

L'URUMODULINA MUTATA È SECRETA NELLE URINE DI PAZIENTI AFFETTI DA NEFROPATIA IPERURICEMICA FAMILIARE ED INDUCE LA FORMAZIONE DI AGGREGATI EXTRACELLULARI

Céline Schaeffer^{1,2}, Angela Cattaneo², Matteo Trudu^{1,2}, Sara Santambrogio^{1,2}, Ilenia Bernascone^{1,2}, Daniela Giachino³, Gianluca Caridi⁴, Andrea Campo⁵, Corrado Murtas⁶, Simona Benoni³, Claudia Izzi⁷, Mario De Marchi³, Antonio Amoroso³, Gian Marco Ghiggeri⁴, Francesco Scolari⁷, Angela Bachi², Luca Rampoldi^{1,2}

¹Istituto Telethon Dulbecco

²Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

³Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino, Torino

⁴Divisione di Nefrologia, Istituto G. Gaslini, Genova

⁵SOC Nefrologia, Dialisi e Nutrizione Clinica, Presidio Ospedaliero San Lazzaro di Alba, Cuneo

⁶Dipartimento di Medicina Clinica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università di Parma, Parma

⁷Divisione di Nefrologia, Ospedale di Montichiari, Brescia

L'uromodulina, nota anche come proteina di Tamm-Horsfall, venne scoperta nel 1950 da Tamm e Horsfall (1). È una grande proteina di 105 kDa espressa esclusivamente nel rene, in corrispondenza del tratto ascendente (TAL) dell'ansa di Henle e prevalentemente localizzata sulla membrana plasmatica delle cellule epiteliali tubulari (2), sede dalla quale viene immessa nel lume tubulare attraverso un taglio proteolitico mediato da una proteasi non ancora identificata (3). Nelle urine l'uromodulina costituisce la proteina più abbondante ed è presente sotto forma di polimero di elevato peso molecolare (M_r 1–10 x 10⁶) (4).

Le sue funzioni biologiche restano in gran parte sconosciute; si ritiene tuttavia che abbia un ruolo protettivo nei confronti delle infezioni delle vie urinarie (5) e della formazione di cristalli di ossalato di calcio (6). Inoltre, si pensa che l'uromodulina svolga un ruolo nella regolazione del bilancio del sodio e dell'acqua nel TAL, attraverso la regolazione dell'attività di ROMK e NKCC2, i due trasportatori ionici più importanti della membrana apicale delle cellule epiteliali di questo segmento del nefrone (7, 8).

Mutazioni a carico del gene *UMOD*, che codifica per l'uromodulina, sono state identificate come causali nella malattia cistica della midollare di tipo 2 (MCKD2; MIM 603860), nella nefropatia familiare iperuricemica giovanile (FJHN; MIM 162000) (9) e nella glomerulocisti con iperuricemia (GCKD; MIM 609886) (10, 11); queste entità cliniche sono oggi unitariamente raggruppate sotto il termine di *uromodulin-associated kidney disease* (UAKD), una rara malattia genetica a carattere autosomico dominante

caratterizzata da difetto della capacità di concentrazione delle urine, iperuricemia, gotta e progressiva insufficienza renale. Il quadro istologico mostra un danno tubulo-interstiziale con atrofia tubulare, fibrosi interstiziale e infiltrato infiammatorio. Le cisti renali sono raramente presenti e sono prevalentemente localizzate alla giunzione corticomidollare (12). Benché la UAKD mostri una certa eterogeneità in termini di età di esordio, quadro clinico e presenza di cisti, evolve invariabilmente verso l'insufficienza renale cronica (*chronic kidney disease*, CKD) nel corso della terza-quinta decade di vita.

A oggi, sono state descritte 51 mutazioni di *UMOD*. Tutte, a eccezione di tre delezioni in-frame, sono mutazioni missenso localizzate nella metà N-terminale della proteina. Studi in vitro eseguiti in diverse linee cellulari hanno evidenziato che le isoforme mutate di uromodulina mostrano un difetto di trasporto verso la membrana plasmatica, essendo in gran parte ritenute nel reticolo endoplasmatico (RE) (13-16). L'accumulo e l'aggregazione di uromodulina mutata nel RE sono stati anche dimostrati in un modello murino transgenico della malattia recentemente studiato dal nostro gruppo (17). Questi risultati, osservati sia nei modelli in vitro che in vivo, sono coerenti con le osservazioni ricavate dall'analisi delle biopsie renali dei pazienti con UAKD che mostrano la presenza di grossi aggregati intracellulari di uromodulina nelle cellule del TAL, considerati un tratto caratteristico della malattia (10, 18). Nel loro insieme questi dati suggeriscono che la ritenzione dell'uromodulina mutata nel RE è un evento chiave nella patogenesi della UAKD.

