

Université de Montréal

Étude moléculaire et cellulaire des mutants de la protéine de Tamm-Horsfall
(THP) dans la néphropathie hyperuricémique familiale juvénile (NHFJ)

par
Jadwiga Gasiorek

Département de Médecine
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences biomédicales
option générale

Août, 2005

© Jadwiga Gasiorek, 2005



W

4

U58

2006

V. 079

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude moléculaire et cellulaire des mutants de la protéine de Tamm-
Horsfall (THP) dans la néphropathie hyperuricémique familiale juvénile
(NHFJ)

présenté par :
Jadwiga Gasiorek

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur Daniel Bichet

Directeur de recherche Alain Bonnardeaux

Membre du jury Marie-Josée Hébert

Résumé

Le but de l'étude était d'établir par quels mécanismes des mutations de la protéine de Tamm-Horsfall (THP) causent la néphropathie hyperuricémique familiale juvénile (NHFJ). Chez des familles québécoises potentielles, nous avons trouvé trois mutations de la THP (D196A, C217G et P236L), dont une nouvelle (D196A). Les individus atteints présentaient une diminution de la THP urinaire et de l'excrétion fractionnelle d'urate. Toutefois, il y avait un certain chevauchement avec des individus sains.

Des plasmides avec la THP sauvage et contenant des mutations (N128S, D196A, C217G, P236L et C366G) ont été transfectés de façon transitoire dans des cellules rénales d'opposum (OK). Les mutants présentaient un défaut de maturation, dont témoigne une glycosylation partielle. Les allèles C217G et P236L étaient les plus délétères in vitro, puisqu'elles causaient un stress du RE, traduit par l'augmentation de la chaperone Bip et formaient des agrégats intracellulaires qui n'étaient pas dégradés. Cela pourrait mener à l'apoptose et expliquer l'IRC.

Mots-clés :

Néphropathie hyperuricémique familiale juvénile	Transfection
Protéine de Tamm-Horsfall	Microscopie
Anse ascendante large de Henlé	Bip
Génétique	Protéasome
Mutations	Agrégation

Résumé en anglais - Summary

The purpose of the study was to investigate mechanisms by which mutations in Tamm-Horsfall Protein (THP) lead to Familial juvenile hyperuricemic nephropathy (FJHN). In potential families from Quebec, we found three mutations of THP (D196A, C217G and P236L), including a novel-one (D196A). Affected individuals showed a decrease of urinary THP and of urate fractional excretion. However, there was an overlap with unaffected individuals.

Plasmids containing the Wt THP and mutated forms (N128S, D196A, C217G, P236L and C366G) were transiently transfected in opossum kidney (OK) cells. Mutants displayed a defect in maturation, as witnessed by a partial glycosylation. C217G and P236L alleles were the most deleterious in vitro, because they caused an ER stress, translated by an up-regulation of the chaperone Bip and formed intracellular aggregates that were not degraded. This could lead to apoptosis and explain chronic renal failure.

Key-words

Familial juvenile hyperuricemic nephropathy	Transfection
Tamm-Horsfall Protein	Microscopy
Thick ascending limb of Henle's loop	Bip
Genetics	Proteasome
Mutations	Aggregation

Table des matières

<i>Identification du jury</i>	ii
<i>Résumé en français et mots clés</i>	iii
<i>Résumé en anglais et mots clés</i>	iv
<i>Table des matières</i>	v
<i>Liste des tableaux</i>	viii
<i>Liste des figures</i>	ix
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	x
<i>Remerciements</i>	xii
<i>Introduction</i>	1
1. Pathologies associées à la THP.....	1
1.1. Aspect génétique.....	1
1.2. Manifestations cliniques.....	5
1.3. Progression de la maladie et traitement.....	7
1.4. Étude in vitro de mutations cliniques.....	7
2. Structure de la THP.....	9
2.1. Ancrage Glycosyl Phosphatidylinositol.....	10
2.2. Domaine Zona Pellucida.....	13
2.3. Domaine D8C.....	14
2.4. Domaines EGF.....	14

3. Fonctions proposées pour la THP.....	15
3.1. Modulation de la réponse immunitaire.....	15
3.2. Protection contre les infections urinaires.....	17
3.3. Protection contre les lithiases.....	17
3.4. Rôle régulateur dans la fonction rénale.....	18
4. Voie sécrétoire et contrôle de qualité.....	19
4.1. Réticulum endoplasmique.....	19
4.1.1. Lectines – Calnexine/Calréticuline.....	21
4.1.2. Disulfure isomérase – PDI et ERp57.....	22
4.1.3. Famille Hsp70 – Bip.....	24
4.2. ERGIC.....	25
4.3. Appareil de Golgi.....	26
5. Stress du RE.....	27
5.1. Senseur Bip.....	27
5.1.1. ATF-6.....	28
5.1.2. IRE1.....	29
5.1.3. PERK.....	30
5.2. Dégradation et protéasome.....	30
5.3. Agrégation.....	32
5.4. Apoptose.....	32
6. Maladies conformationnelles.....	35
6.1 Diabète insipide néphrogénique.....	36
6.2 Emphysème héréditaire avec maladie du foie.....	37
6.3 Rétinite pigmentaire.....	38

<i>Accord des coauteurs de l'article</i>	39
<i>Apport des différents auteurs de l'article</i>	40
<i>Article</i>	41
« Uromodulin mutations in FJHN induce ER stress but are not rescued by chemical chaperones or colchicine »	
<i>Discussion</i>	83
Analyse des résultats.....	83
Perspectives.....	92
<i>Bibliographie</i>	94



Liste des tableaux

Tableau I : Mutations de la THP rapportées dans la littérature.....	2
---	---

Liste des figures

Figure 1 : Structure du gène de la THP humaine.....	4
Figure 2 : Schéma du néphron et localisation de la THP.....	10
Figure 3 : Modèle structurel de la THP.....	11
Figure 4 : Schéma des compartiments cellulaires.....	20
Figure 5 : Cycle calnexine-calréticuline.....	23
Figure 6 : Mécanismes de la réponse au stress du RE.....	29
Figure 7 : Apoptose et caspases.....	35

Liste des sigles et abréviations

AAT : Alpha 1-antitrypsine

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AQ2 : Aquaporine 2

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATF: Facteur de transcription activateur (Activating transcription factor)

AVPR2 : Récepteur V2 de la vasopressine

CHOP : CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein

ClC-K2 : Canal chlorure de type K 2

COP : Coat protein complexes

CR1, CR3 : Récepteur du complément 1 et 3 (Complement receptor 1 and 3)

C-terminal : carboxy terminal

DTT : Dithiothréitol

EFur : Excrétion fractionnelle d'urate

EGF : Facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor)

EHP : Groupe externe hydrophobe (External hydrophobic patch)

ERAD : Dégradation associée au réticulum endoplasmique (ER associated degradation)

eIF2 α : Facteur eucaryote d'initiation 2 (Eucaryotic initiation factor 2)

ERGIC : Compartiment intermédiaire du RE au Golgi (ER to Golgi intermediary compartment)

ERSE : Élément de réponse au stress du RE (ER stress response element)

FACS : Tri cellulaire activé par la fluorescence (Fluorescence-activated cell sorting)

GP-2 : Glycoprotéine 2

GPI : Glycosyl-phosphatidylinositol

GRP78 : Protéine régulée par le glucose - 78 (Glucose regulated protein 78)

Hsp70 : Protéine de choc thermique 70 (Heat shock protein 70)

IHP : Groupe interne hydrophobe (Internal hydrophobic patch)

IL-1 : Interleukine 1

IRC : Insuffisance rénale chronique
JNK : Kinase c-Jun amino terminale
LDL : Lipoprotéine à faible densité (Low density lipoprotein)
LPS : Lipopolysaccharides
LZP : Protéine spécifique au foie contenant un domaine ZP (Liver-specific ZP domain-containing protein)
NHE3 : Échangeur sodium hydrogène de type 3
NHFJ : Néphropathie hyperuricémique familiale juvénile
NKA : Sodium-potassium ATPase
NKCC2 : Co-transporteur sodium-potassium-2chlorures de type 2
N-terminal : amino terminal
PDI : Protéine disulfure isomérase
PERK : Kinase du RE pancréatique (Pancreatic ER kinase)
RE : Réticulum endoplasmique
SRP : Particule de reconnaissance du signal (Signal recognition particle)
TF : Facteur tissulaire (Tissue factor)
THP : Protéine de Tamm-Horsfall
TLR-4 : Toll-like receptor 4
TNF : Facteur nécrotique tissulaire (Tissue necrosis factor)
UPR : Réponse aux protéines mal repliées (UPR)
VTC : Grappes tubulo-vésiculaires (Vesicular-tubular clusters)
XBP-1 : Protéine liant la boîte X (X-box-binding protein 1)
ZP : Zona pellucida

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche le Dr. Alain Bonnardeaux qui, tout au long de ma maîtrise, s'est assuré que j'avais l'encadrement nécessaire. Ses conseils en méthodologie scientifique et en rédaction ont été très précieux, son encouragement a été très apprécié.

Je tiens aussi à envoyer un merci sincère aux autres membres du laboratoire qui ont été d'un grand support quotidien. Merci au Dr. Yves Paquette pour ses discussions éclairantes, son aide technique et sa façon encourageante de trouver quelque chose de positif lorsqu'une expérience semble complètement à l'eau. Merci à Josée Tessier pour son aide technique apportée au projet et sa bonne humeur contagieuse. Également, merci à Martin Petrucci pour le partage de son expérience en laboratoire et de ses connaissances en biologie moléculaire.

J'aimerais aussi remercier le Dr. Euridice Carmona pour des échanges d'idées intéressants et les membres du laboratoire du Dr. Vincent Pichette pour leur aide précieuse dans le domptage de la technique d'immunobuvardage.

Finalement, ce projet n'aurait pas vu le jour sans le support financier de l'IRSC que je tiens à remercier.

Introduction

1. Pathologies associées à la THP

Il y a plus de 50 ans, Igor Tamm et Frank Horsfall ont isolé de l'urine humaine la protéine qui a ensuite porté leurs noms. (Tamm *et al.*,1950) La protéine de Tamm Horsfall est aussi connue dans la littérature comme l'Uromoduline (Muchmore and Decker, 1985). Le fait que cette protéine soit la plus abondante de l'urine humaine, très conservée entre les espèces et produite à un endroit très précis du néphron, soit l'anse ascendante large de Henlé et le début du tubule contourné distal, (Peach *et al.*, 1988) suggère qu'elle joue un rôle important. Cependant, les dernières décennies n'ont pas permis de mettre en lumière la fonction de la THP.

Récemment, des mutations de la THP ont été identifiées. Elles causent la néphropathie hyperuricémique familiale juvénile (NHFJ) et la maladie kystique rénale de la médullaire de type 2, qui partagent plusieurs caractéristiques. (Hart *et al.*, 2002) En fait, il s'agit probablement de la même pathologie qui, dans ce mémoire, sera appelée NHFJ pour simplifier la rédaction. La fréquence de cette maladie dans la population est d'environ 1 par 100 000 habitants.

1.1. Aspect génétique

Le gène causant la NHFJ a été localisé au chromosome 16p11-p13 (numéro 191845 dans la banque de données OMIM), puis identifié comme codant pour la protéine de Tamm-Horsfall. La première équipe à établir ceci a identifié 5 mutations de la THP dans 5 familles différentes. (Turner *et al.*, 2003) Par la suite, d'autres mutations ont été décrites, touchant différentes familles à travers le monde et ce nombre s'élevait à 34 en janvier 2005. Ces mutations sont résumées dans le tableau I (page 2-3) (Calado *et al.*, 2005). Ainsi, contrairement à certaines maladies comme la fibrose kystique, où la mutation F508 est retrouvée chez environ 70% des patients atteints, (Zielenski and Tsui, 1995) la NHFJ peut être causée par diverses mutations de la THP.

La NHFJ est transmise de façon autosomique dominante, les patients atteints étant hétérozygotes pour les mutations du gène de la THP, dont la structure est présentée à la figure 1 (page 4). (Pennica *et al.*, 1987) Le gène possède 12 exons, les exons 1 et 2 étant non-codants, car l'ATG est présent dans l'exon 3. Il y a un phénomène de ségrégation des mutations dans l'exon 4 avec présence de quelques mutations dans l'exon 5.

Mutation	exon	référence
c.156T→ G; p.C52W	4	[15]
c.176A→ C; p.D59A	4	[11]
c.230G→ A; p.C77Y	4	[16]

c.278_289del/insCCGGCTCCT; p.V93_G97del/insAASC	4	[12]
c.307G→ T; p.G103C	4	[10]
c.334T→ C; p.C112R	4	[11]
c.376T→ C; p.C126R	4	[16]
c.383A→ G; p.N128S	4	[16]
c.403T→ A; p.C135S	4	[15]
c.443G→ A; p.C148Y	4	[10]
c.444T→ G; p.C148W	4	[14]
c.449G→ C; p.C150S	4	[14]
c.509G→ A; p.C170Y	4	[11]
c.529_555del; p.H177_R185del	4	[10]
c.553C→ G; p.R185G	4	[18]
c.553C→ A; p.R185S	4	[11]
c.563_661del; p.E188_L221del	4	[11]
c.584G→ T; p.C195F	4	[15]
c.605G→ C; p.W202S	4	[15]
c.610C→ G; p.R204G	4	[11]
c.649T→ C; p.C217R	4	[10]
c.649T→ G; p.C217G	4	[11]
c.665G→ C; p.R222P	4	[11]
c.668G→ A; p.C223Y	4	[17]
c.674C→ T; p.T225M	4	[11]
c.674C→ A; p.T225K	4	[12]
c.707C→ T; p.P236L	4	[15]
c.744C→ G; p.C248W	4	[12]

c.764G→ A; p.C255Y	4	[16]
c.844T→ C; p.C282R	4	[11]
c.898T→ G; p.C300G	5	[16]
c.920A→ C; p.K307T	5	Article présent
c.943T→ C; p.C315R	5	[14]
c.950G→ A; p.C317Y	5	[14]

Tableau I. Mutations de la THP rapportées dans la littérature (adapté de la référence : Calado *et al.*, 2005)

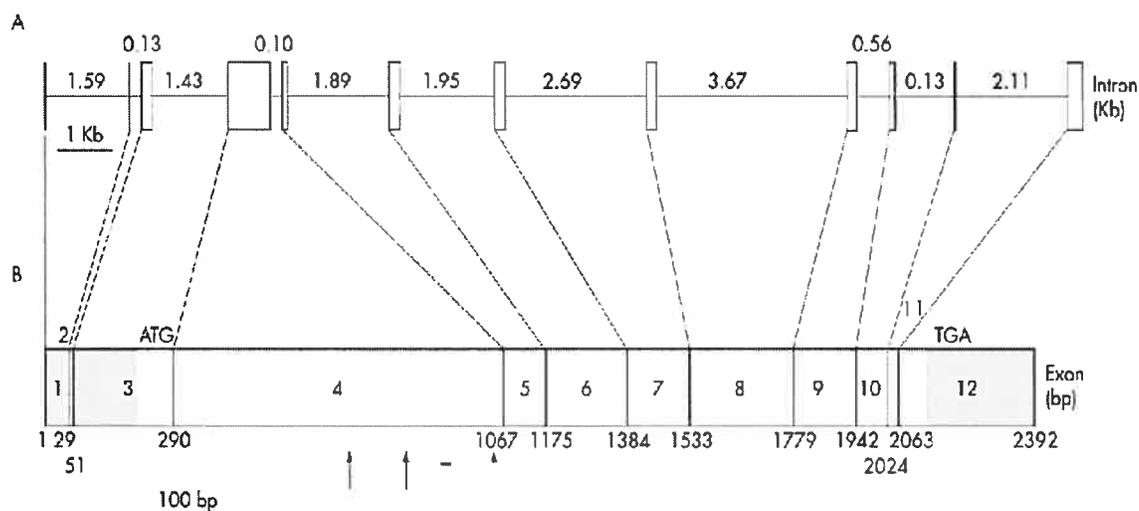


Figure 1. Structure du gène de la THP humaine. (A) Exons-boîtes verticales et introns-lignes horizontales (B) ADNc. Les zones en gris sont les zones non-traduites. (adapté de la référence : Hart *et al.*, 2002)

L'exon 4 pourrait être très important pour la structure de la protéine puisqu'il a été démontré comme présentant une forte conservation de séquence entre les espèces,

un grand nombre de cystéines et la présence de 3 domaines EGF qui modulent les interactions entre protéines. (Dahan *et al.*, 2003) La plupart de mutations sont de type faux-sens et affectent des cystéines qui peuvent être impliqués dans la formation de ponts disulfure.

1.2. Manifestations cliniques

La manifestation la plus précoce de la NHFJ est une diminution de l'excrétion fractionnelle d'urate résultant en une hyperuricémie. Généralement, cela se produit avant la puberté. (Kudo *et al.*, 2004) Lors d'une étude menée au Royaume-Uni l'excrétion fractionnelle d'urate (EFur) chez les patients atteints était de $5.1 \pm 1.6\%$ peu importe l'âge ou le sexe, alors que chez des individus en santé l'EFur était de $18,4 \pm 5.1\%$ chez les enfants, $12.8 \pm 2.9\%$ chez des femmes adultes et $8.1\% \pm 3.2$ chez les hommes. (Fairbanks *et al.*, 2002) Dans plusieurs cas, l'hyperuricémie entraîne la goutte. (Turner *et al.*, 2003).

L'acide urique est un produit du métabolisme des purines relativement insoluble dans l'eau. Contrairement à la plupart des mammifères, les humains ne possèdent pas d'uricase, enzyme hépatique qui convertit l'acide urique en allantoiné, un composé plus soluble dans l'eau. Les deux tiers de la production d'acide urique sont éliminés par les reins, alors que le reste se retrouve dans le tractus gastro-intestinal. L'acide urique arrivant via la voie sanguine est filtré librement au niveau du glomérule, la seconde source étant une sécrétion d'acide urique au niveau du tubule proximal. Seulement 10% de cette quantité aboutit dans l'urine, ce qui indique

qu'il est essentiellement réabsorbé. La partie du néphron impliquée dans le transport est le tubule proximal, par l'intermédiaire de l'échangeur urate-anion URAT1. (Dahan *et al.*, 2003)

Parmi les autres manifestations cliniques, les patients avec des mutations de la THP présentent des anomalies au niveau de l'expression de cette protéine et de l'histologie de néphron. Des résultats de biopsies montrent qu'une étape plus tardive du développement de la maladie est l'apparition d'une fibrose interstitielle accompagnée d'une atrophie des tubules, d'un épaissement des membranes tubulaires basales et d'une sclérose du glomérule. (Dahan *et al.*, 2003) (Hart *et al.*, 2002)

En immunohistochimie, l'expression de la THP chez des individus sains est représentée par un marquage intracellulaire diffus, alors qu'à la membrane apicale il est plus intense. Par contre, les individus possédant des mutations de la THP présentent un marquage intracellulaire intense qui suggère la présence d'agrégats de THP. (Dahan *et al.*, 2003) (Rampoldi *et al.*, 2003) En microscopie électronique, du matériel fibrillaire a été observé au niveau du réticulum endoplasmique. (Rampoldi *et al.*, 2003)

Par ailleurs, les individus atteints de NHFJ avec des mutations de la THP présentent une diminution marquée de la sécrétion de cette protéine dans l'urine, comme démontré par la méthode d'immunobuvardage. (Dahan *et al.*, 2003)

(Rampoldi *et al.*, 2003) L'excrétion de la protéine est diminuée de plus de 50% par rapport aux sujets sains, même si l'un des allèles n'est pas muté.

