

## MUTAZIONI NEL GENE *TRPC6* IN BAMBINI AFFETTI DA SINDROME NEFROSICA STEROIDO-RESISTENTE

Maddalena Gigante<sup>1</sup>, Gianluca Caridi<sup>2</sup>, Eustacchio Montemurno<sup>1</sup>, Roberta Trunzo<sup>1</sup>, Annalisa Schirinzi<sup>1</sup>, Filippo Aucella<sup>3</sup>, Giovanni Messina<sup>4</sup>, Laura Massella<sup>5</sup>, Elena Ranieri<sup>1</sup>, Gian Marco Ghigeri<sup>2</sup>, Loreto Gesualdo<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia, Foggia

<sup>2</sup>Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Istituto Giannina Gaslini IRCCS, Genova

<sup>3</sup>Divisione di Nefrologia, Casa Sollievo della Sofferenza IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>4</sup>Divisione di Nefrologia, Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, Università di Bari, Bari

<sup>5</sup>Dipartimento di Nefrologia e Urologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>6</sup>Divisione di Nefrologia, Università degli Studi di Bari, Bari

La scoperta dei geni coinvolti nello sviluppo e nella funzione del podocita è stata cruciale per comprendere i meccanismi alla base delle malattie renali glomerulari, caratterizzate da vari gradi di proteinuria e, in alcuni casi, da una rapida progressione verso l'insufficienza renale terminale (1). L'elenco dei geni coinvolti nella sindrome nefrosica è in rapida crescita (*NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *PLCE1*, *CD2AP*, *ACTN4*, *TRPC6* e *INF2*), diverse sono le proteine podocitarie implicate e diversi i meccanismi ereditari associati (2-10).

Mutazioni in eterozigosi del gene *TRPC6* sono state recentemente identificate come causa di glomerulosclerosi segmentale focale (FSGS) a esordio tardivo e con ereditarietà autosomico-dominante (8, 9, 11-13). Il gene *TRPC6* è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 11 (11q22.1) e codifica per un canale non selettivo del calcio (*Transient Receptor Potential Cation Channel 6*), associato al diaframma fenestrato della barriera di filtrazione glomerulare. La sottofamiglia *TRPC* (*TRPC1-TRPC7*) è un gruppo di canali calcio-permeabili che svolge un importante ruolo nella regolazione della concentrazione del Ca<sup>2+</sup> intracellulare in risposta all'attivazione della fosfolipasi C (PLC) e che è coinvolto in diversi meccanismi di *intracellular signalling* (14, 15). *TRPC6*, *TRPC3* e *TRPC7* sono attivati direttamente dal diacilglicerolo (DAG) in risposta ai segnali PLC-dipendenti (16). Nel rene, il gene *TRPC6* è espresso sia a livello tubulare che a livello glomerulare, con predominanza nei podociti. A oggi, a livello del gene *TRPC6*, sono state identificate 11 diverse mutazioni in 8 famiglie di diversa origine etnica e in 3 casi sporadici (8, 9, 11-13). Di queste mutazioni, 5 (R895C, E897K, P112Q, Q889K, M132T) determinano un acquisto di funzione, causando un aumento dell'influsso di calcio intracellulare; altre 3 non sembrano causare un aumento dell'influsso di calcio, anche se i dati genetici supportano un loro ruolo patogenetico; le restanti, invece, non sono state valutate con un saggio funzionale, ma solo con un approccio *in silico*. Considerando la lunghezza del gene e il costo elevato delle analisi genetiche, lo *screening* del gene *TRPC6* è effettuato solitamente nelle forme familiari con esordio tardivo di glomerulosclerosi segmentale focale a ereditarietà autosomico-dominante.