In questo studio, recentemente pubblicato su *Kidney*

TABELLA I - PRINCIPALI PARAMETRI ANALIZZATI E SECREZIONE DI UROMODULINA MUTATA NEI PAZIENTI UAKD STUDIATI

Mutazione di uromodulina	Sesso	Età al prelievo delle urine	Peso specifico delle urine	Creatinina urinaria (mg/dL)	Creatinina sierica (mg/dL)	Acido urico sierico (mg/dL)	Gotta	Analisi sonografica	% uromodulina mutata*
R212C	M	41	1010	65.5	1.08	6.2	No	NK	1.3
C256Y	M	35	1018	73	1.4	8.9	No	NK	7.6
C317Y	M	18	1020	80	0.8	7.5	No	NK	35.7

NK: rene normale; M: maschio; *: percentuale relativa alla quantità di uromodulina *wild type*.

International (19), abbiamo dimostrato che l'uromodulina mutata può parzialmente sfuggire al controllo di qualità del RE e venire secreta nelle urine dei pazienti con UAKD. Attraverso l'impiego di modelli *in vitro* e *in vivo* abbiamo mostrato che la proteina mutata che raggiunge la membrana plasmatica forma aggregati extracellulari che esercitano un effetto dominante negativo sull'uromodulina *wild type*, suggerendo un nuovo effetto di "guadagno di funzione" delle mutazioni di uromodulina.

Molti studi hanno dimostrato che i livelli urinari di uromodulina sono ridotti in diverse condizioni che danneggiano la struttura e la funzione dei tubuli (20). Nei pazienti con UAKD la riduzione dell'uromodulina escreta è ancora più pronunciata essendo la conseguenza sia del danno renale che dell'accumulo intracellulare della proteina mutata (10, 21, 22). Due lavori precedenti hanno riportato che l'uromodulina mutata non era ritrovata nelle urine dei pazienti con UAKD, suggerendo che essa è completamente ritenuta nel RE delle cellule del TAL (18, 23). Tuttavia, in questi due studi la secrezione urinaria di uromodulina era stata analizzata quando la funzione renale era già compromessa. In questa condizione la secrezione totale di uromodulina era fortemente ridotta, forse a tal punto da ostacolare l'identificazione della proteina mutata.

Per questa ragione abbiamo deciso di verificare se l'isoforma mutata di uromodulina poteva essere rilevata nelle urine di pazienti in cui la funzione renale era ancora preservata. L'analisi è stata eseguita in tre pazienti portatori di tre diverse mutazioni: la mutazione C317Y, già descritta (24), e due nuove mutazioni, R212C e C256Y, che abbiamo identificato dopo lo *screening* genetico in famiglie italiane con UAKD (Tab. I). Mediante l'analisi di spettrometria di massa abbiamo rilevato in modo specifico le isoforme mutate di uromodulina in tutti e tre i pazienti. I livelli urinari di uromodulina mutata sono dell'1%, dell'8% e del 35% relativamente alla proteina *wild type*, rispet-

tivamente per le mutazioni R212C, C256Y e C317Y (Tab. I). La proteina mutata ritrovata nelle urine è probabilmente derivante da una secrezione attiva dalla membrana plasmatica delle cellule del TAL e non è dovuta alla presenza di detriti cellulari, dal momento che non porta la glicosilazione tipica del RE. È probabile che la discrepanza con gli studi precedenti sia imputabile alla diversa funzione renale dei pazienti studiati piuttosto che alle diverse mutazioni studiate. Infatti, anche nel nostro studio non siamo stati in grado di rilevare la secrezione di uromodulina mutata estendendo l'analisi ai familiari affetti con funzione renale compromessa.