1.3. Progression de la maladie et traitement

Chez certains patients, la progression vers l'insuffisance rénale pourrait être retardée en agissant sur l'hyperuricémie à l'aide d'inhibiteurs de xanthine oxidase ou de médicaments uricosuriques. (Turner *et al.*, 2003) En particulier l'allopurinol semble avoir un rôle néphroprotecteur, ce qui indique que l'acide urique serait en partie impliqué dans le dommage rénal. (Fairbanks *et al.*, 2002) L'efficacité du traitement semble améliorée si la maladie est diagnostiquée précocement. Une équipe avait entrepris une détection pré-symptomatique de la NHFJ chez de jeunes enfants en se basant sur les critères d'hyperuricémie et d'hypoexcrétion d'urate qui apparaissent avant la réduction du taux de filtration glomérulaire. (McBride *et al.*, 1998) De plus, l'avènement de la génétique a proposé un test plus spécifique, soit le séquençage du gène de la THP. Toutefois, chez les patients atteints de cette néphropathie la fonction rénale se dégrade avec le temps, résultant souvent en une insuffisance rénale progressive au bout de 10 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. (Kudo *et al.*, 2004) Dans ces cas, les derniers recours sont la dialyse et la transplantation rénale.

1.4. Étude in vitro de mutations cliniques

Afin d'élucider les mécanismes par lesquels les mutations de la THP causent la NHFJ, des études *in vitro* sur le comportement cellulaire de mutants de cette protéine ont commencé, mais pour l'instant elles n'en sont qu'à leurs débuts. Il semble toutefois que la dynamique du transport intracellulaire ou d'adressage à la membrane de la THP soit affectée lorsqu'elle présente des mutations. Jusqu'à récemment, les expériences effectuées portaient sur des cellules transfectées de façon transitoire et les différences entre le type sauvage et les mutants étaient observées de façon précoce. Sur des cellules HEK293 (rein humain embryonnaire) et de cellules Hela, en microscopie à fluorescence, 6h après transfection, il a été remarqué que la THP sauvage se co-localise avec un marqueur du golgi, alors que les mutants touchant des cystéines retrouvées en clinique se co-localisent avec un marqueur du réticulum endoplasmique. Cette rétention au RE des mutants indique un défaut de repliement, menant à une maturation plus lente, ce qui est suggéré aussi par un marquage membranaire de la THP effectué au FACS après 14h, où les mutants présentent un nombre de cellules positives pour la THP membranaire qui est significativement diminué par rapport au type sauvage. (Rampoldi *et al.*, 2003) Les mêmes expériences en immunofluorescence et en cytométrie en flux, également sur des cellules HEK293, ont été effectuées par une autre équipe en utilisant deux autres mutations cliniques touchant des cystéines et les résultats obtenus étaient semblables. (Tinschert *et al.*, 2004) Très récemment, des transfectants stables ont été générés pour la THP de type sauvage et 2 formes mutantes retrouvées en clinique, soit la substitution d'une cystéine pour une tyrosine et une délétion de 9 acides aminés. Ces deux mutants semblaient présenter une diminution de la sécrétion de la THP dans le milieu, tel que vérifié par ELISA, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose par

rapport au type sauvage. L'utilisation de chaperones comme la colchicine et le sodium 4-phénylbutyrate corrigeait cette situation en augmentant la sécrétion de la THP et en diminuant l'apoptose. (Choi, 2005)

2. Structure de la THP

Comme mentionné précédemment, la THP est synthétisée par un type particulier de cellules épithéliales du rein, soit celles de l'anse ascendante large de Henlé et au tout début du tubule contourné distal. Sa localisation est illustrée à la figure 2 (page 10). C'est la protéine la plus abondante de l'urine humaine, où elle est excrétée à raison de 50 à 100 mg par jour. (Cavallone *et al.*, 2001) Dans l'urine, elle polymérise et fait partie de la matrice des cylindres urinaires.

La structure cristallographique n'a pas encore été déterminée, mais sa structure primaire a été caractérisée lorsque son ADNc a été séquencé. (Pennica *et al.*, 1987) C'est une grande protéine de 640 acides aminés qui est fortement conservée entre les espèces. Les 24 premiers acides aminés forment un peptide signal qui est clivé dans la forme mature de la protéine. La THP possède 48 résidus cystéines tous conservés entre les espèces qui peuvent former des ponts disulfure entre eux. C'est une glycoprotéine dont les carbohydrates représentent 30% du poids moléculaire. Elle possède 8 sites potentiels de N-glycosylation. Elle est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur immature de 84 kDa dont les étapes de glycosylation s'effectuent au RE puis au Golgi pour lui donner un poids moléculaire de 97 kDa. Ces deux formes de la THP ont été observées par marquage métabolique de cellules

HeLa transfectées de façon stable. (Serafini-Cessi *et al.*, 1993) La THP possède différents domaines décrits ci-dessous et illustrés à la figure 3. (Page 11)

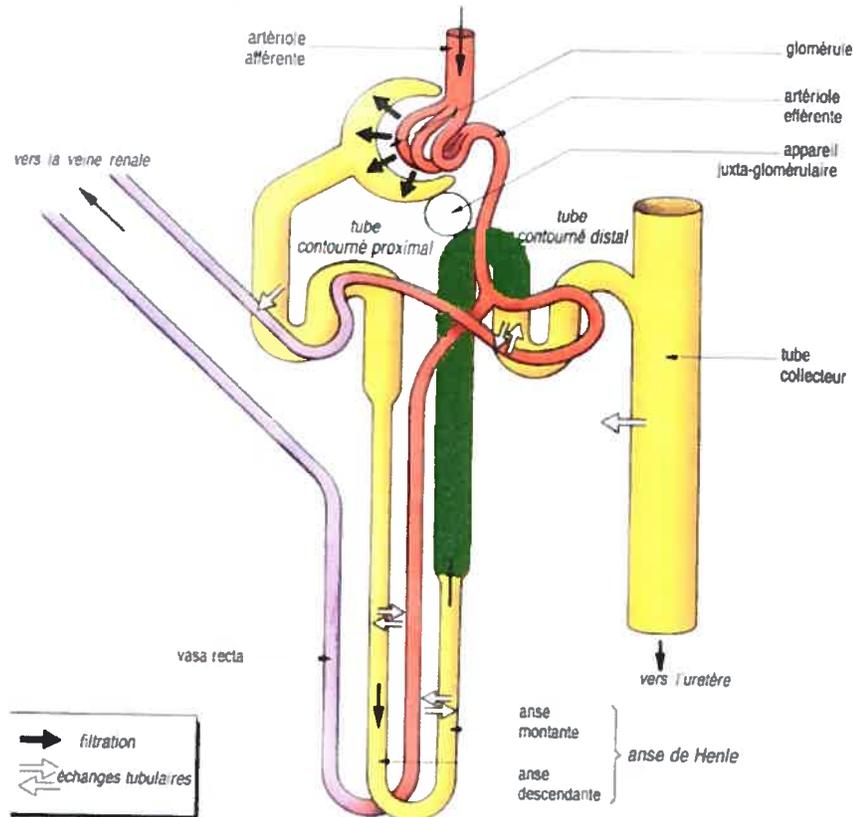


Figure 2. Schéma du néphron et localisation de la THP (en vert).

2.1. Ancrage *Glycosyl Phosphatidylinositol*

La destination finale de la THP est la membrane apicale des cellules épithéliales, donc vers le côté luminal du tubule. Elle ne possède pas de domaine transmembranaire ni de queue cytoplasmique et se retrouve entièrement du côté extracellulaire, liée par un ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) attaché à la protéine en N-terminal sur l'acide aminé 614. L'ancrage GPI est considéré comme un

signal d'adressage de la protéine à la membrane apicale de cellules polarisées. Toutefois, une étude récente tend à montrer que cette fonction reviendrait aussi aux N-glycaux. Les protéines membranaires ancrées par un GPI représentent un groupe vaste qui comprend des protéines aux fonctions diversifiées, telles des enzymes, des molécules d'adhésion, des marqueurs de différenciation. Plus spécifiquement dans le rein, outre la THP, il y a plusieurs protéines ancrées par un GPI, telles l'anhydrase carbonique de type IV, la phosphatase alcaline, Thy-1, BP-3, l'aminopeptidase P et la dipeptidyl peptidase. (Brown and Breton, 2000) L'ajout de l'ancrage GPI pré-assemblé se fait dans la lumière du réticulum endoplasmique par une réaction de transamidation suite au clivage de la protéine au niveau d'un signal hydrophobe en C-terminal. (Serafini-Cessi *et al.*, 2003)

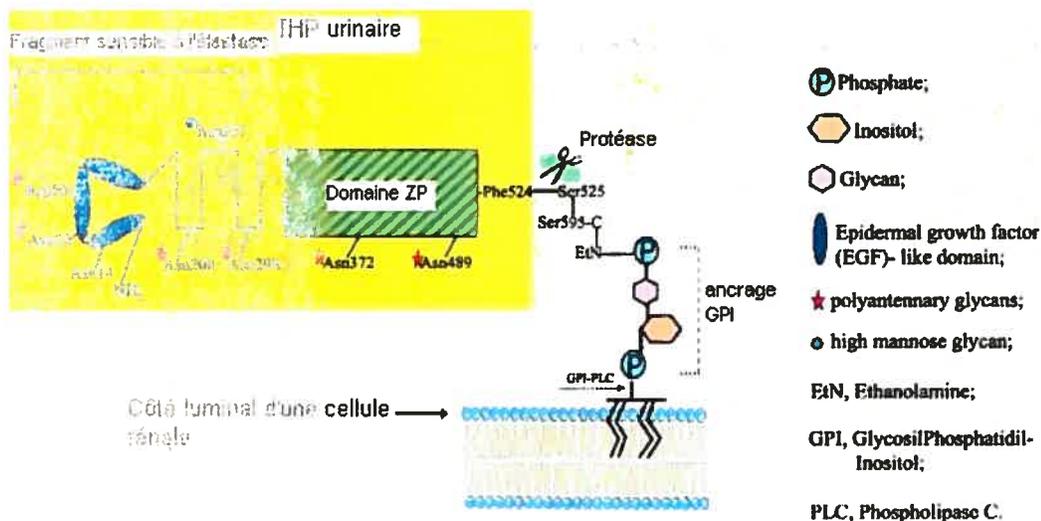


Figure 3. Modèle structurel de la THP (adapté de la référence : Serafini-Cessi *et al.*, 2003)

La fonction du domaine GPI n'a pas encore été bien définie. Pour certaines protéines, comme le récepteur du folate, il semble essentiel puisque sa fonction est abolie si le GPI est remplacé par un domaine transmembranaire, alors que dans le cas de d'autres protéines comme le CD73 la fonction n'est pas perturbée si le GPI est remplacé par un domaine transmembranaire. Par contre, il semble que l'ancrage GPI confère aux protéines un temps de résidence à la membrane plus long qu'un domaine transmembranaire en ralentissant le « turn-over ». Aussi, le GPI, en plus de servir d'ancrage, agirait comme transducteur de signal dans diverses fonctions cellulaires comme l'influx de calcium, la phosphorylation des protéines tyrosines, la sécrétion de cytokines, l'inhibition ou la prolifération de la croissance. Cela pourrait être expliqué en partie par le fait que certaines protéines à ancrage GPI interagissent avec des protéines transmembranaires, telles des récepteurs, pouvant moduler leur activité. Dans les cellules polarisées, comme les cellules épithéliales rénales, le GPI ancré à une protéine est l'un des signaux qui dirigent cette protéine à la membrane apicale. Ce ciblage à la membrane est fortement affecté par une déplétion en cholestérol et en sphingolipides. (Chatterjee and Mayor, 2001) En effet, certaines protéines à ancrage GPI semblent présenter une forte affinité pour des microdomaines appelés radeaux lipidiques qui sont enrichis en cholestérol et en sphingolipides et peuvent se déplacer selon un modèle membranaire de mosaïque fluide. (Legler *et al.*, 2005)

Dans le cas de l'uromoduline, l'ancrage GPI est clivé lorsque cette protéine membranaire est libérée dans l'urine, puisqu'elle ne réagit pas avec des anticorps qui détectent des déterminants inositol phosphate. Il a été suggéré que ce clivage se fait

66 acides aminés en aval du site d'attachement de l'ancre GPI, soit par une protéase ou une phospholipase D, mais non une phospholipase C. (Kobayashi *et al.*, 2004)

2.2. *Domaine Zona pellucida*

Également en C-terminal, la THP possède un domaine d'homologie appelé *Zona pellucida* qui s'étend des acides aminés 336 à 585. (Rampoldi *et al.*, 2003) Cette séquence est partagée entre autres par des protéines telles les récepteurs spermatiques ZP2 et ZP3, la glycoprotéine-2, les tectorines α et β , qui possèdent toutes un domaine transmembranaire ou un ancrage GPI, plusieurs étant sécrétées. La fonction de ce domaine n'est pas déterminée, mais il a été suggéré qu'il agirait comme un module de polymérisation des protéines, puisqu'il se retrouve dans des protéines impliquées dans la formation de matrices et des filaments. La THP, lorsqu'elle est sécrétée dans l'urine polymérise au pH acide et forme des protofilaments qui s'enroulent sous forme de doubles hélices. Des expériences sur la protéine ZP2 ont montré que bien que ce domaine soit situé en C-terminal il n'est pas nécessaire à la sécrétion de cette protéine, mais plutôt à son assemblage. (Jovine *et al.*, 2002) Récemment, en étudiant la protéine ZP3 un modèle a été suggéré pour expliquer le mécanisme d'assemblage des protéines à domaine ZP en polymères. À l'intérieur du domaine ZP il y aurait deux sous-domaines formés de motifs dupliqués, le EHP (external hydrophobic patch) et le IHP (internal hydrophobic patch). Lorsque la protéine se retrouve à la membrane ces deux domaines interagiraient entre eux pour empêcher les protéines de polymériser. Toutefois, lorsque la protéine est clivée en C-terminal, le domaine EHP est enlevé et une fois sécrétées les protéines peuvent

polymériser en se liant via leurs domaines IHP respectifs. (Jovine *et al.*, 2002) Le domaine zona pellucida se retrouve aussi dans des protéines impliquées dans le développement des organes, telles Piopio et Dumpy chez la Drosophile. Il a été suggéré que ces deux protéines feraient partie d'une matrice formant une sorte de réseau qui permettrait aux réarrangements cellulaires de se faire de façon structurée. (Jazwinska *et al.*, 2003)

2.3. *Domaine D8C*

Ce domaine identifié récemment est présent dans des protéines telles que LZP, GP-2 en plus de la protéine de Tamm-Horsfall. Sa localisation diffère selon la protéine. Dans le cas de la THP humaine, il se retrouve entre le troisième domaine EGP et le domaine Zona Pellucida. Le domaine D8C s'étend sur environ 130 acides aminés et sa structure secondaire est composée de 7 feuillets bêta. Il comprend 8 résidus cystéines qui peuvent potentiellement former quatre ponts disulfure, donc il jouerait un rôle structurel dans les protéines. (Yang *et al.*, 2004)

2.4. *Domaines EGF*

La séquence de l'uromoduline prédit la présence de trois domaines EGF (epidermal growth factor) qui contiennent également une séquence consensus qui lie le calcium. (Pennica *et al.*, 1987) Le domaine EGF est souvent présent sous forme de plusieurs copies en tandem et sa présence caractérise une vaste famille qui représente environ 3% de toutes les protéines potentielles du génome humain. (Lin *et al.*, 2001)

Ce domaine se retrouve dans plusieurs protéines membranaires et extracellulaires, telles des enzymes impliquées dans la coagulation sanguine ou la fibrinolyse, des récepteurs comme celui des LDL ou des protéines de matrices comme la fibrilline. Ce module est généralement composé d'environ 45 acides aminés, dont 6 cystéines qui forment des ponts disulfure stabilisant la structure. Les modules EGF peuvent servir à médier des interactions entre protéines, comme c'est le cas pour l'urokinase et son récepteur. (Stenflo *et al.*, 2000)

Environ le quart des domaines EGF possède un site de liaison au calcium. (Stenflo *et al.*, 2000) Il a été postulé que la liaison du calcium dans ce domaine serait très importante pour la morphologie de la protéine. (Werner *et al.*, 2000) Une autre étude a suggéré que la liaison du calcium protégerait les domaines EGF contre la dégradation protéolytique. (Reinhardt *et al.*, 1997)

3. Fonctions proposées pour la THP

La structure de la THP peut fournir certains indices quant à sa fonction, mais pour l'instant le rôle exact de cette protéine n'a pas été déterminé. Toutefois, des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent certaines fonctions.

3.1. Modulation de la réponse immunitaire

In vitro, il a été démontré que la protéine de Tamm-Horsfall pouvait lier certaines cytokines recombinantes comme IL-1 et TNF. (Hession *et al.*, 1987) Une

étude a montré que la THP peut activer *in vitro* des monocytes, donc les amener à produire du TNF- α et du facteur tissulaire (TF) des molécules-clés dans l'initiation de la réponse inflammatoire et de la coagulation sanguine. (Su *et al.*, 1997) Également, ajoutée dans du milieu de culture, la THP augmente la phagocytose par les neutrophiles polymorphonucléaires via l'augmentation de l'expression membranaire des récepteurs du complément CR1 et CR3. (Yu, 1992). Une autre étude a également pointé vers une activation des phagocytes mononucléaires par la THP, donc une réponse inflammatoire avec relâchement de radicaux libres et de protéinases, pouvant causer un dommage interstitiel et une fibrose. (Thomas *et al.*, 1993) La liaison entre la THP et les neutrophiles polymorphonucléaires a fait l'objet d'une autre étude qui a montré que les neutrophiles adhéraient très peu avec des cellules exprimant la THP à leur surface. Par contre, après une opsonisation avec des anticorps dirigés contre la THP, il y avait augmentation de l'adhérence des neutrophiles et une activation des radicaux libres à l'intérieur de ces cellules, parallèlement à un relâchement de la THP. Ainsi, suite à une réponse auto-immune dans la néphrite tubulo-interstitielle l'accumulation de la THP pourrait être augmentée. (Cavallone *et al.*, 1999) Un travail a aussi attribué à la THP un rôle dans la modulation des leucocytes polymorphonucléaires. À des concentrations élevées, comme celles retrouvées dans l'urine, la THP inhibe l'apoptose et la chimiotactisme de ces cellules immunitaires, alors qu'elle stimule leur activité phagocytaire. À des concentrations faibles, comme celles retrouvées dans le sang, la THP a pour effet d'augmenter la chémotaxie de ces cellules. Ainsi des dépôts de THP pourraient exacerber une réponse inflammatoire. (Wimmer *et al.*, 2004) En ce qui concerne l'immunité spécifique, la THP pourrait

agir comme molécule co-stimulatrice dans l'activation des lymphocytes T. (Mishra *et al.*, 1994)

3.2. *Protection contre les infections urinaires*

Récemment, la THP a été identifiée comme un facteur liant l'immunité innée et acquise en mettant l'accent sur les infections urinaires. Elle a été démontrée comme un activateur des cellules présentatrices d'antigènes, en particulier les cellules dendritiques, via l'activation du récepteur TLR4, une voie qui est empruntée aussi par les LPS. (Saemann *et al.*, 2005) Cette étude faisait suite aux résultats obtenus avec des souris knock-out pour la THP. Une première équipe a inoculé la vessie de souris avec la THP de type sauvages ou déficientes en THP en utilisant différentes souches de *E. coli*, la bactérie impliquée dans 85% des infections urinaires. Les souris knock-out infectées avec certains types de *E. coli* présentaient une colonisation bactérienne plus importante que le type sauvage, suggérant un rôle protecteur de la THP dans les infections urinaires, possiblement en séquestrant les bactéries par la liaison de certains de ses carbohydrates aux parois bactériennes. (Bates *et al.*, 2004) Les mêmes conclusions ont été tirées par une autre équipe. (Mo *et al.*, 2004b)

3.3. *Protection contre les lithiases*

La structure de la THP suggère que par ses domaines EGF qui lient le calcium, elle pourrait séquestrer cet ion et offrir ainsi une protection contre les lithiases. Les patients lithiasiques présentent une diminution de l'excrétion de la THP

(Romero *et al.*, 1997). Une étude sur le modèle murin knock-out pour la THP a montré que les souris déficientes en THP formaient spontanément des pierres calciques au rein à l'âge adulte. De plus, la THP semble coopérer avec l'ostéopontine dans la protection contre les lithiases, car chez des souris de type sauvage soumise à une surcharge de calcium/oxalate dans l'alimentation cette protéine est légèrement surexprimée et les pierres rénales n'apparaissent pas. Toutefois, chez des souris déficientes en THP malgré une importante surexpression de l'ostéopontine il y a formation de lithiases calciques. (Mo *et al.*, 2004a)

3.4. Rôle régulateur dans la fonction rénale

Des expériences *in vitro* ont suggéré que la THP agirait comme une barrière à l'eau tout en laissant passer les ions. (Mattey and Naftalin, 1992) Une équipe a proposé un rôle de la THP dans le transport du sodium en soumettant des rats à une diète riche en sel. Par rapport à des doses de NaCl basses, les animaux nourris avec des quantités élevées, présentaient une augmentation de la quantité de THP en ARNm ainsi qu'en protéine. La THP était aussi augmentée après ajout de furosémide, un diurétique de l'anse. (Ying and Sanders, 1998) Plus récemment, des études effectuées sur des souris knock-out suggèrent un rôle régulateur de la THP au niveau du transport d'ions dans le rein. Les souris déficientes en THP présentent une diminution du taux de filtration glomérulaire et une difficulté à concentrer l'urine en condition de privation d'eau. De plus, l'expression de plusieurs transporteurs et canaux ioniques comme le NKA, NHE3, NKCC2, ClC-K2 est augmentée chez le knock-out, menant à spéculer qu'une déficience en THP diminue l'efficacité de ces

transporteurs, nécessitant l'augmentation de leur synthèse. (Bachmann *et al.*, 2005)
D'autre part, l'étude de rats exhibant un phénotype d'hyperthyroïdie a montré une diminution de la THP, alors que l'excrétion de vasopressine était augmentée, suggérant un rôle possible de la THP dans les mécanismes de concentration et de dilution urinaire. (Schmitt *et al.*, 2004)

4. Voie sécrétoire et contrôle de qualité

Pour être en mesure d'accomplir sa fonction, la THP, tout comme d'autres protéines, doit subir des étapes qui vont au-delà de la transcription et de la traduction. Il faut qu'elle s'engage dans la voie sécrétoire et voyage entre plusieurs organelles, où elle acquiert des modifications post-traductionnelles et une structure tertiaire qui lui permettront d'être fonctionnelle. Un schéma des compartiments cellulaires impliqués dans l'exocytose est présenté à la figure 4. (page 20)

4.1. Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un réseau de tubules qui sont en continuité entre eux et avec la membrane nucléaire. Il est formé par le réticulum lisse qui a une apparence plus dilatée et par le réticulum rugueux sur lequel sont présents les ribosomes. (Voeltz *et al.*, 2002) Les protéines sont traduites sur des ribosomes au niveau du cytoplasme. Généralement, la chaîne peptidique est insérée dans le réticulum endoplasmique en cours de traduction, car les premiers acides aminés en N-terminal forment une séquence signal qui est reconnue par SRP, un complexe ribo-protéique.

