is contraindicated by many Authors under 6 months of age. The appearance of gastroenteric side effects contraindicates Indomethacin in many patients. Other antiprostaglanding drugs may be used (recently rofecoxib has been also proposed) Other than KCl and magnesium supplementations, the main drugs utilized in GS (where hyperprostaglandinism is not present) are: spironolactone (50-200 mg/day) or amiloride (10-30 mg/day). The use of these antialdosteronic drugs is able to obtain an increase of serum potassium of about 0.5 mmol/L.

**Prognosis**. Up to now only one long-term study on GS is available on a large group of patients which demonstrates a reduced health quality of life for GS patients compared to a control group (14). In BS, the main possible complication is represented by renal failure, referred in a few patients.

*lisi molecolare ha dimostrato pattern mutazionali caratteristici per ogni gene. Nella GS e nella BS tipo I, la maggior parte delle varianti è rappresentata da mutazioni missense (sostituzioni di aminoacidi) senza hot spot preferenziale di mutazione lungo la proteina transmembrana. Una peculiarità è stata dimostrata nel canale ROMK (Bartter tipo II), il quale è codificato da 5 esoni che producono 5 trascritti diversi. Quasi tutte le mutazioni riportate finora nel gene KCNJ1 sono localizzate nell'esone 5 ed alterano tutte le isoforme predette del canale. Il gene CLCNKB presenta un alto grado di omologia (94%) con il CLCNKA, un gene localizzato a 11kb dal CLCNKB, che codifica per un altro canale, membro della grande famiglia dei ClC. La vicinanza causa crossing over ineguali che portano a frequenti delezioni in omozigosi dell'intero gene con significativo danno al trasporto di cloro attraverso la membrana basolaterale tramite il canale del cloro ClC-Kb.*

***Terapia.*** *Se grandi avanzamenti sono stati ottenuti nelle conoscenze di genetica molecolare di queste malattie, la terapia è rimasta essenzialmente la stessa di circa 20 anni fa. Neonati e lattanti affetti da BS necessitano di grandi quantità di liquidi ed elettroliti e.v. o per os. In condizioni di stabilità la quantità di elettroliti richiesta può essere stimata approssimativamente di 3 mmol/kg di Na e KCl. Se la crescita risulta insufficiente e/o l'ipokaliemia è rilevante (specie se <3 mmol/l), l'Indometacina rimane il farmaco di prima scelta; le dosi vanno testate per ciascun paziente (variabili da 0.5 a 5 mg/kg/die); tale farmaco viene controindicato da molti Autori al di sotto dei 6 mesi. La comparsa di effetti collaterali a livello dell'apparato gastroenterico ne controindicano l'uso in molti pazienti. Altri farmaci antiprostaglandinici possono essere usati (recentemente è stato proposto anche il rofecoxib). Nella GS (dove l'iperprostaglandinismo non è in genere presente), oltre a supplementazioni di NaCl e magnesio, i farmaci maggiormente utilizzati sono lo spironolattone (50-200 mg/die) o l'amiloride (10-30 mg/die). L'uso di questi farmaci antialdosteronici è in grado di ottenere un aumento dei valori serici di potassio di circa 0.5 mmol/l.*

***Prognosi.*** *Fino al momento attuale solo uno studio su un largo gruppo di pazienti con GS è disponibile; viene dimostrata una ridotta qualità di vita rispetto ad un gruppo di controlli (14). In pazienti con BS la maggiore possibile complicanza, riferita in alcuni pazienti è rappresentata dall'insufficienza renale.*

**References**


1. Bartter FC, Pronome P, Gill JR, MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: a new sindrome. *Am J Med* 1962; 33: 811-28.
2. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1966; 79: 221-35.
3. Fanconi A, Schachenmann G, Nussli R, Prader A. Chronic hypokalemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism ("Bartter's syndrome"), and hypercalciuria: report of two cases with emphasis on natural history and on catch-up growth during treatment. *Helv Paed Acta* 1971; 26: 144-63.
4. Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, et al. Congenital hypokaemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediatr* 1985; 107: 694-701.
5. Rodriguez-Soriano JA, Vallo A, Garcia-Fuentes M. Hypomagnesemia of hereditary origin. *Pediatr Nephrol* 1987; 1: 465-72.
6. Bettinelli A, Bianchetti MG, Girardin E, et al. Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primari renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes 1992; 120: 38-43.
7. Bianchetti MG, Edefonti A, Bettinelli A. The biochemical diagnosis of Gitelman disease and the definition of "hypocalciuria". *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 409-11.
8. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, et al. Gitelman's variant of Bartter syndrome, inherited hypokalemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 1996; 12: 24-30.
9. Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, et al. Molecular cloning, expression pattern and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). Genomics 1996; 35: 486-93.
10. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, Di Pietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 1996; 13: 183-8.
11. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, et al. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K+ channel, ROMK. *Nat Genet* 1996; 13: 183-8.
12. Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* 1997; 17: 171-8.
13. Shuck ME, Bock JH, Benjamin CW, et al. Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROM-K potassium channel. *J Biol Chem* 1994; 269, 39: 24261-70.
14. Cruz DN, Shaer AJ, Bia MJ, et al. Gitelman's syndrome revisited: an evaluation of symptoms and health-related quality of life. *Kidney Int* 2001; 59: 710-7.