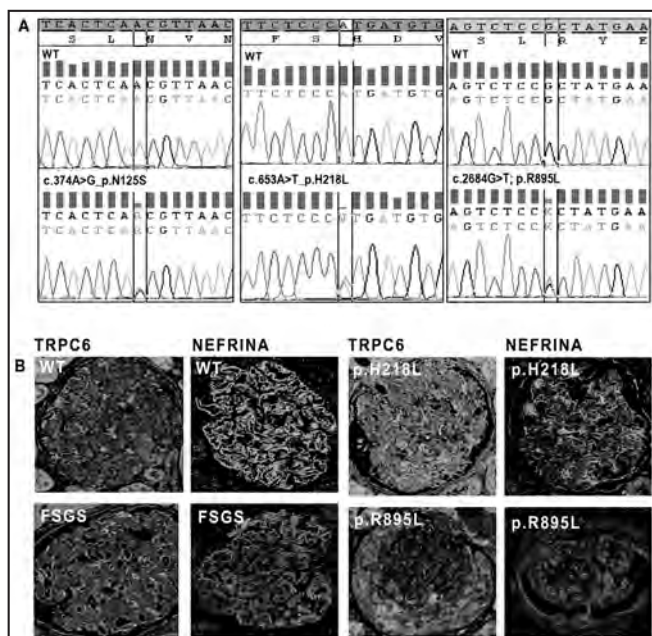
Nel nostro studio, recentemente pubblicato su CJASN (17), abbiamo dimostrato che mutazioni nel gene *TRPC6* possono essere associate anche a casi pediatrici di sindrome nefrosica steroido-resistente (SRNS) e abbiamo identificato, per la prima

volta, una mutazione *TRPC6* de novo in una grave forma pediatrica di glomerulosclerosi variante *collapsing*.

Lo studio è stato condotto su 33 pazienti italiani con esordio precoce di SRNS e su 3 famiglie di origine italiana con glomerulosclerosi segmentale focale (FSGS) con esordio tardivo ed ereditarietà autosomico-dominante. Lo *screening* di mutazione è stato effettuato mediante tecniche di PCR e sequenziamento diretto del gene, mentre l'effetto delle mutazioni identificate è stato studiato mediante approcci *in silico*, saggi funzionali *in vitro* ed esperimenti di microscopia confocale *in vivo*. In totale, abbiamo identificato 3 mutazioni *missense* (c.374A>G\_p.N125S, c.653A>T\_p.H218L, c.2684G>T\_p.R895L; Fig. 1A) in 2 casi sporadici e in 2 fratelli che hanno manifestato una sindrome nefrosica nella prima e nella seconda infanzia (Tab. I). A oggi, l'unica descrizione di una mutazione *TRPC6* in un bambino affetto da sindrome nefrosica è stata pubblicata da Heeringa et al. (13), che hanno descritto un caso familiare in cui più componenti presentavano lo stesso difetto genetico. Nel complesso, l'identificazione di 4 mutazioni *TRPC6* su una piccola coorte di 33 bambini suggerisce che questo gene potrebbe essere coinvolto, più frequentemente del previsto, in forme gravi di SRNS con esordio precoce.

Il canale del calcio *TRPC6* è costituito da 3 o 4 ripetizioni ammino-terminali di anchirina, 6 domini putativi transmembrana, una breve sequenza chiamata *TRP box*, con funzione sconosciuta, e un dominio *coiled-coil* sia nella porzione ammino-carbossi-terminale. Tutte le mutazioni identificate in questo lavoro sono localizzate in domini proteici altamente conservati e sono state classificate da due diversi approcci *in silico* come variazioni non tollerate, che potrebbero compromettere la funzione della proteina. Due delle mutazioni descritte sono localizzate nelle ripetizioni di anchirina (p.N125S, p.H218L) e una è stata localizzata nel dominio citoplasmatico (p.R895L). Negli stessi domini sono localizzate 10 su 11 delle mutazioni *TRPC6* ad oggi descritte, enfatizzando il ruolo chiave di tali domini per il corretto funzionamento della proteina.