Le groupe formé par le polypeptide, le ribosome et SRP est reconnu par le récepteur SR associé à la membrane du RE. (Egea *et al.*, 2005)

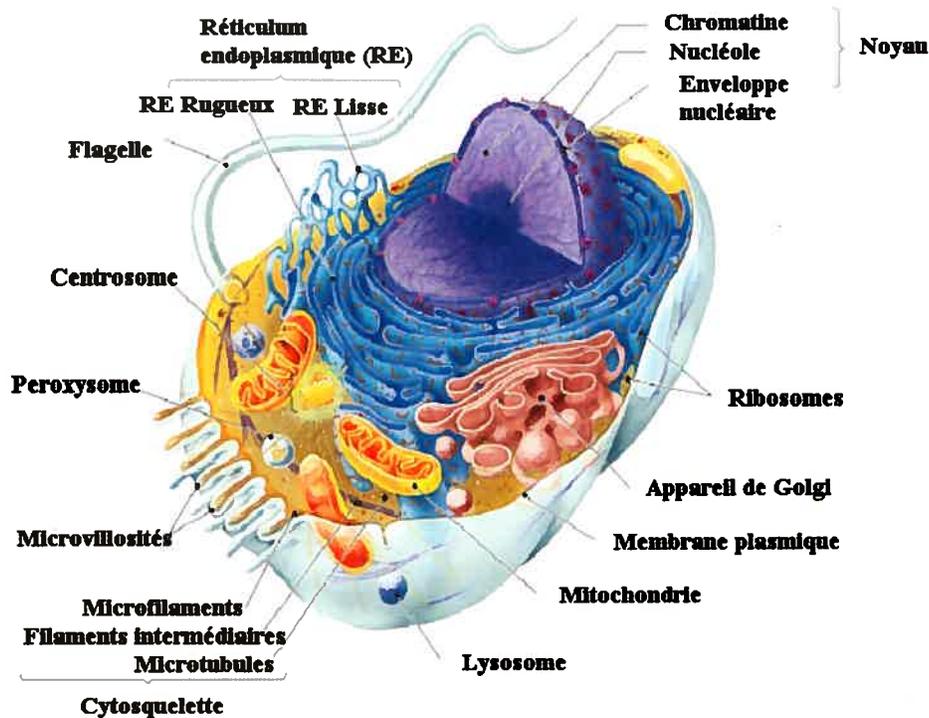


Figure 4. Schéma des compartiments cellulaires

L'insertion du polypeptide au niveau de la lumière du RE se fait à travers un complexe appelé le translocon Sec61p qui a été proposé comme une sorte de tunnel. (Matlack *et al.*, 1998) Le diamètre du pore contenu dans le translocon a été estimé à entre 40 et 60 Å (Hamman *et al.*, 1997). Cela explique que les peptides soient insérés en cours de traduction, car ce canal serait trop petit pour accommoder des protéines complètement traduites, puisqu'elles seraient engagées dans des étapes de repliement.

Lorsque les protéines sont insérées dans le RE ou après leur insertion, elles subissent des modifications covalentes comme la glycosylation, la formation de ponts disulfure, l'ajout d'un ancrage GPI. Les protéines acquièrent une structure tertiaire grâce à des chaperones résidentes du RE, qui font également partie d'un système appelé le contrôle de qualité qui s'assure que les protéines soient bien repliées avant de leur permettre de poursuivre plus loin dans la voie sécrétoire. (Schulein, 2004) Les principales protéines impliquées dans le repliement sont présentées dans les paragraphes qui suivent.

4.1.1. Lectines - Calnexine/Calréticuline

Les lectines sont des protéines qui s'associent avec des carbohydrates. Cette famille comprend la calnexine et la calréticuline, qui au niveau du réticulum endoplasmique participent au repliement de plusieurs glycoprotéines. La calnexine est une protéine abondante, ancrée à la membrane du RE et sa fonction comme chaperone a été suggérée lorsqu'il a été observé qu'elle s'associait de manière transitoire et spécifique avec des glycoprotéines qui n'étaient pas complètement repliées. (Ou *et al.*, 1993) La calréticuline, possède une structure semblable, mais elle est présente sous forme soluble à l'intérieur de la lumière du RE et en plus de participer au repliement des glycoprotéines elle est impliquée dans l'homéostasie du calcium qu'elle peut lier. (Gelebart *et al.*, 2005)

Un modèle a été proposé pour expliquer de quelle manière les lectines peuvent participer au repliement de plusieurs glycoprotéines. Ces principes pourraient

s'appliquer à la THP, puisqu'elle contient 8 sites potentiels de glycosylation. Comme les protéines peuvent lier différentes chaperones, il a été déterminé que si la glycoprotéine contient ses sites de N-glycosylation à l'intérieur de 50 résidus du N-terminal, elle s'associe tout d'abord avec la calnexine et la calréticuline. (Molinari and Helenius, 2000) La suite d'événements impliquée dans ce processus a été baptisée le cycle calnexine-calréticuline. (Hammond and Helenius, 1994) Il est représenté à la figure 5 (page 23).

L'étape première de ce cycle est l'ajout de glycans Glc3Man9GlcNAc2 (donc contenant trois glucoses) dans la lumière du RE par des oligosaccharyl transférases sur des résidus asparagine. Par la suite, grâce à l'action de la glucosidase I, un premier glucose est enlevé, puis un deuxième est coupé par la glucosidase II générant des résidus mono glycosylés. Cet intermédiaire de glycosylation peut être lié par la calnexine et/ou la calréticuline. À ces lectines peut s'attacher ERp57 qui catalyse la formation de ponts disulfure. Par la suite, le dernier glucose restant est trimé par la glucosidase II et la protéine peut poursuivre son chemin dans la voie sécrétoire. Si la protéine n'est pas correctement repliée, elle est reglycosylée par une glucosyl transférase, donc elle peut à nouveau s'associer aux lectines. Ce cycle se poursuit jusqu'à ce que la protéine ait atteint la conformation appropriée ou qu'elle soit envoyée vers la voie de dégradation. (Helenius and Aebi, 2001) Ces étapes de déglycosylation et de reglycosylation constituent un aspect important du contrôle de qualité pour plusieurs protéines.

4.1.2. Disulfure isomérases – PDI et Erp57

Outre la glycosylation, une autre modification covalente importante pour la structure et la fonction des protéines est la formation de ponts disulfure. Cette modification est essentielle pour la stabilité de plusieurs protéines. Comme mentionné précédemment, la THP contient 48 cystéines, qui peuvent potentiellement former 24 ponts disulfure entre elles.

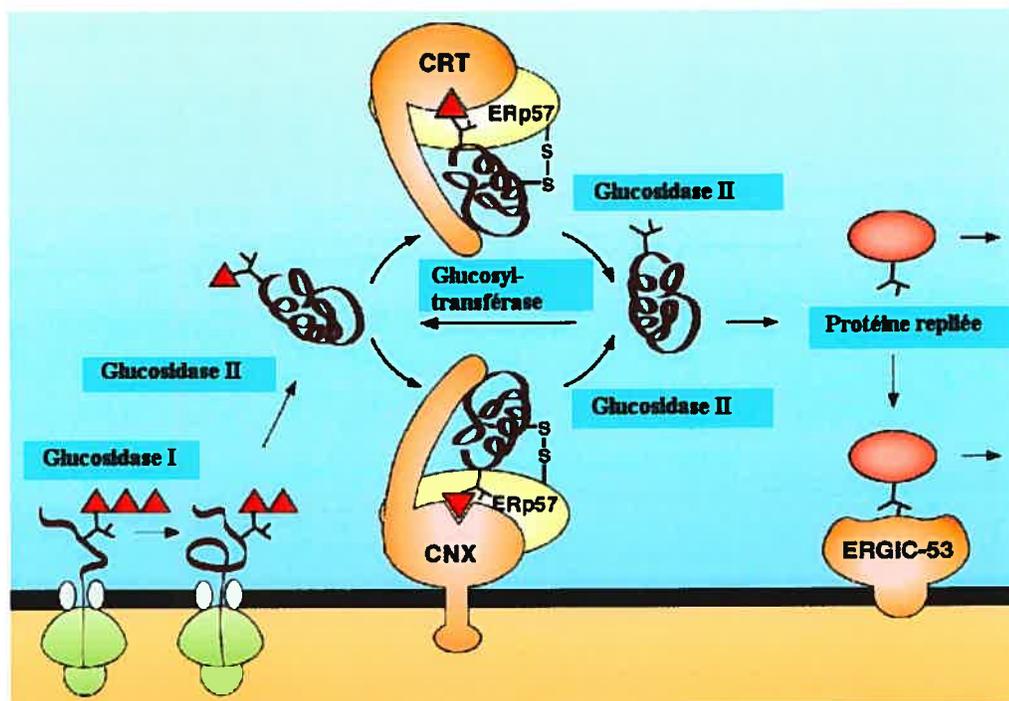


Figure 5. Cycle calnexine-calréticuline (adapté de Helenius, 2001)

L'établissement de ponts disulfure se fait par des réactions d'oxydation. Lorsque les ponts disulfure sont incorrects, il faut les briser par réduction et les réarranger par isomérisation. (Ellgaard and Ruddock, 2005) Ces réactions sont accomplies par la famille des protéines disulfure isomérases. (Freedman *et al.*, 1994) Ces protéines sont composées de multiples domaines qui ressemblent à ceux de la réductase cytosolique thioredoxine (Frickel *et al.*, 2004) et leurs sites se caractérisent

par un motif de deux cystéines séparées par deux acides aminés. Jusqu'à maintenant, chez l'humain, 14 membres ont été identifiés dans cette famille, mais seulement une partie d'entre eux sont capables de catalyser les réactions efficacement. (Ellgaard and Ruddock, 2005)

Le membre principal de cette famille et le premier à être caractérisé, la PDI, peut remplir les trois fonctions de catalyseur d'oxydation, de réduction et d'isomérisation des thiols-disulfures. (Schwaller *et al.*, 2003) Pour catalyser la formation de ponts disulfure l'enzyme PDI doit se trouver dans un état oxydé et cette oxydation se fait par l'action de Ero1p. (Frard and Kaiser, 1999) L'oxidoréductase Ero1p, quant à elle, semble être retenue au RE par la protéine Erp44, puisqu'elle-même ne possède pas de signaux de rétention au RE. (Anelli *et al.*, 2003)

Un second membre de la famille PDI assez bien caractérisé est Erp57. C'est le plus proche homologue de la protéine PDI avec 33% d'identité en terme de séquence en acides aminés. (Ferrari and Soling, 1999) L'oxidoréductase Erp57 joue un rôle particulier dans l'établissement de ponts disulfure pour les glycoprotéines puisqu'elle s'associe avec les lectines calréticuline et calnexine. L'association avec la calréticuline semble s'effectuer faire via le domaine P de celle-ci. Possiblement, cette spécificité explique une diminution d'efficacité de Erp57 par rapport à PDI interagit directement avec ses substrats via un de ses domines, alors que Erp57 utilise possiblement ce domaine pour lier les lectines. (Frickel *et al.*, 2004)

4.1.3. Famille Hsp70 – Bip

Un autre système important du contrôle de qualité met en scène la famille Hsp70. Ces protéines utilisent l'ATP comme moteur pour lier les chaînes polypeptidiques naissantes. (Kassenbrock and Kelly, 1989) La mieux caractérisée de cette famille est la protéine Bip (aussi appelée GRP78) qui est soluble et présente en grande quantité dans la lumière du RE. Cette chaperone lie les résidus hydrophobes exposés à la surface de protéines mal repliées ou en cours de repliement. (Flynn *et al.*, 1991) Bip peut donc lier une importante quantité de protéines et peut même prendre le relais du système calréticuline/calnexine lorsque celui-ci est rendu inaccessible, par exemple en ajoutant un agent réducteur, tel le DTT, dans le milieu. (Molinari and Helenius, 2000) L'augmentation de la transcription de cette protéine sert de marqueur du stress du RE causé par une accumulation de protéines mal repliées. Ce rôle sera élaboré plus loin.

4.2. ERGIC

Le second compartiment par lequel les protéines synthétisées transitent est l'ERGIC, un intermédiaire dans le transport du RE au Golgi. Leur sortie du RE se fait dans des vésicules enveloppées de protéines du complexe COPII. Le compartiment ERGIC, aussi appelé VTC, est un réseau tubulo-vésiculaire localisé proche de l'appareil de Golgi et en périphérie de la cellule. La genèse de ce compartiment a laissé place à deux hypothèses, soit le modèle selon lequel l'ERGIC serait formé par la fusion de nouvelles vésicules de transport ou qu'il serait un compartiment stable

préexistant. (Schulein, 2004) Comme marqueur de ce compartiment, la protéine transmembranaire p53 a été proposée pour l'être humain. (Bannykh *et al.*, 1998)

Des études suggèrent que le compartiment intermédiaire pourrait aussi jouer un rôle dans le contrôle de qualité. Il semble reconnaître certaines protéines mal repliées qui auraient échappé au contrôle de qualité du RE et les rediriger dans ce compartiment. Ce transport rétrograde se ferait dans des vésicules enveloppées de protéines du complexe COPI. (Schulein, 2004)

4.2. Appareil de Golgi

Les protéines poursuivent ensuite leur maturation au Golgi, où elles sont transportées dans des vésicules COPII. L'ultrastructure de l'appareil de Golgi se présente comme une suite de citernes aplaties entourées de vésicules et de tubules. Le nombre de citernes est variable selon les espèces et les tissus examinés. Ces citernes peuvent être divisées en trois régions, soit le Golgi-cis qui fait face au RE, suivi du Golgi-médian puis du Golgi-trans. Deux modèles différents ont été proposés pour expliquer le cheminement des protéines dans le Golgi. Une première hypothèse est la « maturation cisternale » qui implique que des vésicules dérivées de l'ERGIC fusionnent du côté cis pour former une citerne qui va maturer en cheminant jusqu'au côté trans. Le second modèle propose que les protéines soient transportées dans des vésicules d'une citerne à l'autre. (Pelham, 1998)

Tout comme dans l'ERGIC, les protéines enveloppées dans des vésicules de type COPI sont transportées de façon rétrograde, indiquant qu'une protéine qui aurait échappé au contrôle de qualité initial peut être retournée au RE. (Pelham, 1998)

5. Stress du RE

Certaines conditions peuvent compromettre le repliement des protéines au réticulum endoplasmique. Des exemples incluent l'ischémie, la privation de glucose, la surproduction de protéines ou la présence de protéines mutantes. (Rutkowski and Kaufman, 2004) Ces conditions ont en commun le fait de surutiliser la machinerie de repliement du réticulum, ce qui cause un stress sur cette organelle, menant à ce qui est qualifié de réponse aux protéines mal repliées (UPR).

5.1. Senseur Bip

Des modèles récents ont proposé Bip, la chaperone la plus abondante du RE, comme plaque tournante de la réponse cellulaire suite à une augmentation de protéines incorrectement repliées. Bip lie les résidus hydrophobes exposés à la surface de protéines mal repliées. Lorsque des cellules sont transfectées avec des protéines sauvages et mutantes, les marquages métaboliques montrent des temps d'association avec Bip plus longs pour les versions mutantes des protéines, par exemple pour le récepteur LDL, démontrant que les mutants nécessitent des efforts de repliement supplémentaires pour les cellules. (Jorgensen *et al.*, 2000) Suite à un stress du RE, Bip peut être régulé au niveau de sa traduction. Si cela n'est pas suffisant, sera

alors enclenchée la réponse aux protéines mal repliées (UPR) qui va augmenter sa transcription. (Gulow *et al.*, 2002)

Dans des conditions physiologiques normales, la protéine soluble Bip se retrouve liée aux protéines qu'elle aide à replier, mais une partie importante lie aussi les protéines membranaires ATF6, IRE1 et PERK les gardant inactives. Lorsque les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, la chaperone Bip lie ces protéines, libérant ainsi les trois protéines membranaires indiquées ci haut et les rendant actives pour leur permettre de s'engager dans la réponse UPR. (Figure 6 à la page 29)

5.1.1. ATF-6

ATF-6 est une protéine de 90 kDa présente de façon constitutive à la membrane du RE. (Haze *et al.*, 1999) Lorsqu'ATF-6 est libéré de son interaction avec Bip lors d'un stress du RE, il migre dans l'appareil de Golgi via des vésicules COPII. (Nadanaka *et al.*, 2004) Là, il est clivé de façon séquentielle par les protéases SP1 et SP2 pour générer un fragment qui devient un facteur de transcription actif. (Shen and Prywes, 2004) Cette nouvelle protéine de 50 kDa acquiert une localisation nucléaire. ATF-6 peut alors stimuler la transcription de chaperones, telles Bip, en se liant directement sur leur promoteur à une région consensus appelée l'élément de réponse au stress du RE (ERSE). (Yoshida *et al.*, 1998) ATF-6 lie également l'élément ERSE du facteur de transcription XBP-1 et augmente sa transcription. L'ARNm est XBP-1 doit être augmenté avant qu'il ne puisse être épissé pour générer la forme active qui

peut augmenter sa propre transcription et celle de Bip en se liant aux éléments ERSE.

