

Poster P.21.142

MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENESIS AND PRECLINICAL TREATMENT IN RENAL DISORDERS ASSOCIATED WITH UROMODULIN MUTATIONS

Schaeffer C.^[1], Cratere M.^[1], Trudu M.^[1], Tammaro C.^[1], Riba M.^[2], Pasqualetto E.^[1], Lazarevic D.^[2], Scolari F.^[3], Rampoldi L.*^[1]

^[1]Molecular Genetics of Renal Disorders, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[2]Center for Translational Genomics and Bioinformatics, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[3]Division of Nephrology, Hospital of Montichiari ~ Montichiari ~ Italy

Uromodulin is the most abundant protein in urine and is specifically produced and released by epithelial cells lining the thick ascending limb of Henle's loop (TAL) of kidney nephrons (1). It plays a role in the protection against urinary tract infections and kidney stones, modulation of renal ion transport and innate immunity. Mutations in the uromodulin gene UMOD are responsible for Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease (ADTKD-UMOD), characterized by tubulointerstitial nephritis, hyperuricemia and gout, and progressive chronic kidney disease. Currently, there is no specific treatment other than renal replacement therapy. We demonstrated that UMOD mutations have a detrimental effect on protein trafficking and lead to retention of mutant uromodulin in the endoplasmic reticulum (ER). Accumulation of mutant uromodulin in expanded ER cisternae has indeed been observed in cell models of uromodulin expression, in a mouse model of ADTKD-UMOD (TgUmodC147W), and in patient kidney biopsy. We also demonstrated that mutant uromodulin partly escapes the ER quality control and forms aggregates in the tubular lumen, suggesting that uromodulin mutations have intracellular and possibly extracellular gain-of-toxic function effect.

The goal of our project was to deepen our understanding of the molecular mechanisms of disease pathogenesis and to identify potential therapeutic strategies. Studies in cell models demonstrated that mutant uromodulin is partly degraded by the proteasome and identified several chaperones as interactors that may play a role in mutant protein handling and degradation (2). By studying a panel of over 30 mutations we also observed that they can be clearly stratified into four classes on the bases of the extent of protein trafficking defect, suggesting genotype-phenotype correlation. RNA profiling of cells and mouse kidneys showed that mutant uromodulin expression induces ER stress pathways and signs of altered protein homeostasis (2,3). By generating transcriptional profiles in TgUmodC147W mice at different time points, we identified early activation of pathways related to inflammation and fibrosis as a key hallmark in the disease onset and progression. We indeed discovered pro-inflammatory signatures that are already present in the kidneys of TgUmodC147W mice soon after birth, well before the presence of any histological sign of renal damage and fibrosis. To understand if these and additional signals originate from cells expressing mutant uromodulin, likely downstream of ER stress, we generated a novel reporter mouse, expressing EGFP under the control of the Umod promoter. This model allows isolation of epithelial TAL cells from new-born mouse kidneys via fluorescence-activated cell sorting that will be instrumental for their characterisation. Early cellular pathogenetic pathways will represent ideal targets for innovative therapeutic strategies for ADTKD-UMOD and possibly for other renal or conformational diseases.

MECCANISMI MOLECOLARI DI PATOGENESI E TRATTAMENTO IN MODELLO PRECLINICO DELLA MALATTIA RENALE ASSOCIATA A MUTAZIONI DI UROMODULINA.

L'uromodulina è la proteina più abbondante nelle urine ed è prodotta unicamente nei nefroni renali dalle cellule tubulari epiteliali del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle. Il suo ruolo non è ancora chiaro, sebbene si pensi che sia importante per la protezione dalle infezioni delle vie urinarie e

dai calcoli, per l'assorbimento tubulare di sodio e per l'immunità innata renale. Mutazioni del gene UMOD che codifica per uromodulina causano la malattia renale tubulointerstiziale autosomica dominante associata ad uromodulina (ADTKD-UMOD) caratterizzata da nefrite tubulointerstiziale, iperuricemia e gotta, e insufficienza renale cronica. Non ci sono ad oggi terapie specifiche per ADTKD-UMOD, se non dialisi o trapianto renale.

Abbiamo in precedenza dimostrato che le mutazioni di UMOD portano ad un difetto del trasporto intracellulare e ritenzione nel reticolo endoplasmatico (ER) di uromodulina mutata. L'accumulo di uromodulina mutata nell'ER è infatti evidente in modelli cellulari, in un modello murino di ADTKD-UMOD, ovvero topi transgenici che esprimono uromodulina mutata (TgUmodC147W), e nelle biopsie renali di pazienti. Abbiamo inoltre dimostrato che parte della proteina mutata sfugge ai meccanismi di controllo cellulari e raggiungere la membrana plasmatica, dove tende a formare grossi aggregati proteici. Complessivamente i nostri dati dimostrano un chiaro effetto "guadagno di funzione" delle mutazioni di uromodulina.

Il nostro progetto di ricerca ha lo scopo di chiarire i meccanismi molecolari di patogenesi della malattia e di identificare e validare possibili terapie.

Nei modelli cellulari e nei topi TgUmodC147W la ritenzione della proteina mutata induce pathway di stress dell'ER e alterazione dell'omeostasi proteica. Ciò è associato ad una precoce induzione di alcuni segnali pro-infiammatori nei reni dei topi TgUmodC147W già ad un giorno di età, ben prima che ci siano segni istologici di danno renale. Partendo da questi risultati stiamo lavorando per capire quali siano i meccanismi di risposta cellulare indotti dall'accumulo di uromodulina mutata e come questi possano portare all'induzione del processo infiammatorio. Per questo scopo abbiamo generato un nuovo modello murino esprime la proteina fluorescente GFP sotto il controllo di promotore di uromodulina. Questo modello consente l'isolamento specifico delle cellule che esprimono uromodulina e sarà utilizzato per la loro caratterizzazione. Capire i segnali molecolari che giocano un ruolo chiave nell'insorgenza della malattia può rappresentare un passo importante verso l'identificazione di una cura per ADTKD-UMOD che potrebbe avere una ricaduta più ampia per altre malattie renali o da accumulo proteico.

1. Devuyst O, Olinger E, Rampoldi L (2017) Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat Rev Nephrol.* 13(9):525-544. PMID:28781372
2. Schaeffer C, Merella S, Pasqualetto E, Lazarevic D, Rampoldi L (2017) Mutant uromodulin expression leads to altered homeostasis of the endoplasmic reticulum and activates the unfolded protein response. *PLoS One* 12(4):e0175970. PMID:28437467
3. Trudu M, Schaeffer C, Riba M, Ikehata M, Brambilla P, Messa P, Martinelli-Boneschi F, Rastaldi MP, Rampoldi L (2017) Early involvement of cellular stress and inflammatory signals in the pathogenesis of tubulointerstitial kidney disease due to UMOD mutations. *Sci Rep.* 7(1):7383. PMID:28785050

Malattia Renale Tubulointerstiziale Autosomica Dominante

Coordinator: Luca Rampoldi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

Telethon Project (nr):

GGP14263

Disease Name:

Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease

Keywords:

Uromodulin, Tamm-Horsfall Glycoprotein-Horsfall, Hereditary Nephritis