La mutazione p.N125S è stata individuata in 2 fratelli con sindrome nefrosica, esordita a età diverse (4 e 14 anni, rispettivamente), che presentavano differenti lesioni glomerulari: *Minimal Change Disease* (MCD) in un caso e una glomerulonefrite da IgA atipica, con proliferazione e ispessimento della membrana basale glomerulare (Tab. I). Una spiegazione plausibile della



**Fig. 1 - A)** Elettroferogrammi di sequenze *TRPC6* wild type (WT) e delle 3 mutazioni missense individuate (c.374A>G\_p.N125S; c.653A>T\_p.H218L; c.2684G>T\_p.R895L). **B)** Immunofluorescenza per la valutazione dei livelli di espressione di *TRPC6* e nefrina sulla biopsia renale di un soggetto controllo (WT); di un paziente con glomerulosclerosi focale senza mutazioni *TRPC6* (FSGS) e di 2 pazienti con mutazioni *TRPC6* (p.H218L e p.R895L). I livelli di espressione glomerulare e tubulare della proteina *TRPC6* sono risultati significativamente up-regolati nei portatori di mutazioni *TRPC6* rispetto ai pazienti con FSGS senza mutazioni e soggetti wild type; contrariamente, la nefrina ha evidenziato una distribuzione irregolare lungo le anse capillari in tutti i pazienti FSGS con e senza mutazioni *TRPC6* rispetto al soggetto controllo.

presenza di un differente fenotipo glomerulare nei due fratelli potrebbe essere legata al differente contributo di altri geni di suscettibilità non ancora noti. Infatti, anche se, nei nostri pazienti, mutazioni negli altri geni coinvolti nelle sindromi nefrosiche ereditarie (*NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP*, *ACTN4* e *WT1*) sono state escluse, l'implicazione di altre proteine non ancora note che possano spiegare i diversi fenotipi renali non può essere esclusa "a priori". In ogni caso, entrambi i fratelli presentavano lo stesso fenotipo clinico caratterizzato da una sindrome nefrosica steroideo-resistente, sensibile al trattamento con gli inibitori della calcineurina. In un recente lavoro, Schlöndorff J et al. hanno dimostrato che mutazioni nel gene *TRPC6*, associate a FSGS, sono in grado di attivare costitutivamente la *pathway*

calcineurina-NFAT (18) e che tale attivazione è bloccata da inibitori della calcineurina, della chinasi II calmodulina-dipendente e della fosfatidilinositolo 3-chinasi (18). Questi dati e i nostri risultati suggeriscono che gli inibitori della calcineurina potrebbero essere ulteriormente studiati nel trattamento delle glomerulosclerosi *TRPC6*-associate e, quindi, aprire nuove strade per comprendere meglio il ruolo della *pathway* calcineurina-NFAT nella modulazione della funzione glomerulare, fornendo nuove prospettive per il trattamento di questi pazienti. Inoltre, la mutazione p.N125S è in eterozigosi composta con una mutazione (c.2491C>T\_p.R831C) nel gene *NPHS1*, associato alla sindrome nefrosica congenita di tipo finlandese (19).

La seconda mutazione, p.H218L, localizzata a livello della quarta ripetizione di anchirina (ANK4), è stata individuata in un paziente che ha sviluppato, all'età di 8 anni, una grave forma di sindrome nefrosica, resistente sia ai cortico-steroidi che agli inibitori della calcineurina. La biopsia renale ha evidenziato FSGS e un appiattimento dei processi pedicellari dei podociti.

Il quadro patologico, caratterizzato da una glomerulosclerosi variante *collapsing* con vari focolai di proliferazione extracapillare, associato alla terza mutazione, p.R895L, è sicuramente il dato più interessante emerso dal nostro lavoro di *screening* del gene *TRPC6*. Il piccolo paziente portatore di questa mutazione *de novo*, non riscontrata in entrambi i genitori, ha presentato una sindrome nefrosica con esordio molto precoce (6 mesi) e con una rapida progressione verso l'insufficienza renale terminale. La glomerulosclerosi con variante *collapsing* è molto rara nei bambini; ad oggi sono stati segnalati solo due casi, entrambi associati a difetti mitocondriali dei geni codificanti per la cascata del coenzima Q10 (CoQ10) (20), ossia COQ2 (21) e PDSS2 (22). Mutazioni in questi geni sono generalmente associate a sintomi neurologici gravi e ad anomalie cerebrali, mentre il nostro paziente presentava solo un fenotipo renale.