(Yoshida *et al.*, 2001)

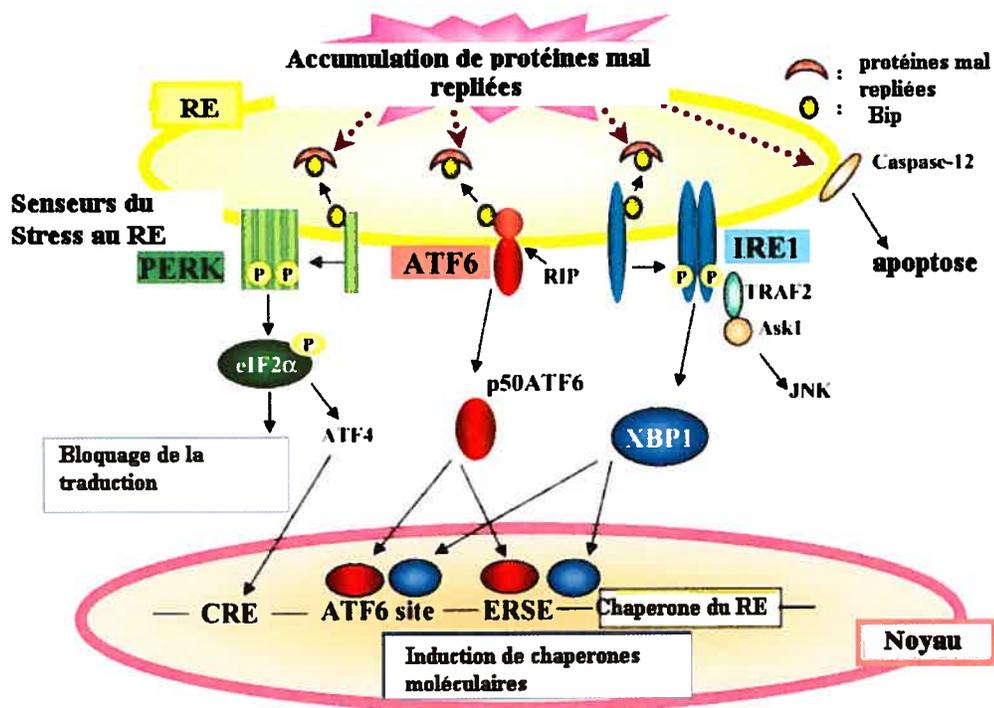


Figure 6. Mécanismes de la réponse au stress du RE (adapté de Imaizumi, 2004)

5.1.2. IRE1

IRE1 est une protéine sérine/thréonine kinase qui possède également une activité endoribonucléase. Deux homologues existent chez l'être humain, soit IRE1 α qui est exprimé de façon ubiquitaire et IRE1 β qui est présent seulement dans les poumons et l'intestin. (Miyoshi *et al.*, 2000) Lorsqu'il est libéré de son interaction avec Bip, il dimérise via des acides aminés dans son domaine luminal et devient actif. (Liu *et al.*, 2002) Son activité RNase s'exerce directement sur XBP-1, en excisant un

intron de 26 paires de bases, permettant de coder pour un facteur de transcription actif. (Calfon *et al.*, 2002). Comme indiqué précédemment cette étape nécessite l'activation de la voie ATF-6 pour augmenter la transcription de XBP-1, donc c'est une étape un peu plus tardive de l'UPR.

5.1.3. PERK

Alors qu'ATF-6 et IRE1 agissent sur la transcription, la protéine PERK influence la traduction, qui en fait est la première réponse cellulaire de la voie UPR. (Rutkowski and Kaufman, 2004) Lorsqu'elle n'est plus liée à la chaperone Bip, PERK dimérise et peut exercer son action kinase sur le facteur de traduction eIF2 α qui, une fois phosphorylé, devient inactif, menant à une diminution de la traduction de la plupart des ARNm. Cela permet de réduire la quantité de protéines que le réticulum endoplasmique reçoit pour être repliées.

De plus, ce moyen permet d'augmenter certaines protéines qui sont indépendantes d'eIF2 α pour leur traduction, comme le facteur de transcription ATF-4. Celui-ci peut augmenter la transcription de Bip en se liant à une région promotrice différente du ERSE. Il augmente aussi l'expression de CHOP, une protéine impliquée dans l'apoptose. (Luo *et al.*, 2003)

5.2. Dégradation et protéasome

En plus d'augmenter la machinerie de repliement, une autre façon pour la cellule de gérer une augmentation de protéines mal repliées suite à des mutations ou des dommages métaboliques est d'envoyer ces protéines vers la voie de dégradation (ERAD). Le joueur clé de ce processus est le système ubiquitine-protéasome. Ce système est utilisé en conditions physiologiques, puisque des protéines sont sans cesse dégradées. Cependant, il devient encore plus sollicité lors d'un stress du RE. Généralement, les protéines dirigées vers la dégradation reçoivent sur leurs lysines une étiquette sous forme de chaîne polyubiquitine. L'ubiquitine est un petit polypeptide de 76 acides aminés très conservé et ubiquitaire. (Hershko and Ciechanover, 1998) Par contre, au cours des dernières années il a été démontré que la dégradation par le protéasome pouvait également s'accomplir de façon indépendante de l'ubiquitine. (Orlowski and Wilk, 2003)

Le protéasome est très abondant, représentant environ 0,6% des protéines cellulaires dans les cellules Hela. (Hendil, 1988) Il est présent chez les eucaryotes dans le cytoplasme et/ou le noyau. Dans le cytoplasme, il se trouve associé à la surface externe du réticulum endoplasmique et au réseau du cytosquelette. (Wojcik and DeMartino, 2003) Le protéasome 26S est composé d'un complexe multiprotéique appelé 20S qui est le cylindre catalytique et d'un complexe régulateur 19S. (Groll and Huber, 2004) Avant d'être dégradées, les protéines doivent quitter le RE et être rétro-transloquées dans le cytosol. Ce transport se fait via le translocon Sec61p, tout comme l'entrée des protéines dans le RE. C'est à l'intérieur de la structure catalytique que les protéines sont désubiquitinylées, déstructurées, puis hydrolysées. (Andermarcher *et al.*, 2005) Il existe plusieurs inhibiteurs de ce complexe, dont la

lactacystine et MG-132. (Groll and Huber, 2004) Ces substances ont permis de mettre en lumière l'implication du protéasome dans la dégradation de plusieurs protéines mal repliées, tel un variant mutant du récepteur δ -opioïde. (Petaja-Repo *et al.*, 2001)

5.3. Agrégation

Si la cellule fait face à un nombre important de protéines mal repliées, il se peut que le système des chaperones et celui de la dégradation protéasomique soient surchargés. Les protéines peuvent alors s'accumuler dans la cellule et former des agrégats toxiques. Le résultat de ce phénomène a été caractérisé récemment sous le terme "agresome". L'agresome est un agrégat unique perinucléaire localisé autour des centrosomes, proche du Golgi. C'est un amas de protéines non dégradées, de protéasomes et de molécules d'ubiquitine, entouré d'un halo formé par le filament intermédiaire vimentine. Il semble donc que les protéines inefficacement dégradées ne s'accumulent pas un peu partout dans la cellule, mais qu'elles sont dirigées vers un endroit précis par un transport dépendant des microtubules. (Johnston *et al.*, 1998) Jusqu'à maintenant, il n'a pas été établi si les agresomes jouent un rôle protecteur ou cytotoxique. Par contre, leur présence est notée dans plusieurs maladies dégénératives. Il semble aussi que l'expression de protéines qui s'agrègent diminue l'efficacité du système ubiquitine-protéasome. (Bence *et al.*, 2001) Bien que le phénomène d'agresome soit commun à plusieurs protéines mal repliées, les agrégats peuvent aussi prendre une forme différente. En outre, le peptide amyloïde β forme des agrégats multiples localisés dans le cytosol et le noyau. (Buckig *et al.*, 2002) Des

agrégats protéiques peuvent aussi se former au réticulum endoplasmique. (Tarabal *et al.*, 2005)

5.4. Apoptose

Il a été observé qu'une surcharge du réticulum endoplasmique peut entraîner dans les cellules des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Un stress du RE chronique causé par l'exposition à la tunicamycine, un agent inhibant la N-glycosylation, mène à un rapetissement des cellules, une fragmentation nucléaire et une condensation de la chromatine. (Hitomi *et al.*, 2004b)

La première voie implique les caspases. Avant de présenter le lien entre ces protéines et le stress du RE, cette famille sera introduite brièvement. Les caspases sont une famille de protéases qui normalement résident dans le cytoplasme sous leur forme inactive. Leur activation nécessite un clivage, généralement après un résidu aspartate. Ce clivage s'effectue souvent en deux étapes, la première sépare les grandes sous-unités des petites et la seconde est l'enlèvement du pro-domaine en N-terminal. (Zimmermann and Green, 2001) Le clivage peut être effectué par diverses protéases cellulaires, mais également par un groupe de caspases. Ces caspases constituent la famille des caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9, -10, -12), caractérisées par un long pro-domaine, qui peuvent activer le groupe des caspases effectrices (caspases-3, -6, -7) possédant un pro-domaine court. Une fois activées, les caspases peuvent cliver de façon très sélective des substrats qui vont mener aux altérations morphologiques observées pendant l'apoptose. Leurs cibles incluent des

protéines cytoplasmiques et nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation d'ADN, des protéines kinases et plusieurs autres. (Earnshaw *et al.*, 1999) Récemment, la liste de toutes les cibles des caspases s'élevait à 280 protéines. Des exemples incluent Gas2, impliquée dans l'organisation des microtubules, et dont le clivage contribue aux changements observés dans la forme des cellules. D'autre part, la désintégration du noyau est observée suite au clivage des lamines, protéines participant à la structure de la membrane nucléaire. (Fischer *et al.*, 2003) Une représentation schématique de l'implication des caspases suite à divers stimuli apoptotiques se retrouve à la figure 7 (page 35).

Beaucoup d'études sur le stress du réticulum endoplasmique ont mis l'accent sur la caspase-12, puisqu'elle est localisée à la membrane du RE, du côté cytosolique. Dans un modèle murin, son action a été montrée spécifique à l'apoptose causée par un stress du RE, lorsqu'induit par un excès de protéines dans le RE ou par le peptide amyloïde β . (Nakagawa *et al.*, 2000) Une étude a montré que la caspase-12 peut être clivée et rendue active par la caspase-7, après la translocation de celle-ci du cytoplasme jusqu'au RE. (Rao *et al.*, 2001) Il a été trouvé que la caspase-12 peut activer la caspase-9 qui à son tour clive la caspase-3. (Morishima *et al.*, 2002) Par contre une autre équipe a suggéré que la caspase-12 puisse activer la caspase-3 cytosolique, mais de façon indirecte. (Hitomi *et al.*, 2004b)

Toutefois, il s'est avéré que même si l'être humain possède une protéine homologue à 68% à la caspase-12 murine sur le chromosome 11, l'épissage alternatif rend cette protéine tronquée et inactive. (Fischer *et al.*, 2002) Par contre, chez

l'humain, la caspase-4 présente 48% d'homologie avec la caspase-12 murine. Il a été établi qu'elle est localisée aussi au niveau du RE est qu'elle est activée par clivage lors d'un stress de cette organelle, entre autres causé par une exposition à la tunicamycine. (Hitomi *et al.*, 2004a)

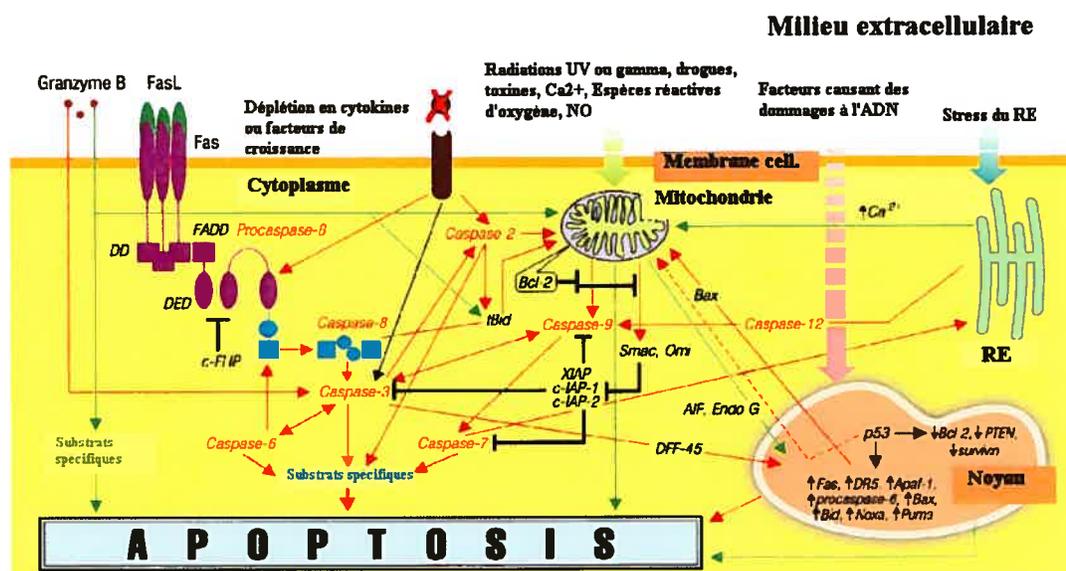


Figure 7. Apoptose et caspases. (adapté de Philchenkov, 2004)

Une autre protéine liée à l'apoptose est CHOP, qui est surexprimé en réponse à un stress du RE. (Barone *et al.*, 1994) Il n'a pas été déterminé de quelle façon cette protéine induit l'apoptose, mais elle mène à une augmentation intracellulaire des espèces réactives d'oxygène en causant un dommage oxydatif et régule l'expression des protéines de la famille Bcl-2, impliquées dans la voie apoptotique mitochondriale. (McCullough *et al.*, 2001) L'implication de la voie JNK par l'intermédiaire de IRE1 a aussi été observée dans l'apoptose causée par un stress du RE. (Urano *et al.*, 2000)

s'accumule à deux endroits différents, dépendamment du mode de transmission de la mutation chez les patients. Les mutations transmises de façon autosomique récessive causent une accumulation de AQ2 au niveau du RE, alors que la transmission autosomique dominante mène à une accumulation dans le Golgi, les endosomes tardifs, les lysosomes ou la membrane basolatérale. Une dégradation partielle de ces protéines mutantes se fait au niveau des lysosomes et du protéasome. (Hirano *et al.*, 2003) D'autres mutations responsables du diabète insipide néphrogénique touchent le récepteur à la vasopressine (AVPR2). Lorsqu'il est muté, la capacité de ce récepteur à lier la vasopressine est fortement réduite, altérant la cascade qui mène à la production d'AMPc et par conséquent l'incorporation des canaux AQ2 à la membrane luminale. (Pan *et al.*, 1994) La plupart des mutants AVPR2 sont des protéines mal repliées et retenues à l'intérieur des cellules. Plus rarement, ils présentent un ARNm instable dégradé rapidement ou sont amenés à la membrane, mais avec des défauts de liaison de la vasopressine. (Reviewé par Fujiwara and Bichet, 2003)

5

6.2. Emphysème héréditaire avec maladie du foie

Ce désordre qualifié de déficience en alpha 1-antitrypsine (AAT) est transmis de façon autosomique récessive. Malgré l'existence de plusieurs mutations, le variant le plus répandu est une substitution d'un glutamate pour une lysine en position 342. (McCracken *et al.*, 1989) Les protéines mutantes sont mal repliées et comme seulement une fraction est dégradée, elles s'accumulent à l'intérieur du RE. Seulement environ 15% des protéines sont sécrétées. (Le *et al.*, 1992) Les mutants activent la réponse UPR, comme en témoigne l'augmentation de l'expression de la

chaperone Bip. (Lawless *et al.*, 2004) Dans le cas du phénotype de cirrhose, il est de plus en plus clair qu'il est causé par l'accumulation des protéines AAT mal repliées dans le RE des hépatocytes, donc un gain de fonction toxique. Par contre, l'emphysème semble être lié au fait que les niveaux d'ATT sécrétée étant très réduits elle est beaucoup moins efficace pour protéger les poumons contre les élastases, donc il s'agit d'une perte de fonction. (Lomas and Parfrey, 2004)

6.3. Rétinite Pigmentaire

Cette maladie dégénérative est caractérisée par une perte de vision nocturne, puis périphérique et centrale. Chez près de 15% des patients elle est causée par des mutations dans le pigment rhodopsine qui sont essentiellement transmises de façon autosomique dominante. (Chapple *et al.*, 2001) Il a été montré que la protéine mutante s'accumule au niveau du RE et du Golgi, donc n'est pas transportée à la membrane plasmique de façon efficace. (Kaushal and Khorana, 1994) Par contre, une étude plus récente suggère que les mutants s'accumulent plutôt de façon juxtanucléaire dans des structures répondant aux caractéristiques des agrosomes. (Saliba *et al.*, 2002) Il semble que le mauvais repliement de la rhodopsine mutante mène à un gain de fonction toxique plutôt qu'une perte de fonction, puisque des souris knock-out hétérozygotes présentent peu de mort des photorécepteurs. (Humphries *et al.*, 1997)

Accord des coauteurs de l'article

Jadwiga Gasiorek

M.Sc. en sciences biomédicales (2-484-1-0) Option générale

L'article a été soumis à un comité de révision de la revue *Kidney International*.

Titre : « Uromodulin mutations in FJHN induce ER stress but are not rescued by chemical chaperones or colchicine »

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Jadwiga Gasiorek** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « **Étude moléculaire et cellulaire des mutants de la protéine de Tamm-Horsfall (THP) dans la néphropathie hyperuricémique familiale juvénile (NHFJ)** ».

Johanne Liberge (MD)

Yves Paquette (PhD)

Euridice Carmona (PhD)

Vincent Pichette (MD-PhD)

Alain Bonnardeaux (MD-PhD)

Apport des différents auteurs de l'article

Article intitulé :

« Uromodulin mutations in FJHN induce ER stress but are not rescued by chemical chaperones or colchicine »

Jadwiga Gasiorek: Réalisation de la majorité des expériences présentées dans l'article. Rédaction d'une partie de l'article.

Yves Paquette (PhD) : Expérience de RPA et de marquage métabolique.

Johanne Liberge (MD) : Dosage par ELISA de la THP urinaire chez les patients atteints. Rédaction d'une partie de l'article.

Euridice Carmona (PhD) : Personne-ressource – échange d'idées.

Vincent Pichette (MD-PhD): Référence de familles pour le projet de séquençage.

Alain Bonnardeaux (MD-PhD) : Directeur de laboratoire. Encadrement général. Rédaction de l'article.

Article

Uromodulin mutations in FJHN induce ER stress but are not rescued by chemical chaperones or colchicine

Jadwiga Gasiorek, MSc, Johanne Liberge, MD, Yves Paquette, PhD, Euridice Carmona, PhD, Vincent Pichette, MD-PhD, Alain Bonnardeaux, MD-PhD

Key Words: Uromodulin
Tamm-Horsfall protein
Familial juvenile hyperuricemic nephropathy
Medullary cystic kidney disease
Glomerulocystic kidney disease
Thick ascending limb of Henle
Unfolded protein stress response
Genetics
Renal failure
Urate
Gout

Corresponding author: Alain Bonnardeaux, M.D., Ph.D.,
Centre de Recherche Guy Bernier,
Hôpital Maisonneuve-Rosemont,
5415 boul l'Assomption,
Montréal, Québec,
CANADA, H1T 2M4
fax: (514) 252 3430
Tel: (514) 252 3400
e-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Familial juvenile hyperuricemic nephropathy (FJHN) is an autosomal dominant disease that can be caused by mutations in the uromodulin gene, encoding the Tamm-Horsfall protein (THP), and leads to progressive renal failure and hyperuricemia. The mechanisms responsible for the renal disease and hyperuricemia are not well understood. We studied 3 families in a French-Canadian population and performed a genotype-phenotype study on clinical and *in vitro* mutant phenotypes. We identified 3 mutations including a novel one (D196A). Clinical phenotypes included reduced excretion of THP with modest polyuria and decreased fractional excretion of calcium and urate. *In vitro*, mutants showed retention in the endoplasmic reticulum, intracellular accumulation of immature THP, resulting in the induction of an unfolded protein response (UPR) as measured by Bip expression. Variable decreases in THP cell surface expression and formation of intracellular aggregates were also demonstrated. Colchicine and chemical chaperones were not able to increase the maturation of mutant THP *in vitro*. THP mutants in FJHN show variable degrees of misfolding, with activated unfolded protein stress response and intracellular aggregate formation. Sustained activation of the UPR is probably responsible for progressive renal failure from tubular apoptosis.