Per capire le possibili conseguenze della secrezione di uromodulina mutata, abbiamo eseguito studi *in vitro* in cellule MDCK, una linea cellulare epiteliale renale canina, stabilmente trasfettate con le tre diverse isoforme mutate di uromodulina analizzate per la secrezione urinaria (R212C, C256Y, C317Y). Benché una larga quota di isoforme mutate sia ritenuta all'interno del RE, una parte di esse raggiunge la membrana plasmatica dove forma aggregati extracellulari invece di polimerizzare in filamenti, come si verifica per la proteina *wild type*. Curiosamente, la coespressione dell'isoforma *wild type* con quelle mutate interferisce con la polimerizzazione dell'isoforma *wild type*, dimostrando un nuovo effetto dominante negativo extracellulare delle isoforme mutate (Fig. 1).

Per valutare la rilevanza di questi risultati *in vivo*, abbiamo utilizzato un modello di topo transgenico per l'uromodulina mutata che abbiamo recentemente generato e caratterizzato (17). Questo modello esprime un'isoforma di uromodulina con una mutazione (C147W) corrispondente alla mutazione C148W riscontrata in pazienti UAKD e sviluppa una malattia renale molto simile a quella umana. Analogamente ai pazienti con UAKD, anche in questo modello l'uromodulina mutata è parzialmente secreta nelle urine. Inoltre, tramite immunofluorescenza, abbiamo osservato la presenza dell'isoforma mutata sulla membrana