La mutazione p.R895L è localizzata nella porzione carbossi-terminale, nello stesso dominio *coiled-coil* in cui sono state precedentemente riportate altre mutazioni (p.R895C, p.E897K e p.Q889K) che causano un "guadagno di funzione", caratterizzato sia da un aumento dell'espressione proteica di *TRPC6* che dall'influsso di calcio intracellulare (9, 11). La maggior parte delle mutazioni *TRPC6* finora individuate determina un guadagno di funzione con il conseguente aumento delle ampiezze delle correnti di  $Ca^{2+}$  e un'attivazione costitutiva dei canali.

L'effetto funzionale delle mutazioni *TRPC6* è stato studiato in un primo momento *in vivo*, mediante immunofluorescenza, sulle biopsie renali dei pazienti, al fine di valutare sia l'espressione che la distribuzione glomerulare di *TRPC6* e della nefrina, che rappresenta il componente chiave del diaframma fenestrato della barriera di filtrazione glomerulare. L'espressio-

**TABELLA I - CARATTERISTICHE CLINICHE E MUTAZIONI *TRPC6***

ID pz	Età (anni)	Biopsia	Fenotipo	Età diagnosi (anni)	Risposta alla terapia St/CNI	IRT/anni	Mutazioni	Proteina	Dominio
18-PG	10	MCD	SRNS	4	Neg/Pos	No	c.374A>G	p.N125S	ANK1
19-PR	15	IgAN con pattern MPGN-like	SRNS	14	Neg/Pos	No	c.374A>G	p.N125S	ANK1
5-RB	18	FSGS	SRNS	8	Neg/Neg	No	c.653A>T	p.H218L	ANK4
13-MS	2	CG	SRNS	1	Neg/Neg	Si/2	c.2684G>T	p.R895L	CYTOP

Abbreviazioni: MCD: *Minimal Change Disease*; IgAN con pattern MPGN-like: Nefropatia da IgA con pattern glomerulonefrite membrano-proliferativa (MPGN)-like; FSGS: Glomerulosclerosi Segmentale Focale; CG: Glomerulopatia di tipo *Collapsing*; SRNS: Sindrome Nefrosica Steroideo-Resistente; St: Steroidi; CNI: Inibitori della Calcineurina; IRT: Insufficienza Renale Terminale.

ne glomerulare e tubulare di *TRPC6* nei pazienti con la mutazione è risultata nettamente superiore sia rispetto ai pazienti con FSGS senza difetti *TRPC6* che ai soggetti *wild-type* (Fig. 1B). Contrariamente, in tutti i pazienti con FSGS, l'analisi della nefrina ha evidenziato sia una significativa *down-regolazione* che una distribuzione irregolare lungo le anse capillari rispetto ai soggetti *wild-type* (Fig. 1B).

Infine, l'effetto delle mutazioni sulla funzione di *TRPC6* è stato ulteriormente studiato mediante esperimenti *in vitro* di transfezione e mutagenesi, in cui la concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$  è stata misurata in cellule HEK293, che non esprimono *TRPC6*, transfettate sia con il cDNA *TRPC6 wild-type* che con cDNA *TRPC6* mutato, ossia contenente le mutazioni di nostro interesse p.N125S, p.H218L e p.R895L. L'efficienza della transfezione e la corretta localizzazione di membrana del canale *TRPC6* mutato e *wild-type* sono state valutate mediante microscopia confocale e successivamente, le concentrazioni intracellulari di calcio sono state misurate utilizzando una molecola fluorescente, il Fluo-4. L'influsso di  $Ca^{2+}$  intracellulare è risultato significativamente più alto nelle cellule che esprimevano i canali mutati rispetto a quelle che esprimevano il *TRPC6 wild type* ( $P < 0.05$ ).