INTRODUCTION

Familial juvenile hyperuricemic nephropathy (FJHN), medullary cystic kidney disease (MCKD) and glomerulocystic kidney disease (GCKD) form a group of autosomal dominant disorders characterized by progressive chronic renal failure (CRF) and hyperuricemia of the hyposecretory type frequently accompanied by gout. (reviewed in [1]). Additional findings include renal cortico-medullary cysts. Urinalysis is usually unremarkable and kidney biopsy characterized by severe interstitial nephropathy. End-stage renal disease occurs between the second and fifth decades of life. In 2002, Hart et al identified mutations in the gene encoding uromodulin (also known as the Tamm-Horsfall protein or THP) in families with MCKD and FJHN [2]. To date more than 30 mutations have been described in different domains of the protein, with more than 60% affecting a cysteine residue [1]. The mechanisms by which uromodulin mutations lead to microcyst formation, CRF and hyperuricemia are thought to result from misfolding and retention in the endoplasmic reticulum (ER) of immature mutant THP in the thick ascending limb of Henle's loop [3]. Colchicine and 4-phenylbutyrate have been suggested to increase membrane surface expression of mature mutant uromodulin *in vitro* [4], offering hope for future treatment.

In the present study, we identified 3 French Canadian families with uromodulin mutations and determined *in vitro* mechanisms responsible for the disease. Our results show that mutants have significant but variable defects in protein maturation

and induce an unfolded protein stress response. However, chemical chaperones and colchicine are largely ineffective in favouring maturation of mutant THP.

METHODS

Family screening

This study was approved by an institutional review board. Three families with a clinical history compatible with FJHN or MCKD were identified. All showed a history of autosomal dominant CRF with unremarkable urinary findings and hyperuricemia (with or without gout). One family was of Italian descent and the other 2 were French Canadian. Clinical records were reviewed for each member when available. Blood samples and 24-hour urine collections were obtained for most living affected subjects.

Uromodulin gene sequencing

Genomic DNA was extracted from blood samples by standard methods. All 12 exons were sequenced with intronic primers (available upon request). Amplification was performed for 35 cycles using standard polymerase chain reaction (PCR) methods. The PCR products were sequenced using a commercially available kit (BigDye Terminator 3.0 Cycle Sequencing Kit from Applied Biosystems) on an ABI PRISM 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Both DNA strands were sequenced and analyzed using the software provided by Applied Biosystems. Sequence alignments were performed with `bl2seq` (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and `CLUSTALW` (<http://bioweb.pasteur.fr>) online software. We used either a SNaPshot strategy for pedigree 1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) or restriction enzyme digestion of amplified DNA for

pedigrees 2 and 3 (Msp1 and Btg1, respectively) (Invitrogen, Burlington, ON) to confirm the presence of the mutations.

ELISA assay

An ELISA assay was used to quantify the urinary excretion of THP, with purified human uromodulin as standard. Diluted urine samples were dissolved in 20 mM sodium carbonate at pH 9.6, incubated overnight at 4 °C in polystyrene plates and blocked with BSA 1% in PBS. The plates were then incubated for 1 hour at room temperature with a sheep polyclonal antibody against THP (uromucoid) diluted in TBS (1:4000, Abcam, Cambridge, MA). The plates were washed with TBS containing 0.05% Tween 20, and incubated for 30 min at room temperature with a horseradish peroxidase-labelled rabbit polyclonal antibody against sheep IgGs diluted in TBS (1:5000, Abcam, Cambridge, MA), and washed again with TBS-Tween. Finally, a substrate solution (σ -phenylenediamine 200 μ mol in 10 ml of 0.1 M citric acid, pH 5.3) was added to the plates and the color reaction was stopped by adding 30% sulfuric acid. Absorbance readings were performed at 492 nm.

Uromodulin mutant constructs

Four different mutant cDNA molecules were constructed, including those identified in our pedigrees as well as mutant N128S previously found in a family with FJHN [5]. Mutant cDNA molecules were cloned from 129/SvJ mouse kidney cDNA as template for PCR. Primers for PCR (Table I) were designed to introduce a ClaI site

upstream of the start codon, a NotI site downstream of the stop codon. A FLAG or MYC tag and a NheI site downstream of the signal sequence were also added. The constructs were cloned in the ClaI and NotI sites of the pIRES/puro2 vector between the CMV promoter and a bovine growth hormone polyadenylation signal. Point mutations were generated with the QuikChange Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) using the forward primers described in table I and the complementary reverse primers (the mutated nucleotide is underlined). Sequences from all constructs were confirmed on both DNA strands.

Cell culture and transfection

Epithelial cells from the proximal tubule of Opossum Kidney (OK) (ATCC, CRL-1840) which do not express THP were grown in MEM (Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Burlington, ON) and 100 I.U./mL penicillin plus 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Burlington, ON) in a humidified 5% CO₂ air atmosphere at 37°C. Cells were seeded in 60 mm petri dishes or 6-well plates, and transfected when subconfluent with 2 µg of each construct and 5 µL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON) in Opti-MEM medium (Invitrogen, Burlington, ON). Four hours after transfection, the medium was replaced with complete culture medium. Cells were harvested at the indicated times. Where appropriate, cells were incubated with 5 µM of the proteasome inhibitor MG-132 for 16 hours (Calbiochem, Mississauga, ON) 24 hours post transfection to inhibit protein degradation. Where indicated, cells were treated with 1 µg/mL of tunicamycin (Sigma, Oakville, ON) for 16 hours to induce ER stress.

Western blotting analysis

Cells were collected by scraping in cold PBS at indicated times post transfection and were lysed by sonication. Total protein concentration was determined by Bradford assay using bovine serum albumin as a standard. Twenty μg of total proteins from each sample were precipitated by $\frac{1}{2}$ volume of TCA 50% and denatured for 5 min at 95°C in Sample Buffer containing β -mercaptoethanol. Samples were run on 7.5% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Pall, Mississauga, ON). Following blocking with 5% nonfat dry milk for 30 minutes at room temperature, membranes were probed with the primary antibodies diluted in 0.5% nonfat dry milk overnight at 4°C . Primary antibodies were mouse anti-FLAG (1:3000, Sigma, Oakville, ON), mouse anti-actin (1:1000, Lab Vision, Montreal, QC), mouse anti-Bip (1:5000, BD Biosciences, Mississauga, ON). Membranes were then washed with PBS 0.1% Tween-20 and probed with the secondary anti-mouse IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:1000, Sigma, Oakville, ON) for 1h at room temperature, then washed again with PBS 0.1% Tween-20. Bands were visualized with Lumi-Light Substrate (Roche, Laval, QC).

Pulse-chase

Cell labeling and harvesting

Transfected cells were washed twice with PBS 16h post-transfection and the medium was replaced with 1 mL of methionine and cysteine-free MEM culture medium (Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with 10% dialyzed FBS. After 1h at 37°C , the medium was removed and replaced with 0.5 mL of the same medium,

containing 50 μ ci of ^{35}S -Express Protein labeling mix (PerkinElmer, Montreal, QC). After 1h at 37°C, the labeling mixture was removed and replaced by 2 mL of unlabeled MEM + 10%FBS. After the appropriate incubation period, the medium was removed, the cells washed once with 1 mL of cold PBS and harvested by scraping in 0.5 mL cold PBS. Cells were collected by centrifugation at 3000g for 5 minutes and the pellets were dissolved in 100 μ L cold lysis buffer (20mM Tris•HCl pH 7.4, 1M NaCl, 1mM DTT, 1% Triton X-100) and 0.1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, Oakville, ON). Cell lysates were kept at -20°C until analysis. Where appropriate, 1mM N-acetylcysteine (NAC), 5mM taurine and 0.5 mM colchicine (Sigma, Oakville, ON) were added to the media 4 hours post transfection until harvesting (except for NAC which was removed during the incubation with methionine and cysteine-free medium).

Immunoprecipitation

The immunoprecipitation was performed using a FLAG-96 well immunoprecipitation plate (Sigma, Oakville, ON) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cell lysates were centrifuged at 10 000 g for 10 minutes to remove debris and supernatants transferred to the anti-Flag M2 coated plate. The plate was put on a rocking platform for 1h at 4°C. The wells were washed 4 times with 200 μ L of Wash Buffer (50mM Tris•HCl pH 7.4, 150mM NaCl).

Western blotting

60 μ L of 1x sample buffer was added to each well. The plate was sealed and vortexed gently for 30 minutes. The content of each well was transferred to a microcentrifuge tube and heated at 95°C for 5 minutes. The samples were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel and transferred on a nitrocellulose membrane (Pall, Mississauga, ON). The membrane was dried and the labeled proteins were detected by autoradiography for 24 hours using a Storm 840 Phosphorimager (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé) and the bands were quantified with the ImageQuant 5.2 software.

RNase protection assay

RPA was performed using the RPAII kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 32 P-labelled antisense probe ($\sim 4-8 \times 10^4$ cpm) was mixed with 10 μ g of total RNA and precipitated with 0.5 M NH_4OAc in 2.5 volumes of ethanol. The pellets were resuspended in 10 μ L of HybridizationIII buffer, heated at 95°C for 3 minutes and incubated overnight at 42°C. The reaction mix was digested with RNase A/T₁ for 30 minutes at 37°C in 150 μ L RNase digestionIII buffer. After addition of RNase InactivationIII solution, the samples were incubated for 30 minutes at -20°C and centrifuged at 16 500 g for 15 minutes at 4°C. The pellets were resuspended in 1x loading buffer, denatured for 3 minutes at 95°C onto a sequencing gel (6% polyacrylamide/8M urea) that had been pre-run for 20 minutes. Samples were subjected to electrophoresis for 1.5 h at 50 W and the gel was dried and exposed to film overnight at -80°C. The results were revealed using Storm 840 Phosphorimager (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

Immunofluorescence and Confocal Imaging

Transfected cells grown on coverslips in 6 well-plates were fixed with 3.7% formaldehyde for 30 minutes or with methanol at -20°C for 20 minutes (when anti-giantin antibody was used). After washing with PBS, cells were permeabilized when appropriate using 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 minutes. Cells were blocked for 1h with 10% FBS in PBS and exposed to the primary antibodies for 1h. Primary antibodies were mouse anti-Flag (1:500, Sigma, Oakville, ON), rabbit anti-flag (1:500, ABR, Hornby, ON), mouse anti-Bip (1:1000, BD Biosciences, Mississauga, ON), rabbit anti-giantin (1:250, Covance, Hornby, ON), rabbit anti-proteasome 20S subunit alpha 5 (1:250, ABR, Hornby, ON). Cells were then washed 3 times with PBS for 5 minutes with shaking before being incubated with the secondary antibody for 1h in the dark. Secondary antibodies were Texas Red conjugated goat anti-mouse (1:500, Molecular Probes, Burlington, ON), Texas Red conjugated anti-rabbit (1:500, Molecular Probes, Burlington, ON), FITC conjugated goat anti-rabbit (1:500, Antibodies Inc., Hornby, ON) and AlexaFluor488 conjugated anti-mouse (1:500, Molecular Probes, Burlington, ON). After 5 washes of 5 minutes with PBS, coverslips were mounted on slides using antifade Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlington, ON). Cells were visualized using either an Olympus IX71-FV300 confocal microscope (for colocalisation) or a Leica DMRE microscope.

RESULTS

Clinical data

Pedigree 1 included 43 individuals, 13 of which were found to have characteristics compatible with FJHN (Table 2 and Figure 1). At ascertainment, 4 relatives were either on dialysis or had received a kidney transplant (II-1, II-4, II-5 and III-28). Mean age to end-stage renal disease (ESRD) was 47.5 years. Five other relatives (III-2, III-3, III-34, III-36, III-38) presented variable degrees of chronic renal failure (CRF) and hyperuricemia. Ultrasound evaluations in 3 subjects demonstrated bilateral small cortical or corticomedullary cysts with variable renal sizes (2 with normal and 1 with small kidneys). Subject I-901 died at age 54 from myocardial infarction and had a history of CRF with gout, as did II-903, II-904, II-905 for whom causes of death were not specified.

In pedigree 2, 3 subjects had CRF (II-1, II-3 and III-6). II-1 and II-3 also presented gout, while III-6 was treated with allopurinol for hyperuricemia. Individual I-901 died at 36 years from cardiac failure. He had a strong history of gouty arthritis and renal failure.

In pedigree 3, individuals II-2, II-5 and III-3 had CRF. II-2 and II-5 had a history of gout and III-3 was treated with allopurinol because of severe hyperuricemia. Patient I-908 was diagnosed with renal insufficiency and gout in the fourth decade and died at 64 years from an unknown cause. Patient II-6 had 3 episodes of gout but her renal function was normal at ascertainment.

Sequencing Analysis

Sequence analysis of the 12 exons of the uromodulin gene from affected subjects in pedigree 1 revealed the existence of a mutation in codon 236 (exon 4), previously described in a Japanese kindred [6], that results from a C to T transition (812C > T), and substitutes a leucine for a proline. In pedigree 2, we found a mutation (754T > G) in codon 217 (exon 4) substituting a glycine for a cysteine. This mutation has been described in a Belgian family [7]. The third pedigree revealed a previously undescribed mutation in exon 4 (692A > C) substituting an alanine for an aspartic acid in codon 196. All mutations were absent in all unaffected members of the kindreds.

In vivo urinary THP secretion

Figure 2 shows the 24 hour excretion of Tamm-Horsfall protein plotted against the creatinine clearance in affected, affected transplanted and unaffected members of the families. As can be seen, affected subjects have uniformly low urinary THP excretion but there is occasional overlap with unaffected relatives.

In vitro THP expression

Expression of recombinant wild type and mutant THP was analyzed from total cellular extracts of transiently transfected OK cells (Figure 3A). The typical pattern was a double band, corresponding to the partially glycosylated precursor (~90kDa) and the fully glycosylated mature protein (~105kDa). The precursor is partially

glycosylated, since treatment with tunicamycin, which inhibits N-linked glycosylation in the endoplasmic reticulum (ER), yields a molecular weight of 72 kDa, as predicted by the sequence of amino acids (data not shown). The pattern of expression for the mutants was clearly different from that of the wild-type (wt), which consisted in a single band corresponding to the fully glycosylated form. The mutants displayed lower levels of the mature 105 kDa band and the presence of an immature form (90 kDa). The profiles differed between mutants, P236L displaying the largest defect in glycosylation. These results show that the maturation of THP is variably affected in FJHN mutants. Differences in protein expression were not caused by translation efficiency since all constructs generated similar amounts of mRNA by RNase protection assay (Figure 3B).

Maturation kinetics of mutant and wild-type THP

The maturation kinetics for mutant and wt THP were evaluated by metabolic labelling (Figure 4). Results show that for all mutants, maturation was variably impaired, particularly for P236L for which the fraction of mature THP represented approximately 30% of the initially labelled THP after 24 hours (compared with 75% for the wt). The total amount of radioactivity associated with cells was approximately equal at all time points for all constructs (corresponding to approximately 30%).

Effect of proteasome inhibition on THP expression

To assess whether the mutant misfolded proteins are degraded by the proteolytic machinery of the 26S proteasome we treated transfected cells with MG-132, an inhibitor of the proteasome (Figure 5). For all mutants, the lower band (corresponding to the immature precursor) was increased following MG-132 treatment compared to untreated transfected cells, confirming that mutant proteins are degraded by the proteasome. Inhibition of proteasomal degradation had more impact on mutants N128S and D196A, which displayed lower baseline levels of the immature band. For the Wt, the same 90kDa band also appeared upon treatment with MG-132, suggesting that a fraction of wt THP can be misfolded and degraded. However, wt immature THP expression levels were significantly lower at baseline and following proteasome inhibition.

Endoplasmic reticulum stress and expression of the Bip chaperone

To test the hypothesis that mutant THP causes ER stress, we examined the expression of Bip (Figure 6) which is upregulated in the presence of misfolded proteins (reviewed in [8]). Bip is a molecular chaperone located in the ER that binds to exposed hydrophobic patches and helps in folding [9]. Bip expression was assessed by western blot 40h post transfection since ER stress occurs progressively as misfolded proteins accumulate. Tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation of newly synthesized proteins, served as a positive control for ER stress. While the expression of Bip in cells transfected with Wt THP was almost identical to mock

transfection, the mutants displayed increased expression of Bip, which was statistically significant for C217G, N128S and P236L (P-value < 0.05).

Membrane expression of THP by immunofluorescence microscopy

Early after transfection, THP has been reported to display a clear membrane labelling with the presence of several projections [3]. We also noticed a well defined membrane labelling with some punctuate aggregates (Figure 7), 40 hrs after transfection, which might represent enrichment of the GPI-anchored THP in particular regions such as lipid rafts [10]. Membrane expression of THP mutants did not differ significantly from the Wt, except for P236L, which displayed a clearly less intense labelling and fewer positive cells (Figure 7). These results show that in transient transfection experiments, a significant fraction of mutant THP was targeted to the membrane.

Intracellular expression of THP

Intracellular fate of mutant THP was analyzed after cell permeabilization. Mutants tended to form intracellular aggregates particularly for P236L and C217G, demonstrating large juxtannuclear inclusions (Figures 8, 9 and 10, first column). Imaging by confocal microscopy showed some colocalization of THP mutants D196A, C217G and P236L with the ER (Figure 8). However, there was no colocalization of the wt or mutant THP with the Golgi 40h post-transfection (Figure 9).

This suggests that wt and mutant THP that exit the ER are rapidly targeted to the membrane and not retained in the Golgi. Conversely, intracellular aggregates observed for C217G, P236L and D196A showed partial colocalization with the proteasome (Figure 10). The pattern of localisation of the THP aggregates appears to be similar to that observed for structures termed aggresomes. These are single aggregates that localise close to the nucleus, at the microtubule-organization center (MTOC), and contain mutated proteins, proteasomes and chaperones [11].

Chemical chaperones

Having established that mutants display a defect in maturation and an accumulation of the immature form, we investigated whether chaperones could help in the folding process of mutants C217G and P236L, those displaying the worst intracellular phenotypes. The osmolyte taurine has been shown to promote secretion of EC-SOD in the presence of ER stress [12], while the antioxidant N-acetylcysteine reduces aggregation of mutant ataxin [13]. Recently, in cells stably transfected with mutant THP, colchicine has been suggested to improve secretion of this protein and to decrease apoptosis [4].

Results obtained by pulse chase showed that for cells treated with colchicine, there was a significant increase in the immature form, especially at the beginning of the chase period for mutants C217G and P236L (Figure 11). However, colchicine did not seem to have a positive impact on mature THP forms, even though the concentration used was already optimal [4]. Higher concentrations induced cell death (data not shown). Since colchicine acts on tubulin to disrupt microtubule polymerization, the

initial increase in the immature form might be explained by a decrease in transport to the proteasome. After treatment with taurine and N-acetylcysteine the signal observed by pulse-chase for the immature and mature forms did not differ from the untreated cells (data not shown).

DISCUSSION

This study demonstrates that mutations in the uromodulin gene causing FJHN are characterized by a delay in maturation with subsequent intracellular accumulation of mutant Tamm Horsfall protein. This induces an unfolded protein stress response (UPR), as shown by increased expression of the BiP chaperone. Intracellular accumulation of THP and UPR activation are likely to disrupt the function of the thick ascending limb of Henle's loop, and possibly lead to apoptosis and progressive nephron loss.

We identified 3 mutations in our families including a novel one (D196A). To date, more than 30 mutations have been described (reviewed in [1]) and more than 60% affect cysteine residues clustered in exons 4 and 5. However, mutations causing the disease can occur in any domain. This includes the large zona pellucida domain in the C-terminus [14]. In vitro expression of cysteine mutants has clearly shown delay in maturation and export to the plasma membrane. This study demonstrates that mutations that do not affect cysteine residues also lead to protein maturation defects, with consequent ER retention and stress. Consequently, cell surface expression of mutant THP was significantly reduced for certain mutants (P236L), but not for C217G, D196A and N128S, who showed relatively adequate targeting to the plasma membrane. The maturation kinetics showed a variable delay for all mutants. Proteasome inhibition by MG-132 increased the levels of immature mutant THP, suggesting that misfolded THP is targeted for degradation.

Our findings also demonstrate that misfolded THP accumulates and forms aggregates, at least for the 3 mutants identified in our families. Aggregates were juxtannuclear and showed partial colocalisation with the ER and the proteasome. However, for the N128S mutant, intracellular accumulation did not occur significantly, although protein maturation was slower than the wt. All mutants induced variable degrees of ER stress, proportional to the degree of aggregate formation, particularly for P236L and C217G mutants.