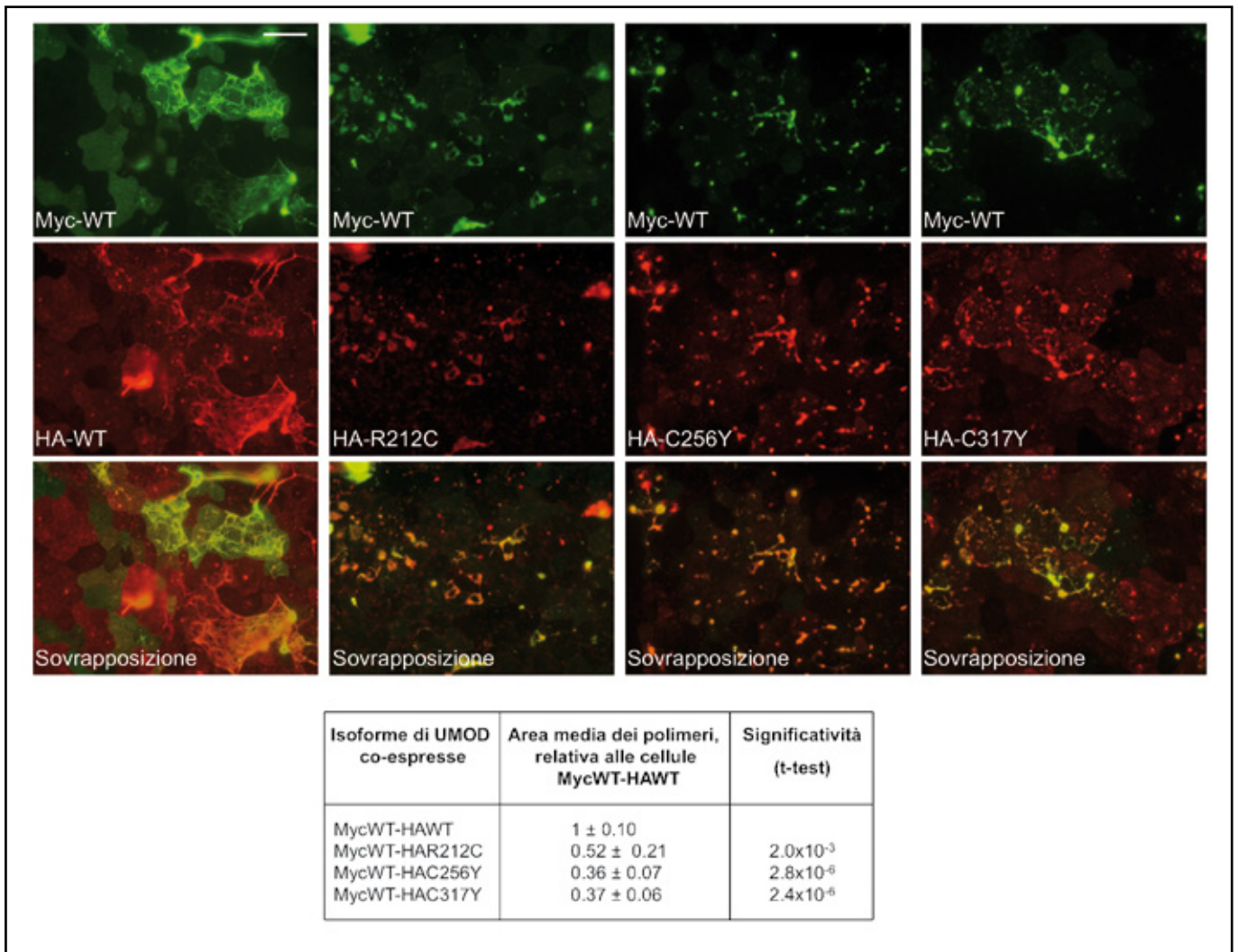


Fig. 1 - Analisi di immunofluorescenza condotta su cellule MDCK non permeabilizzate e co-esprimenti uromodulina wild type marcata con tag Myc (verde) e uromodulina wild type o mutata (come indicato nei diversi pannelli della Fig.) marcata con tag HA (rosso). La Tabella indica la quantificazione dell'area media dei polimeri di uromodulina sulla superficie delle cellule. I polimeri formati da proteina wild type e mutata sono significativamente più corti di quelli contenenti solo proteina di tipo wild type. L'uromodulina mutata esercita quindi un effetto dominante negativo sulla polimerizzazione in filamenti della proteina wild type. Barra = 30 μ m.

apicale e nel lume del TAL dove forma aggregati che non sono mai osservati in topi transgenici che sovra-esprimono la proteina *wild type*. Questi risultati suggeriscono che anche *in vivo* la presenza di proteina mutata in corrispondenza della membrana plasmatica porta alla formazione di aggregati extracellulari.

Pensiamo che la dimostrazione che l'uromodulina mutata, tendente all'aggregazione, possa raggiungere la membrana plasmatica ed essere secreta nelle urine sia di importante rilevanza in relazione alla patogenesi della malattia e ai possibili approcci terapeutici.

Ipotezziamo che la presenza nelle urine dell'uromodulina mutata potrebbe aumentare il numero di cilindri ialini formati nel TAL, come conseguenza

dell'elevata tendenza della proteina ad aggregare, portando all'ostruzione tubulare, un evento che potrebbe essere a monte dell'infiammazione e della fibrosi interstiziale. Inoltre, il fatto che l'uromodulina mutata interferisca con la funzione della proteina *wild type* intrappolandola in aggregati extracellulari potrebbe comprometterne la capacità di attivare ROMK o NKCC2, alterando il riassorbimento ionico nel TAL e la capacità di concentrazione delle urine.

È importante rilevare che una possibile strategia terapeutica proposta per la UAKD è l'impiego di *chemical chaperones* (come il sodio-4-fenilbutirrato), molecole in grado di diminuire la ritenzione nel RE di proteine mutate permettendone l'entrata nella via di secrezione cellulare. L'efficacia di questo trattamento

sul trasporto dell'uromodulina mutata è già stata dimostrata in due diversi studi in modelli cellulari (25, 26). Alla luce dei nostri risultati questo approccio, che porta ad aumentare la quantità di proteina mutata sulla membrana plasmatica, potrebbe di fatto aumentare l'aggregazione extracellulare della stessa con possibili effetti negativi. Pensiamo che siano quindi necessari ulteriori studi per comprendere meglio le possibili conseguenze negative di questo tipo di trattamento sulla funzione renale.

In conclusione, il nostro lavoro mostra per la prima volta la presenza dell'isoforma mutata di uromodulina nelle urine dei pazienti con UAKD e la tendenza della stessa a formare aggregati extracellulari. In questo modo, in aggiunta a un effetto di "guadagno di funzione" intracellulare dovuto alla ritenzione nel RE, l'uromodulina mutata potrebbe anche esercitare il suo effetto tossico tramite un effetto dominante negativo extracellulare nei confronti dell'isoforma *wild type* e forse di altre proteine. Questi nuovi risultati dovrebbero essere presi in considerazione in previsione di possibili sviluppi terapeutici nei pazienti affetti da UAKD.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI

Gli Autori ringraziano il supporto di Fondazione Telethon (TCR08006), della Comunità Europea VII Programma Quadro (EUNEFRON) e della Società Italiana di Nefrologia (progetto Ricercando).