L'esatta fisiopatologia attraverso cui un aumento dell'influsso di  $Ca^{2+}$  intracellulare in pazienti con mutazioni *TRPC6* porti alla FSGS rimane ancora poco chiara. Una delle ipotesi più accreditate prevede che livelli troppo alti di ioni  $Ca^{2+}$  possano modificare l'assemblaggio del citoscheletro podocitario. Infatti, un aumento di espressione del gene *TRPC6* determina la perdita delle fibre di stress di actina in colture podocitarie e la comparsa di proteinuria nei topi, suggerendo che *TRPC6* è fun-

zionalmente collegato al citoscheletro di actina (23). Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per definire meglio l'interazione tra *TRPC6*, l'influsso di  $Ca^{2+}$  e il citoscheletro dei podociti.

In sintesi, il presente lavoro documenta, per la prima volta, un importante ruolo del gene *TRPC6* nelle sindromi nefrosiche steroido-resistenti sporadiche con esordio precoce, estendendo anche alla glomerulosclerosi di tipo *collapsing* il possibile quadro patologico associato. L'aumento dell'influsso di  $Ca^{2+}$  nei podociti, l'attivazione costitutiva della *pathway* calcineurina-NFAT e le alterazioni nell'assemblaggio dei filamenti di actina sembrano essere alla base del possibile meccanismo che causa la proteinuria associata a mutazioni *TRPC6*.

**DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI:** Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

#### Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Maddalena Gigante

Dipartimento di Scienze Biomediche

Facoltà di Medicina

Università di Foggia

c/o Ospedali Riuniti

Viale Luigi Pinto 1

71122 Foggia

e-mail: mgigante@medicina.unifg.it; md.gigante@unifg.it

## BIBLIOGRAFIA

- Tryggvason K, Pikkarainen T, Patrakka J. Nck links nephrin to actin in kidney podocytes. *Cell* 2006; 125 (2): 221-4.
- Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1 (4): 575-82.
- Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24 (4): 349-54.
- Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, et al. Positional cloning uncovers mutations in *PLCE1* responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 2006; 38 (12): 1397-405.
- Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 2001; 159 (6): 2303-8.
- Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, et al. Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2004; 66 (2): 564-70.
- Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in *ACTN4*, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24 (3): 251-6.
- Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. A mutation in the *TRPC6* cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005; 308 (5729): 1801-4.
- Reiser J, Polu KR, Möller CC, et al. *TRPC6* is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005; 37 (7): 739-44.
- Brown EJ, Schlöndorff JS, Becker DJ, et al. Mutations in the formin gene *INF2* cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2010; 42 (1): 72-6.
- Zhu B, Chen N, Wang ZH, et al. Identification and functional analysis of a novel *TRPC6* mutation associated with late onset familial focal segmental glomerulosclerosis in Chinese patients. *Mutat Res* 2009; 664 (1-2): 84-90.
- Santín S, Ars E, Rossetti S, et al. *TRPC6* mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24 (10): 3089-96.
- Heeringa SF, Möller CC, Du J, et al. A novel *TRPC6* mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One* 2009; 4 (11): e7771.
- Hsu YJ, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRP channels in kidney disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772 (8): 928-36.
- Li Y, Jia YC, Cui K, et al. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 2005; 434 (7035): 894-8.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human *TRPC6* and *TRPC3* channels by diacylglycerol. *Nature* 1999; 397 (6716): 259-63.
- Gigante M, Caridi G, Montemurro E, et al. *TRPC6* mutations in children and steroid resistant nephrotic syndrome and atypical phenotypes. *Clin J Am Soc Nephrol*, in press.
- Schlöndorff J, Del Camino D, Carrasquillo R, Lacey V, Pollak MR. *TRPC6* mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296 (3): C558-69.
- Lenkkeri U, Männikkö M, McCreedy P, et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 1999; 64 (1): 51-61.
- Barisoni L, Diomedes-Camassei F, Santorelli FM, et al. Collapsing glomerulopathy associated with inherited mitochondrial injury. *Kidney Int* 2008; 74 (2): 237-43.
- Diomedes-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, et al. COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18 (10): 2773-80.
- López LC, Schuelke M, Quinzii CM, et al. Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* 2006; 79 (6): 1125-9.
- Möller CC, Wei C, Altintas MM, et al. Induction of *TRPC6* channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18 (1): 29-36.