Contrary to a previous study [4], attempts to rescue the mutants were unsuccessful. Colchicine, taurine and N-acetylcysteine showed no effects on mutant THP maturation. This suggests that colchicine, an inhibitor of microtubule transport could be useful for certain but not all mutants. Alternatively, the differences in the results could be due to the methodology as Choi et al have used stable, while we have used transient transfections. Further investigation into the utility of colchicine is warranted before advocating its clinical use. A better clinical option would be pharmacological chaperones or ligands to help properly fold mutants such as with the V2R in nephrogenic diabetes insipidus [15]. Unfortunately, there are no known ligands for THP.

The intracellular accumulation of unfolded Tamm-Horsfall protein is likely to interfere with the function of the thick ascending limb of Henle. Theoretically, this should lead to a phenotype similar to Bartter syndrome, including polyuria, volume depletion, hypokalemia, metabolic alkalosis and hypercalciuria with

nephrocalcinosis. In our families, we found variable degrees of polyuria in affected members of the families but on average, urine volume was 2.2 L/day which is not in the range seen in Bartter patients [16]. It is possible that nephrocalcinosis, which spares subjects with FJHN, explains the differences as urine volume could be maintained by conserved water and electrolyte reabsorption in other tubule segments. In this respect, we found that subjects with FJHN did not present with hypercalciuria and hypermagnesiuria as would be expected from a disease affecting the thick ascending limb. Fractional excretion of calcium was in the low to normal range. This could be explained by increased calcium absorption by the proximal tubule from relative volume depletion and/or secondary hyperparathyroidism with increased calcium reabsorption in the distal tubule and collecting duct. It is also possible that progressive apoptosis in the thick ascending limb does not lead to attenuation of the electrochemical gradient that provides the driving force for passive paracellular calcium and magnesium transport in this nephron segment. This would also help explain why hypokalemia is not a feature of this disease.

Low fractional excretion of urate was noted in all affected subjects although this could be seen in several normal siblings as well. Thus, urate excretion is not a very reliable diagnostic criterion. The mechanism by which urate excretion is reduced is not known but probably results from increased proximal tubule reabsorption caused by volume depletion. Urate is primarily reabsorbed in the proximal tubule and volume contraction leads to enhanced reabsorption with hyperuricemia. The thick ascending limb of Henle is not involved in urate transport [17].

Daily urinary THP excretion was uniformly low in our probands. However, there was occasional overlap with unaffected members suggesting that urinary THP excretion is not very reliable as a diagnostic criterion for the disease. THP has been suggested to protect against kidney stone formation [18] and urinary tract infections [19-21]; and that THP stimulates dendritic cells through Toll-like receptors, thus regulating innate and adaptive immunity [22]. However, self-reported evidence for kidney stones and urinary tract infection was unremarkable in our families. It is possible that the residual urinary THP secretion combined with concentrating defects is sufficient to prevent the occurrence of both events.

In this study of 4 mutations, there was no apparent correlation between in vitro and in vivo phenotypes. For example, the P236L mutant clearly showed the worst maturation and membrane transport kinetics, yet ESRD occurred above 50 years on average, while subjects with the C217G mutation had early onset renal failure (less than 30 years of age). This suggests the presence of environmental or genetic modifiers that affect the course of the disease. Alternatively, cellular toxicity of the mutants could be more complex than ER stress and aggregate formation. Further studies are required to address this point.

In conclusion, we have identified 3 mutations in the uromodulin gene from dialysis populations in Quebec, including a novel mutation. Mutations affect protein folding, lead to ER stress, intracellular protein accumulation, ultimately resulting in cell dysfunction, apoptosis and nephron loss. Diagnosis depends on a thorough family history and can be confirmed by clinical assessment that includes low urinary

excretion of urate and THP and/or gene sequencing. Future treatment options are remote as chemical chaperones do not appear to be effective in rescuing mutants and THP ligands have not yet been identified.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the contribution of Josée Tessier for the sequencing. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research and a Scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec to AB.

Figure 1. Pedigrees and mutation sequence/position in the uromodulin cDNA

Figure 2. Urinary excretion of the Tamm-Horsfall protein in siblings in relation with kidney function as measured by creatinine clearance.

Figure 3. THP expression 24h post-transfection. Panel A) Western blot analysis of total cell extracts probed with anti-flag and anti- β -actin antibodies. Results were reproducible in 3 experiments. Panel B) RNA analysis by RNase Protection Assay. Results were reproducible in 2 experiments.

Figure 4. Maturation kinetics of mutant and wild-type uromodulin. Cells were pulsed 16h after transfection and then chased for the indicated periods. Panel A) Western blot analysis at different time points. Higher band corresponds to the mature THP. Panel B) graphical representation of % of mature THP as a function of time for each construct. Results are representative of 3 experiments.

Figure 5. Effect of proteasome inhibition on THP expression. Western blot analysis of total cell extracts probed with anti-flag and anti- β -actin antibodies. Transfected cells were treated (+) or not (-) with 5 μ M MG-132 for 16h. Results were reproducible in 3 experiments.

Figure 6. Expression of the Bip chaperone. Panel A) Western blot analysis of total cell extracts collected 40h post-transfection probed with anti-Bip and anti- β -actin antibodies. Panel B) Histograms showing mutant/Wt Bip expression ratio corrected for actin. (6 experiments) * $P < 0.05$

Figure 7. Cell surface expression of THP. Unpermeabilized cells were probed with anti-Flag antibodies 40h post-transfection. Results show a representative field and were reproducible in 3 experiments.

Figure 8. Intracellular expression of THP and Bip. Cells were permeabilized and double-stained with antibodies against Flag (red) and Bip (green). Partial colocalisation is shown by yellow staining.

Figure 9. Intracellular expression of THP and giantin. Cells were permeabilized and double-stained with antibodies against Flag (red) and giantin (green). No colocalisation was observed.

Figure 10. Intracellular expression of THP and the proteasome. Cells were permeabilized and double-stained with antibodies against Flag (green) and the proteasome (red). Partial colocalisation is shown by yellow staining.

Figure 11. Maturation kinetics of mutant and wild-type uromodulin in the presence or absence of colchicine. Cells were pulsed 16h after transfection and then chased for the indicated periods of time.

Table I. Primers for cloning and mutagenesis

Primer	orientation	Sequence (5' to 3')
ClaI-5'	sense	CCCC <u>ATCGAT</u> CAGGCATCAGAAACACAAGG
NheI-myc	antisense	CCCCGCTAGCCAAGTCTCTCCGAGATGAGCTTCTGTTCTGTTGA GTTACTGGCTCCAG
NheI-FLAG	antisense	CCCCGCTAGCCTTATCGTCTCATCCTTGTAATCTGTTGAGTTACT GGCTCCAGC
NheI-3'	sense	CCCCGCTAGCGGAGAAGGTGTTCTGAATG
NotI-3'	antisense	CCCCGCGGCCGCTGAAGGAAGAACAGCACTGAAA
Prom-PstI	sense	AAA <u>ACTGCAG</u> CCAAGAGATCCAAGTCTCCTTC
Prom-BamHI	antisense	CTGCAAAGGGAACATTTCTCTAC
C217G	sense	CATGGCTGAGACCGGTGTGCCCGTCC
D196A	sense	GCTACTCCTGTGCGCGGGTCTGCACG
N128S	sense	GCTCAATGGCTCTCATCTCTCGAGTAGTCAAGGC
P236L	sense	GCTCAATGGCTCTCATCTCTCGAGTAGTGAAGGC

Table 2

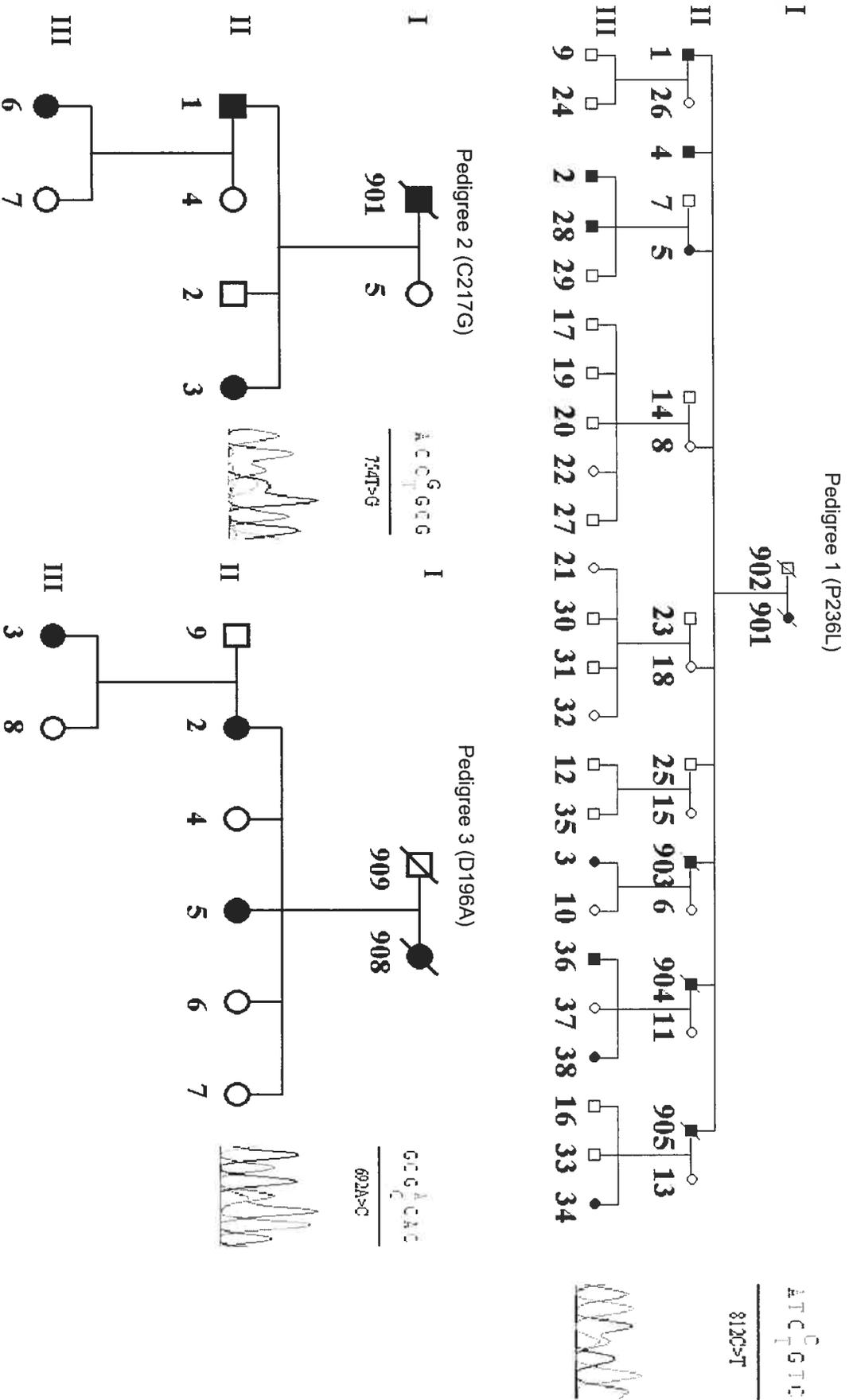
Family	Gender	Renal function	Imaging	Feurate (%)	Gout (onset age-years)	FeCa (%)	FeMg (%)	Lvolume (L/d)	Mutation
Pedigree 1									
I-901	F	ESRD at 54	-	-	-	0.9	-	-	P236L
I-1	M	ESRD at 45	Multiple cysts	-	Yes (-)	-	-	-	P236L
I-4	M	ESRD at 50	Multiple cysts	-	Yes (22)	-	-	-	P236L
I-5	F	ESRD at 55	-	4.8	Yest (43)	-	-	-	P236L
I-903	M	ESRD at 53	-	-	-	-	-	-	P236L
I-904	M	ESRD at 57	-	-	-	-	-	-	P236L
I-905	M	ESRD at 47	Cortical cysts	-	-	-	-	3.80	P236L
III-2	M	58 ml/min	-	3.9	No	1.6	6.6	1.35	P236L
III-28	M	ESRD at 40	-	-	No	-	-	-	P236L
III-3	F	35 ml/min	-	6.2	No	0.5	12.4	2.52	P236L
III-36	M	42 ml/min	-	5.0	Yes (33)	1.6	14.9	2.40	P236L
III-38	F	64 ml/min	-	8.9	No	1.9	9.0	1.82	P236L
III-34	F	45 ml/min	-	7.5	No	2.8	6.7	1.80	P236L
Pedigree 2									
II-1	M	ESRD at 27	-	-	Yes (-)	-	-	-	C217G
II-3	F	ESRD at 20	-	-	Yes (20)	-	-	-	C217G
III-6	F	27 ml/min	-	4.0	No	1.1	9.1	1.14	C217G
Pedigree 3									
II-2	F	16 ml/min	No cysts	6.0	Yes (20)	0.8	18.4	2.40	D196A
II-5	F	78 ml/min	No cysts	6.5	Yes (9)	0.6	-	3.78	D196A
III-3	F	59 ml/min	-	1.3	No	0.2	-	0.78	D196A