Indirizzo degli Autori:

Dr. Luca Rampoldi
Istituto Telethon Dulbecco
Unità di Genetica Molecolare delle Malattie Renali
Istituto Scientifico San Raffaele
Via Olgettina 58
20132 Milano
e-mail: rampoldi.luca@hsr.it

BIBLIOGRAFIA

1. Tamm I, Horsfall FL. Characterisation and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 74 (1): 106-8.
2. Bachmann S, Koepfen-Hagemann I, Kriz W. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry. *Histochemistry* 1985; 83: 531-8.
3. Santambrogio S, Cattaneo A, Bernascone I, et al. Urinary uromodulin carries an intact ZP domain generated by a conserved C-terminal proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370: 410-3.
4. Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 658-76.
5. Mo L, Zhu XH, Huang HY, et al. Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F795-802.
6. Mo L, Huang HY, Zhu XH, et al. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int* 2004; 66: 1159-66.
7. Renigunta A, Renigunta V, Saritas T, et al. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J Biol Chem* 2011; 286: 2224-35.
8. Mutig K, Kahl T, Saritas T, et al. Activation of the bumetanide-sensitive Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *J Biol Chem* 2011; 286: 30200-10.
9. Hart TC, Gorry MC, Hart PS, et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet* 2002; 39: 882-92.
10. Rampoldi L, Caridi G, Santon D, et al. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 3369-84.
11. Lens XM, Banet JF, Outeda P, Barrio-Lucia V. A novel pattern of mutation in uromodulin disorders: autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 2, familial juvenile hyperuricemic nephropathy, and autosomal dominant glomerulocystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 52-7.
12. Scolari F, Caridi G, Rampoldi L, et al. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 987-99.
13. Bernascone I, Vavassori S, Di Pentima A, et al. Defective intracellular trafficking of uromodulin mutant isoforms. *Traffic* 2006; 7: 1567-79.
14. Vylet'al P, Kublová M, Kalbáčová M, et al. Alterations of uromodulin biology: a common denominator of the genetically heterogeneous FJHN/MCKD syndrome. *Kidney Int* 2006; 70: 1155-69.
15. Jennings P, Aydin S, Kotanko P, et al. Membrane targeting and secretion of mutant uromodulin in familial juvenile hyperuricemic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 264-73.
16. Williams SE, Reed AA, Galvanovskis J, et al. Uromodulin mutations causing familial juvenile hyperuricaemic nephropathy lead to protein maturation defects and retention in the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2963-74.
17. Bernascone I, Janas S, Ikehata M, et al. A transgenic mou-

- se model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulo-interstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 2998-3010.
18. Dahan K, Devuyst O, Smaers M, et al. A cluster of mutations in the UMOD gene causes familial juvenile hyperuricemic nephropathy with abnormal expression of uromodulin. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2883-93.
 19. Schaeffer C, Cattaneo A, Trudu M, et al. Urinary secretion and extracellular aggregation of mutant uromodulin isoforms. *Kidney Int* 2012.
 20. Vyletal P, Bleyer AJ, Kmoch S. Uromodulin biology and pathophysiology--an update. *Kidney Blood Press Res* 2010; 33: 456-75.
 21. Bleyer AJ, Hart TC, Shihabi Z, et al. Mutations in the uromodulin gene decrease urinary excretion of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int* 2004; 66: 974-7.
 22. Nasr SH, Lucia JP, Galgano SJ, et al. Uromodulin storage disease. *Kidney Int* 2008; 73: 971-6.
 23. Rezende-Lima W, Parreira KS, Garcia-Gonzalez M, et al. Homozygosity for uromodulin disorders: FJHN and MCKD-type 2. *Kidney Int* 2004; 66: 558-63.
 24. Scolari F, Puzzer D, Amoroso A, et al. Identification of a new locus for medullary cystic disease, on chromosome 16p12. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1655-60.
 25. Choi SW, Ryu OH, Choi SJ, et al. Mutant tamm-horsfall glycoprotein accumulation in endoplasmic reticulum induces apoptosis reversed by colchicine and sodium 4-phenylbutyrate. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3006-14.
 26. Ma L, Liu Y, El-Achkar TM, Wu XR. Molecular and cellular effects of Tamm-Horsfall protein mutations and their rescue by chemical chaperones. *J Biol Chem* 2012; 287: 1290-305.