- : not available

ESRD : end-stage renal disease

FE : fractional excretion

Figure 1



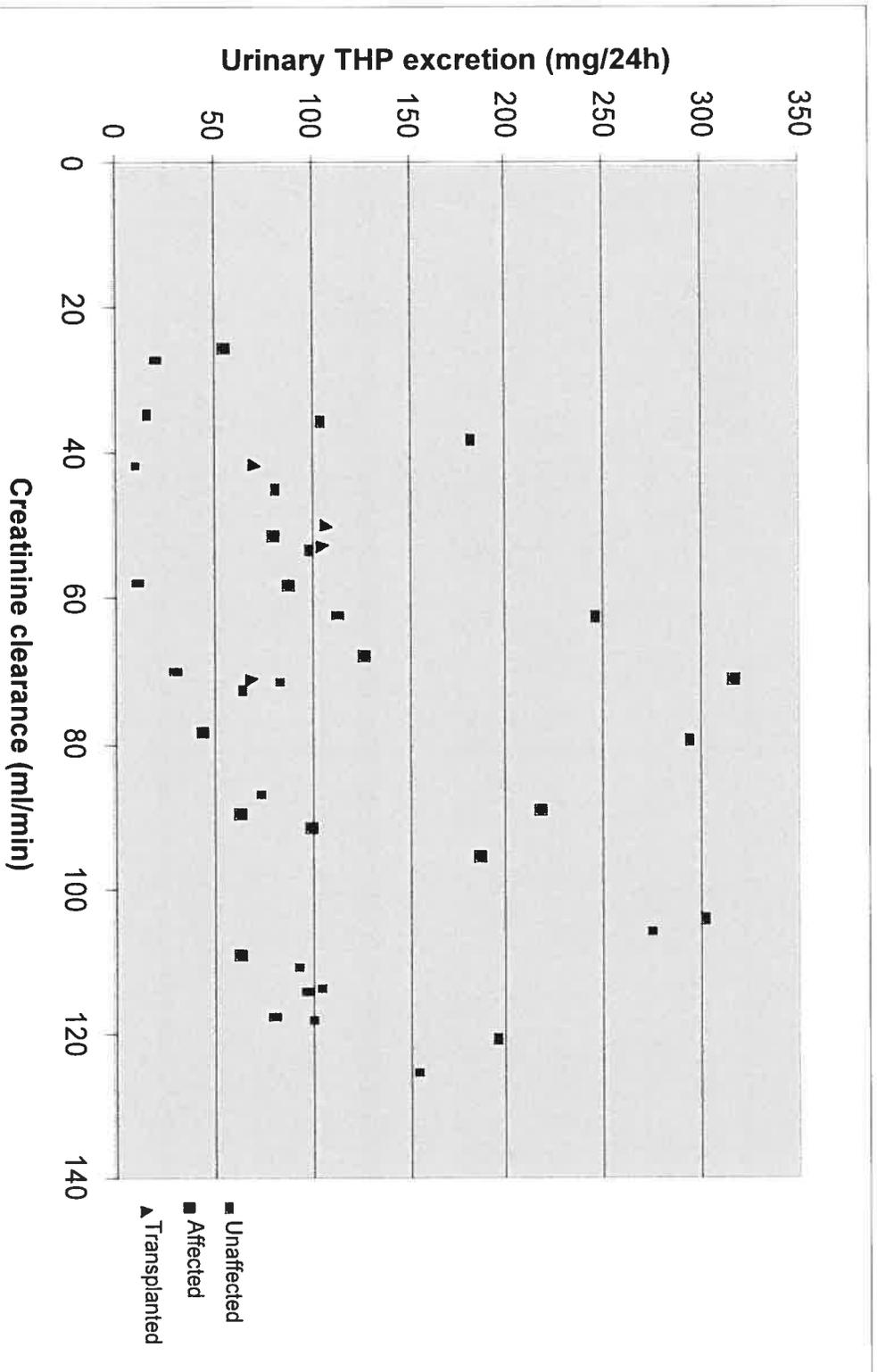


Figure 3

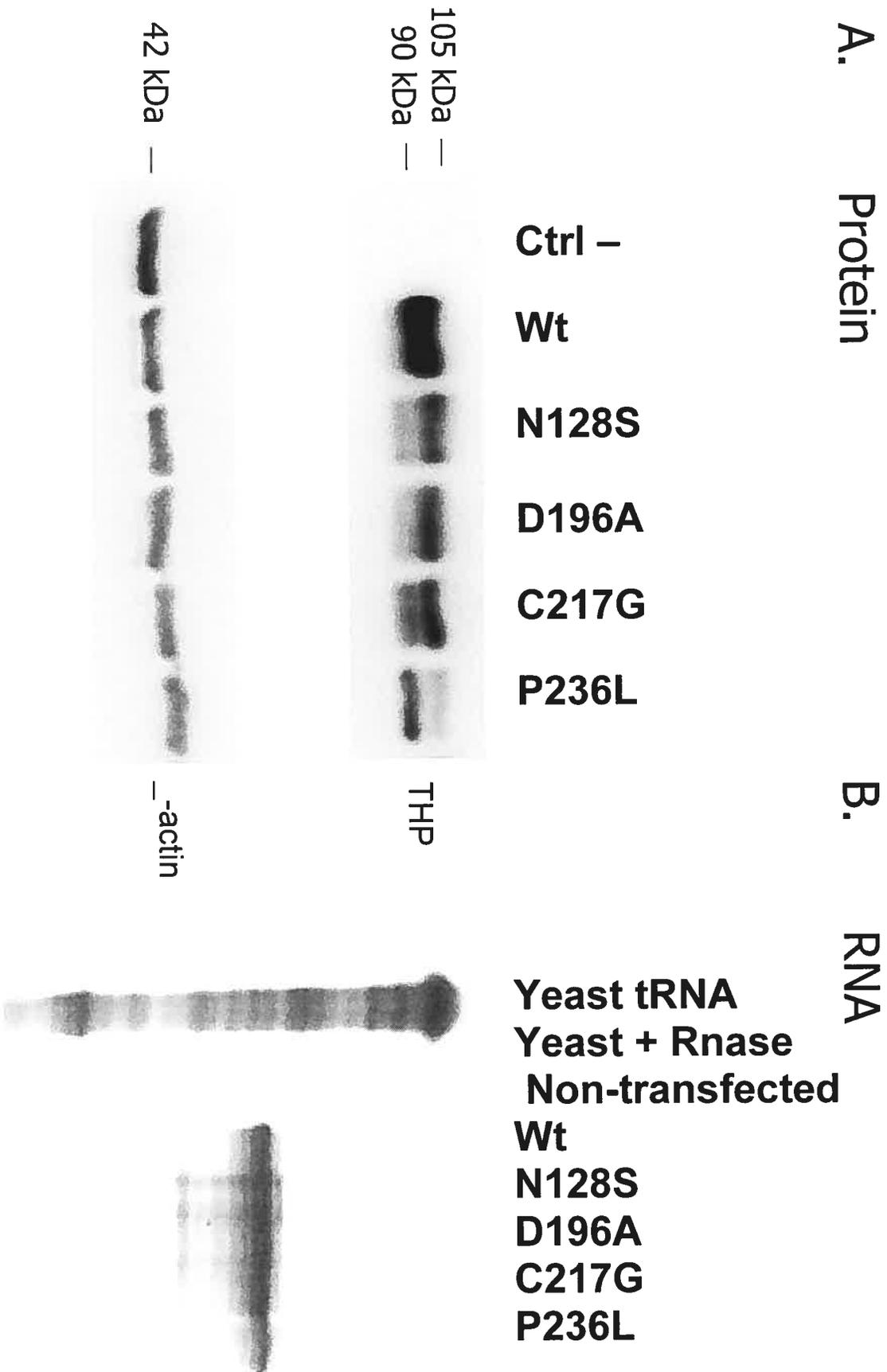


Figure 4

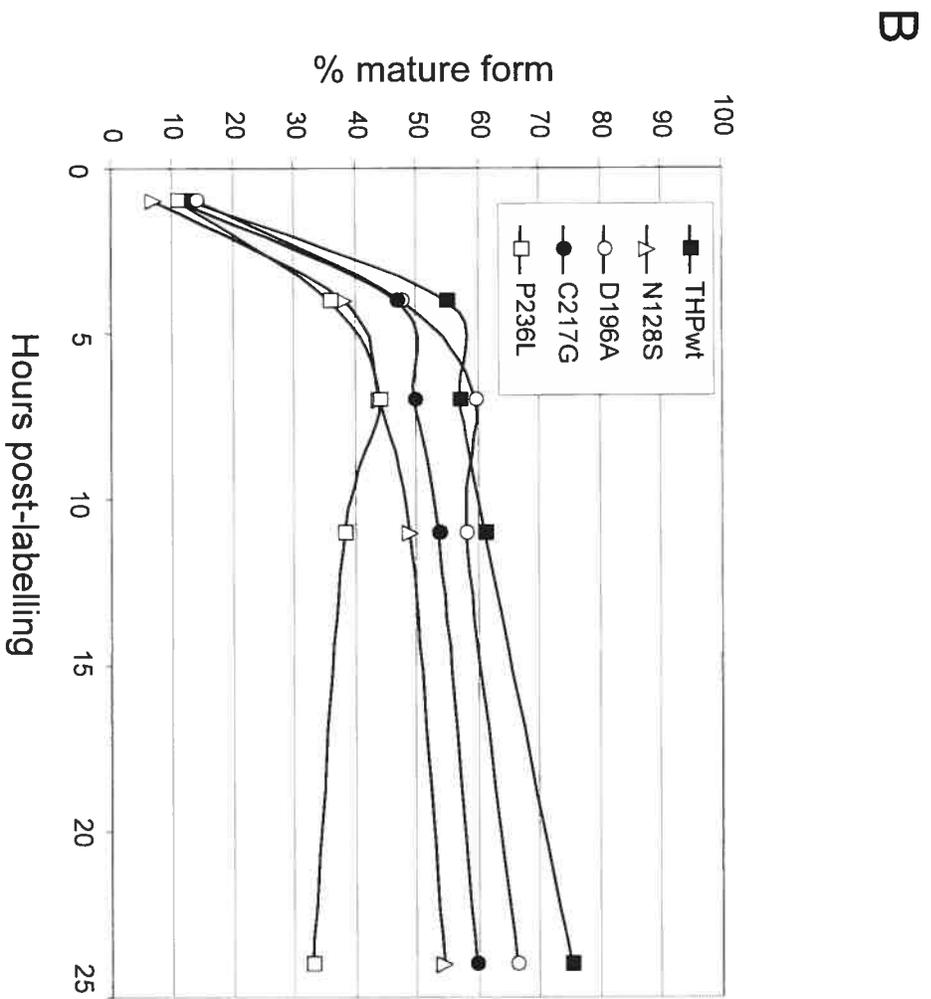
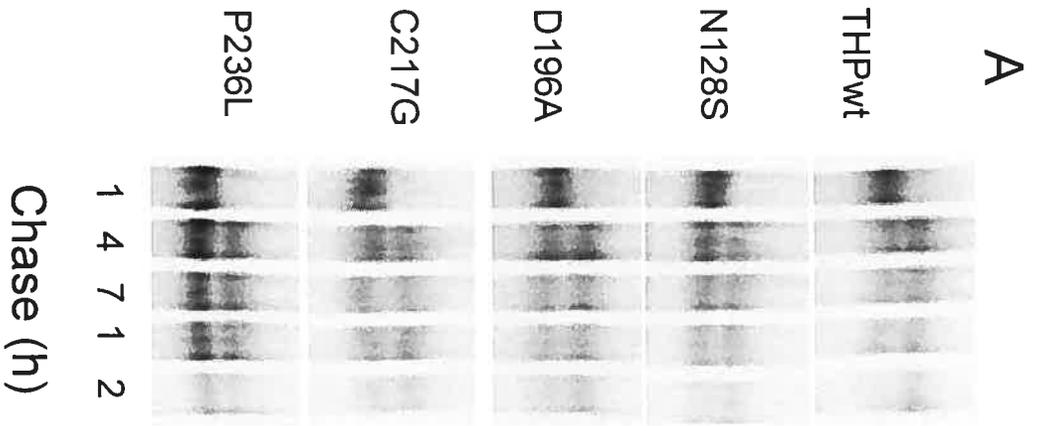


Figure 5

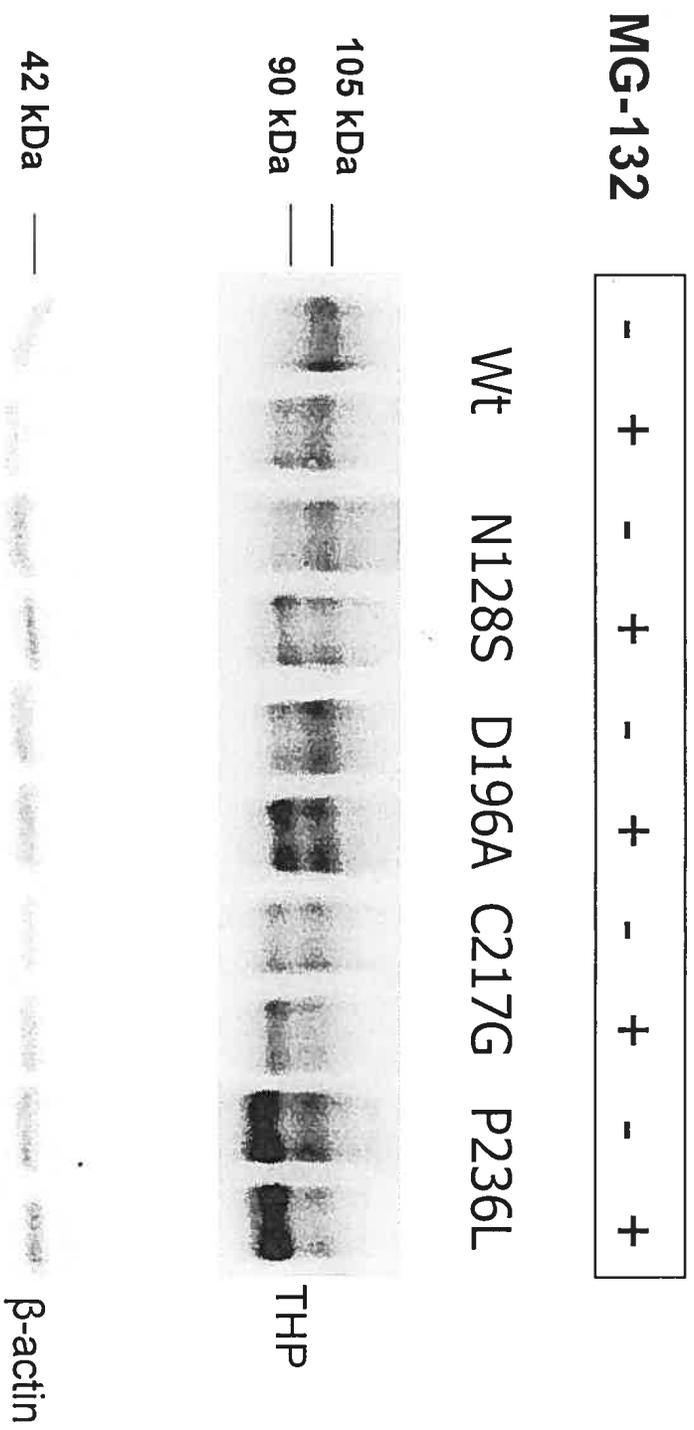
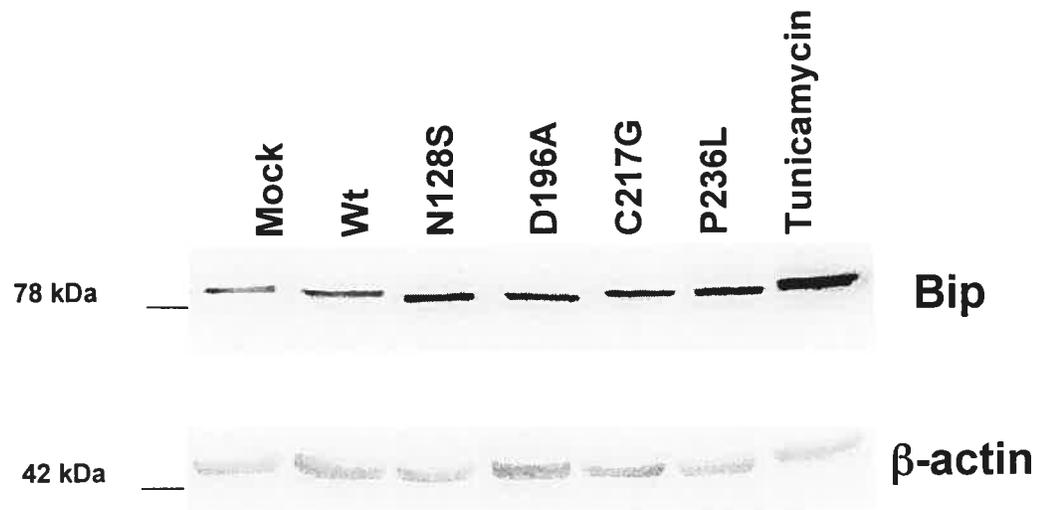


Figure 6



BIP EXPRESSION - Mutant/Wt

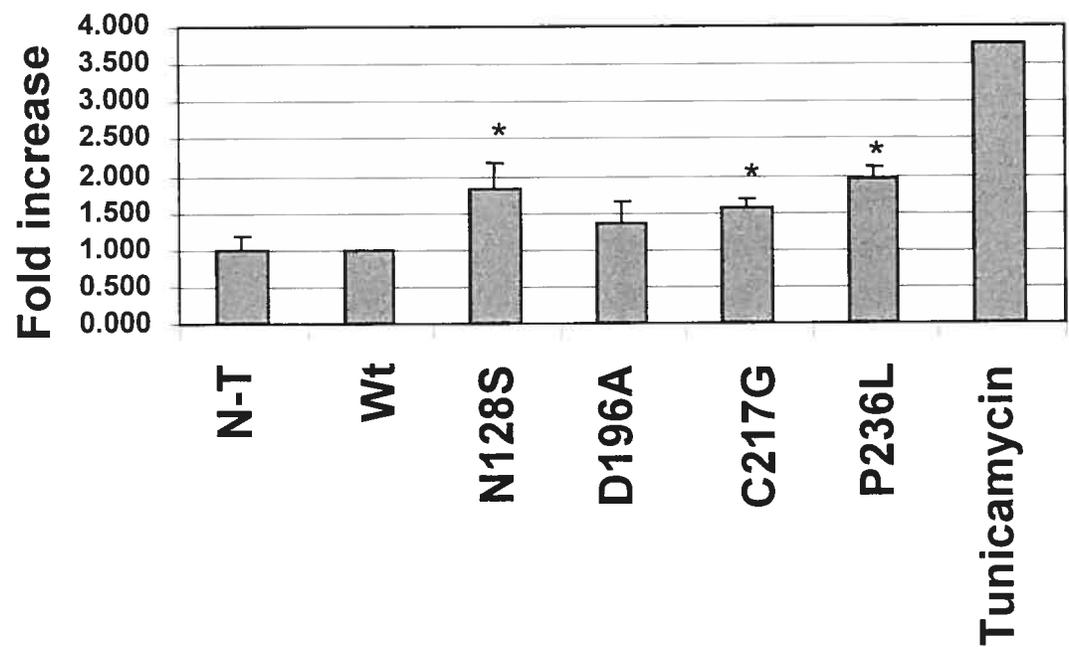
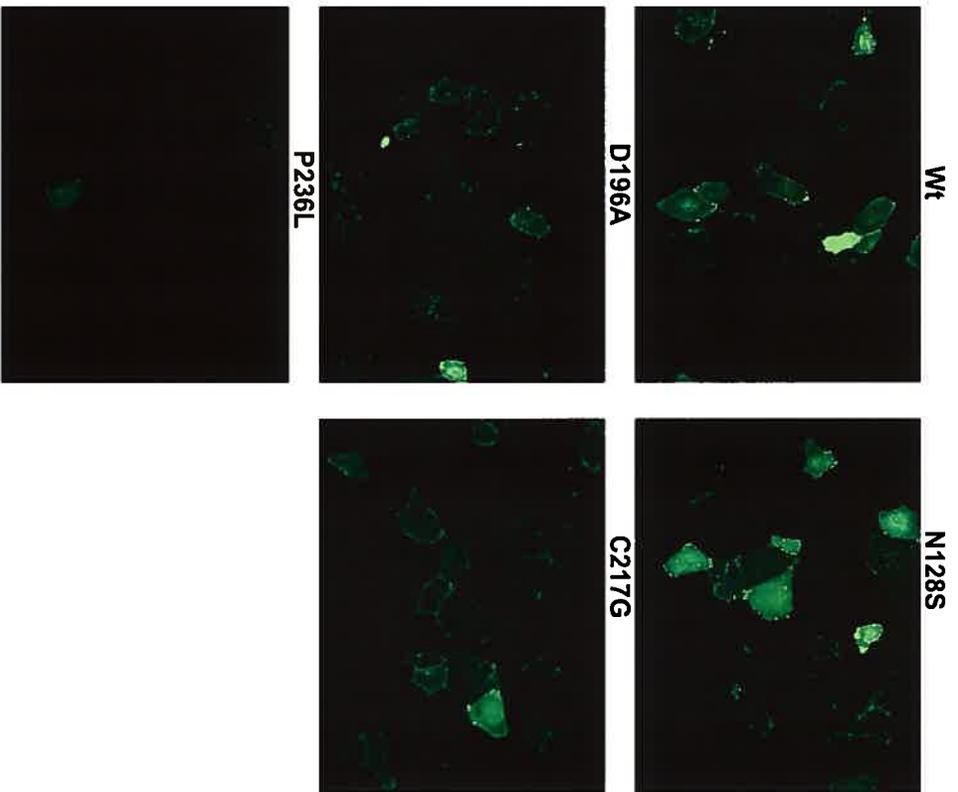
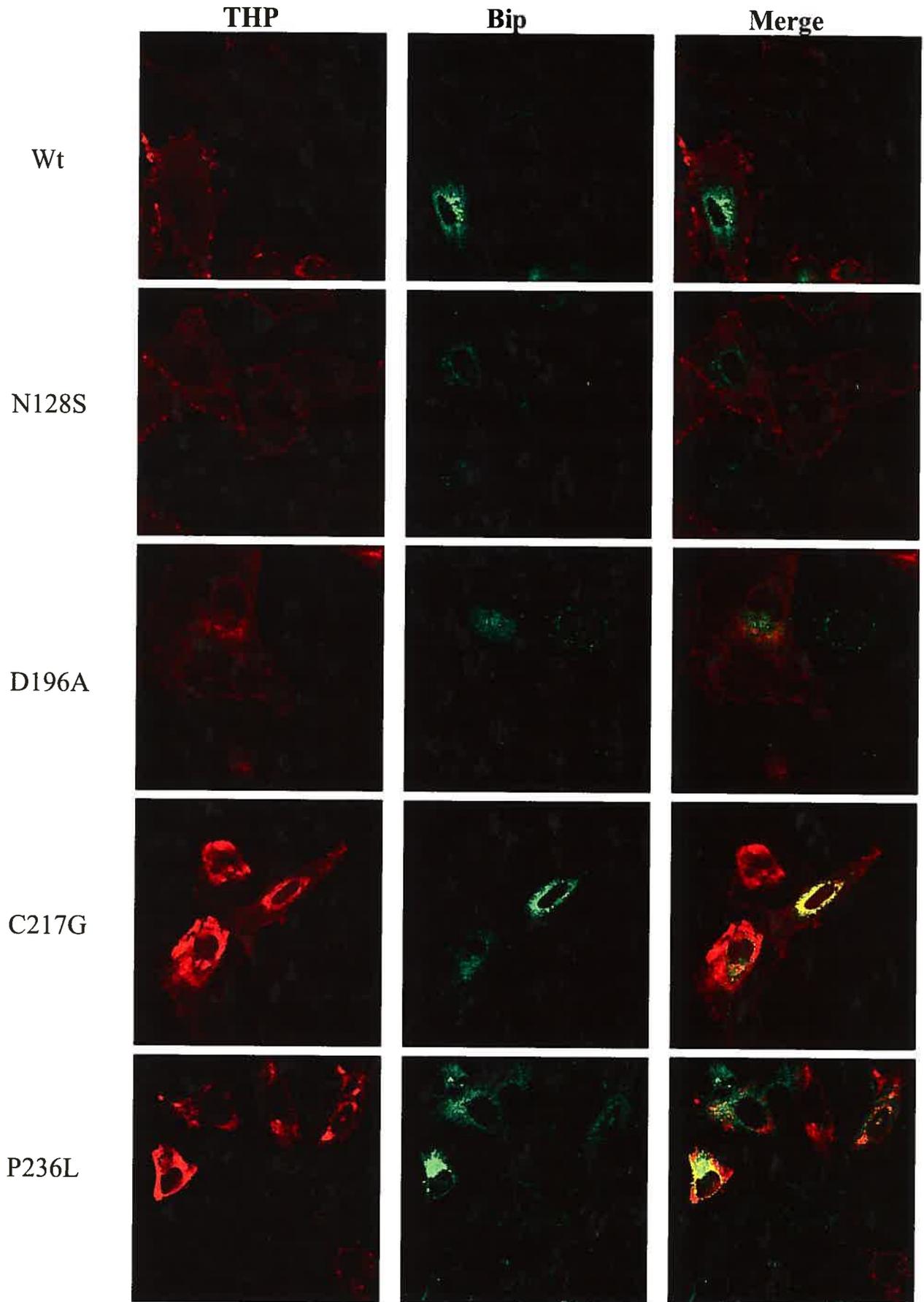
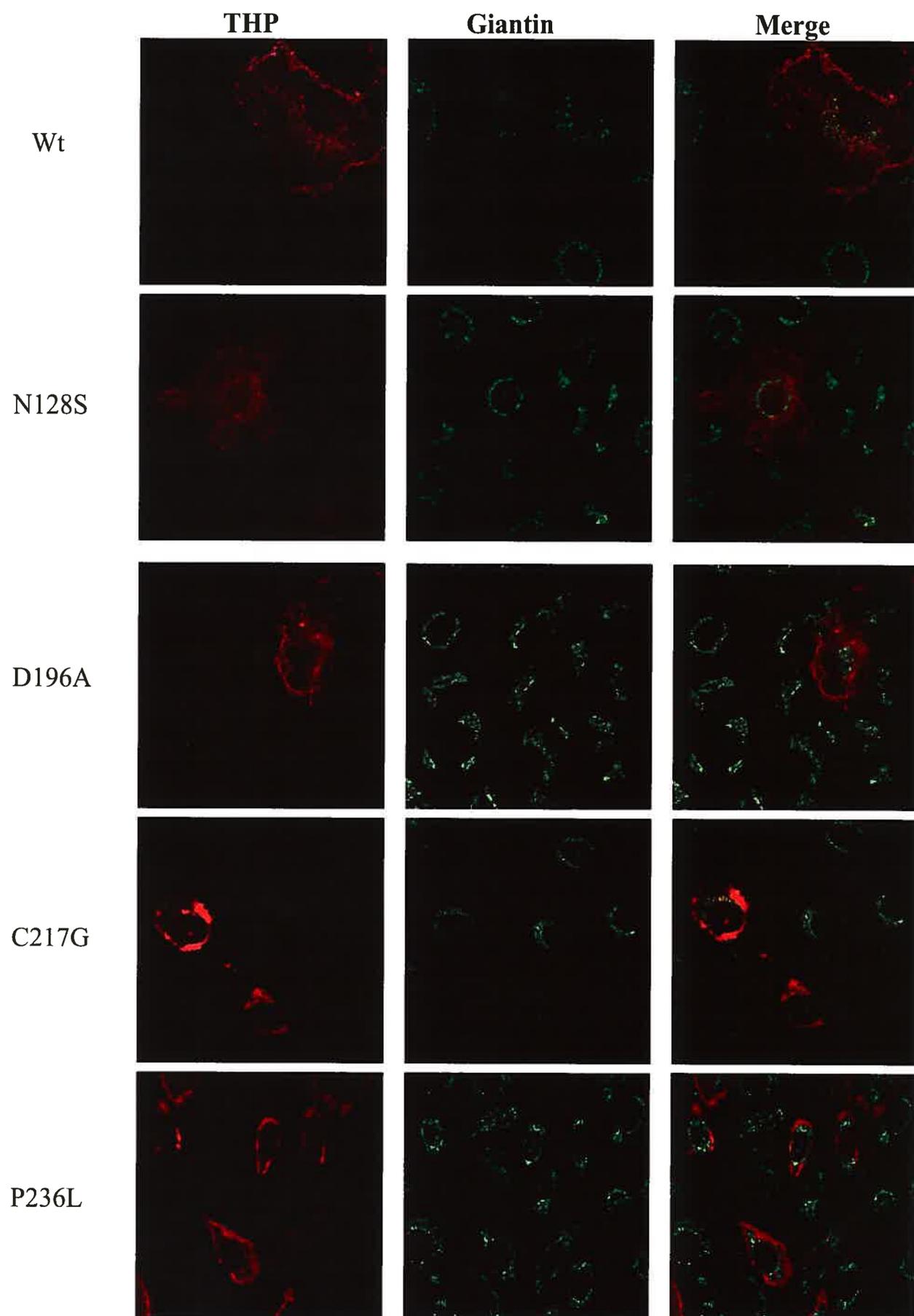
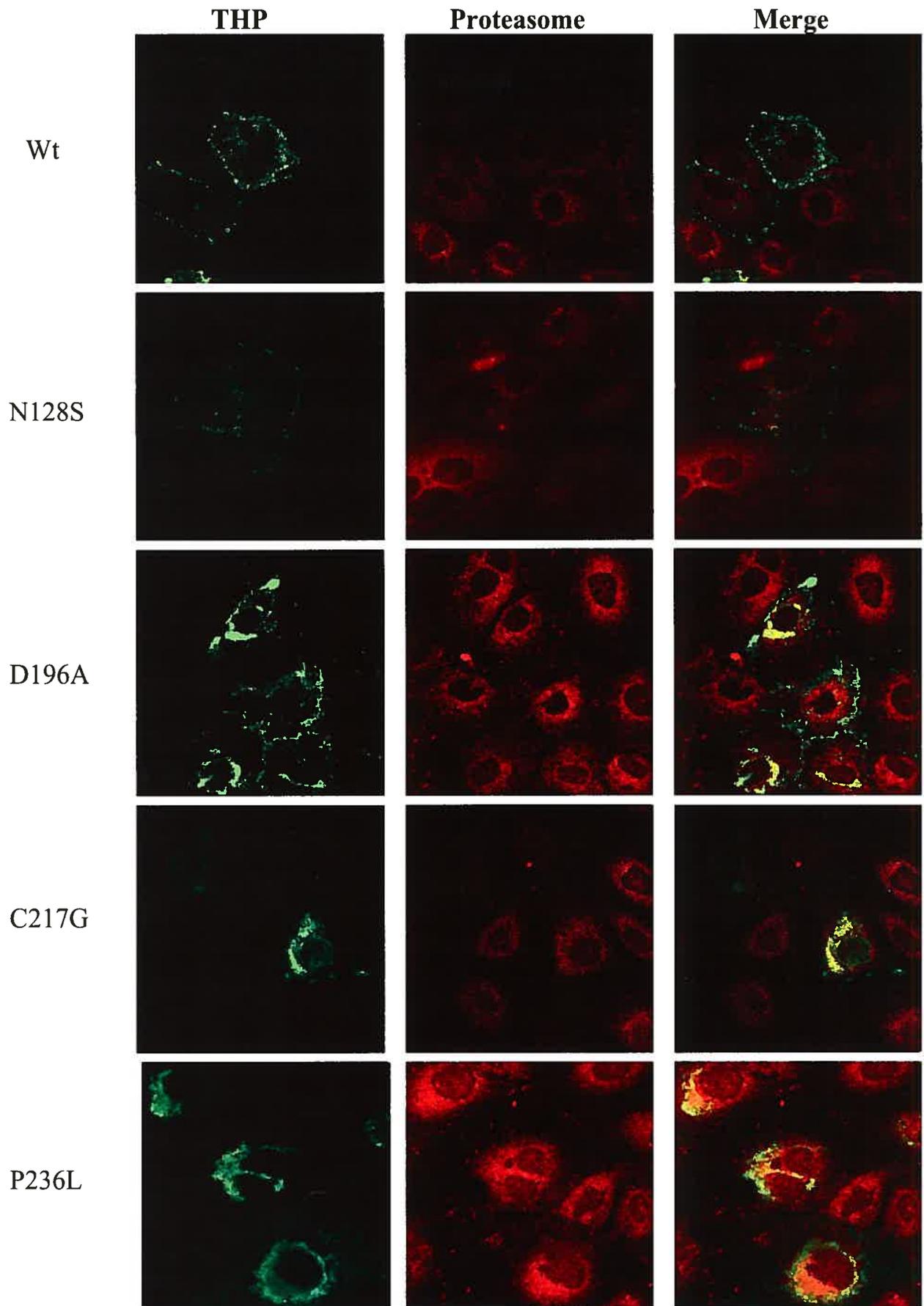


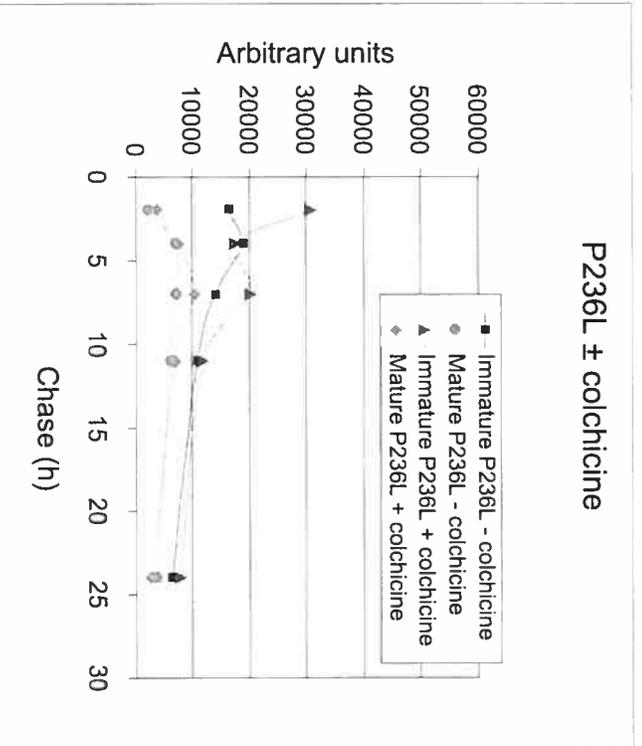
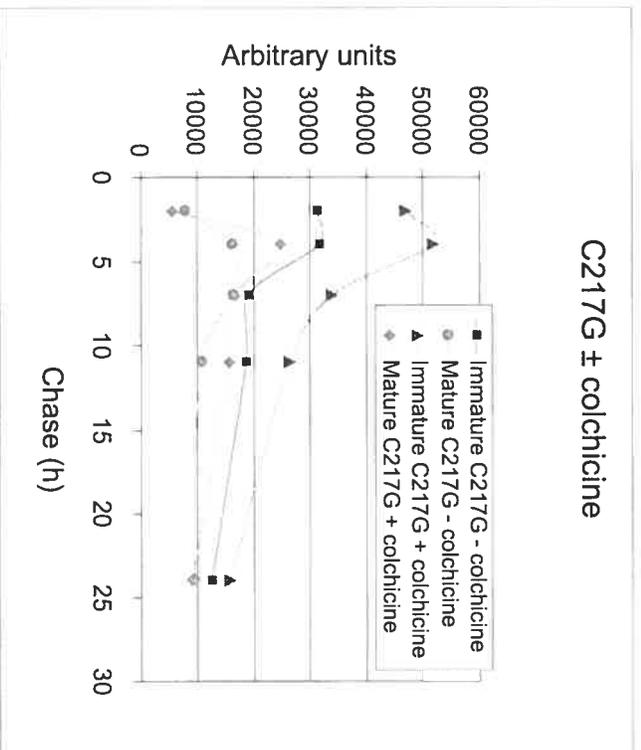
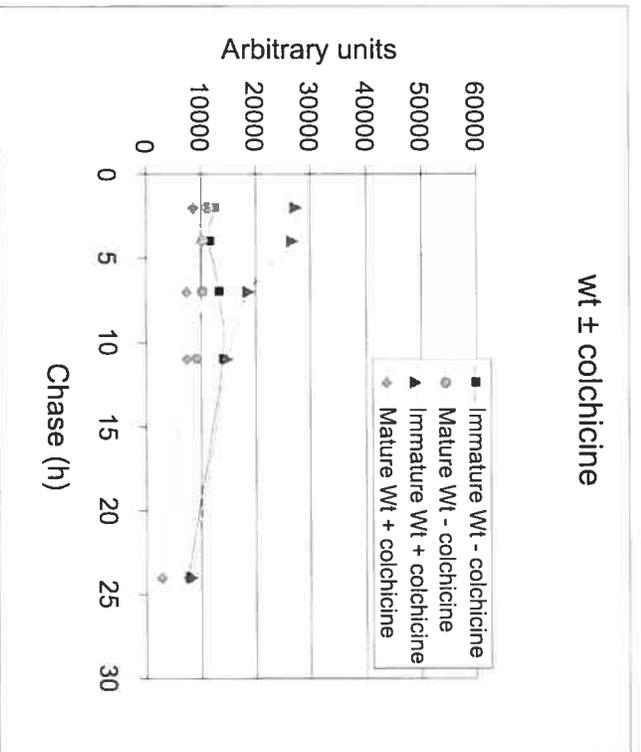
Figure 7











REFERENCES

1. SCOLARI F, CARIDI G, RAMPOLDI L, *et al*: Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Am J Kidney Dis* 44:987-999, 2004
2. 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* 39:882-992, 2002
3. RAMPOLDI L, CARIDI G, SANTON D, *et al*: Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet* 12:3369-84, 2003
4. 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*. 16:3006-3014, 2005
5. TURNER JJ, STACEY JM, HARDING B, *et al*: UROMODULIN mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1398-1401, 2003
6. KUDO E, KAMATANI N, TEZUKA O, *et al*: Familial juvenile hyperuricemic nephropathy: detection of mutations in the uromodulin gene in five Japanese families. *Kidney Int* 65:1589-1597, 2004
7. 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* 14:2883-2893, 2003
8. KAUFMAN RJ: Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13:1211-1233, 1999
9. FLYNN GC, POHL J, FLOCCO MT, *et al*: Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353:726-730, 1991
10. LEGLER DF, DOUCEY MA, SCHNEIDER P, *et al*: Differential insertion of GPI-anchored GFPs into lipid rafts of live cells. *Faseb J* 19:73-75, 2005
11. GARCIA-MATA R, BEBOK Z, SORSCHER EJ, *et al*: Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*. 146:1239-1254, 1999
12. NONAKA H, TSUJINO T, WATARI Y, *et al*: Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*. 104:1165-1170, 2001

13. KIM SJ, KIM TS, HONG S, *et al*: Oxidative stimuli affect polyglutamine aggregation and cell death in human mutant ataxin-1-expressing cells. *Neurosci Lett.* 348:21-24, 2003
14. TINSCHERT S, RUF N, BERNASCONE I, *et al*: Functional consequences of a novel uromodulin mutation in a family with familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 19:3150-3154, 2004
15. MORELLO JP, SALAHPOUR A, LAPERRIERE A, *et al*: Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest.* 105:887-995, 2000
16. PETERS M, JECK N, REINALTER S, *et al*: Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med.* 112:183-190, 2002
17. HEDIGER MA, JOHNSON RJ, MIYAZAKI H, *et al*: Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda)* 20:125-33, 2005
18. 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* 66:1159-1166, 2004
19. PAK J, PU Y, ZHANG ZT, *et al*: Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J Biol Chem.* 276:9924-9930, 2001
20. 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* 286:F795-802, 2004
21. BATES JM, RAFFI HM, PRASADAN K, *et al*: Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int* 65:791-797, 2004
22. SAEMANN MD, WEICHHART T, ZEYDA M, *et al*: Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. *J Clin Invest* 115:468-475, 2005

Discussion

Analyse des résultats

Types de mutations

Le projet présenté décrit une nouvelle mutation de la THP dans la NHFJ, soit la substitution d'un aspartate pour une alanine en position 196, qui n'a pas encore été rapportée dans la littérature. Ce mutant s'est rajouté à quatre autres analysés au cours de cette étude. Il est bien connu que selon la mutation, les conséquences peuvent être plus ou moins variables, dépendamment de la région touchée et de l'acide aminé substitué.

Dans le cas des résultats présentés ici, deux mutations se retrouvent à l'intérieur de domaines structuraux définis de la THP. La première est la substitution N128S qui se localise dans un domaine EGF liant le calcium. Ce domaine a été rapporté comme ayant un rôle de protection contre le clivage protéolytique (Reinhardt *et al.*, 1997) et de facilitation d'interactions entre protéines (Werner *et al.*, 2000). Des mutations dans ce domaine chez la fibrilline causent le syndrome de Marfan. (Dietz *et al.*, 1991) Le second domaine de la THP touché par une mutation est le domaine zona pellucida, contenant la substitution C366G. Cette mutation n'a pas encore été trouvée en clinique chez des patients atteints de NHFJ. En fait, au départ cette mutation avait été construite dans un contexte d'étude de structure-

fonction, puisqu'elle correspond à une mutation touchant une cystéine dans le domaine ZP de l'alpha-tectorine. Cette protéine est un composant essentiel de la membrane tectoriale et ses mutations mènent à une forme autosomique dominante de surdité. (Verhoeven *et al.*, 1998) Sur le plan moléculaire, les mutations du domaine ZP semblent affecter l'assemblage et la sécrétion des protéines. (Jovine *et al.*, 2002)

En plus du fait que certaines mutations de l'étude se retrouvent dans des domaines définis de la THP, la nature de l'acide aminé substitué joue un rôle important. Les conséquences peuvent être particulièrement délétères si l'acide aminé muté est remplacé par un acide aminé qui possède des caractéristiques différentes .

Tout d'abord, deux des mutations de la THP étudiées touchent des cystéines qui sont remplacées par des glycines (C217G et C366G). Les cystéines font partie du groupe des acides aminés non polaires. Tout comme les méthionines, chacune contient un atome de soufre qui peut former un lien covalent avec le même atome sur une autre cystéine, permettant à la protéine d'acquérir une structure tridimensionnelle particulière. Pour leur part, les glycines sont des acides aminés uniques dans la mesure, où l'absence d'une chaîne latérale leur permet d'adopter des conformations stériques impossibles pour d'autres acides aminés. Ainsi, elles procurent aux protéines un grand degré de flexibilité locale. Une substitution d'une cystéine pour une glycine en position 1509 a été observée pour l'alpha-tectorine chez des patients atteints de surdité autosomique dominante. (Pfister *et al.*, 2004) La même substitution

a aussi été trouvée dans la protéine neurophysine II, où elle mène à une manifestation précoce du diabète insipide neurohypophysaire qui affecte la production d'arginine vasopressine. (DiMeglio *et al.*, 2001)

Une autre mutation de l'étude retrouvée dans la THP chez les patients atteints de NHFJ consiste en un changement d'un acide aspartique pour une alanine (D196A). L'aspartate constitue, avec le glutamate, la famille des acides aminés acides. Au pH neutre il est chargé négativement, ce qui lui permet d'établir des interactions avec des acides aminés basiques chargés positivement, donc son rôle structurel est important. Pour sa part, l'alanine est un résidu non polaire et hydrophobe, donc localisé généralement à l'intérieur des protéines. Une mutation D→A en position 439 de la préséniline 2 a été observée chez un patient atteint d'Alzheimer, chez lequel la maladie s'est manifestée plutôt précocement. (Leo *et al.*, 2001) La même substitution a aussi été trouvée pour la préséniline en position 366, menant à une perte de fonction de la protéine. (Steiner *et al.*, 1999)

La mutation N128S pour sa part touche deux résidus qui peuvent être regroupés dans la même famille. L'asparagine et la sérine contiennent des chaînes latérales avec des groupes polaires qui ne peuvent pas s'ioniser facilement. Une substitution N→S en position 177 est retrouvée dans la kératine épidermique 5 causant un phénotype atténué d'*Epidermolysis bullosa simplex*, une maladie de la peau. (Liovic *et al.*, 2004) Le même type de mutation se retrouve en position 528 du

facteur von Willebrand et l'empêche de former des multimères dans la maladie de von Willebrand. (Gaucher *et al.*, 1998)

La mutation P236L étudiée pour la THP génère un intérêt particulier, puisqu'elle présente le pire phénotype *in vitro*. La proline est l'acide aminé le plus rigide, parce que sa chaîne latérale est liée de façon covalente avec le nitrogène de sa chaîne principale. La leucine, quant à elle, est un acide aminé hydrophobe non polaire. Ce type de mutation a été trouvé en position 229 de l'antithrombine et les individus atteints présentent un phénotype sévère de thrombose. (Picard *et al.*, 2003) Également, un patient avec une mutation P193L dans le récepteur à l'insuline présentait un phénotype sévère de résistance à l'insuline. L'étude *in vitro* de cette mutation avait révélé une diminution de l'expression membranaire du récepteur et une rétention au réticulum endoplasmique. (Maggi *et al.*, 1999)

Réponse aux protéines mal repliées

Les résultats obtenus par immunobuvardage et par microscopie à immunofluorescence montrent que les mutants présentent tous des défauts de maturation, à des degrés variables, par rapport au type sauvage. Un compartiment cellulaire privilégié dans la maturation des protéines est le réticulum endoplasmique, puisque c'est le site de modifications post-traductionnelles, telles la glycosylation et la formation de ponts disulfure et qu'il contient des chaperones aidant au repliement

des protéines. Précédemment, un équipe avait démontré que la THP wt quittait plus rapidement le RE que les mutants pour se rendre au Golgi. (Rampoldi *et al.*, 2003) Par contre, nous sommes les premiers à montrer qu'il y a enclenchement d'un stress du RE par l'augmentation de l'expression de la chaperone Bip dans le cas des mutants. Il semble donc que la cellule tente de faire un sauvetage des protéines mutantes en augmentant la machinerie de repliement. En partie, les protéines THP mal repliées sont dégradées au protéasome, mais pas de façon assez efficace. En effet, si les cellules transfectées sont observées plus tard, soit après 40h, on note une présence d'agrégats juxtanucléaires pour les mutants P236L et C217G. Comme il a été rapporté qu'un stress du RE prolongé ou la présence d'agrégats intracellulaires peuvent mener à l'apoptose, il serait possible de spéculer que certaines mutations peuvent mener à la mort cellulaire programmée des cellules l'anse ascendante large de Henlé, le site de production de la THP. D'autres conditions induisant le stress, telles l'hypertonie n'ont pas été analysées lors de cette étude, mais il pourrait être intéressant de regarder la réponse des cellules transfectées et soumises à un milieu hypertonique ou à un stress oxydatif.

La tentative de mesurer l'apoptose par Hoechst/PI au FACS et par essai TUNEL ne s'est pas avéré concluente. Probablement, ce phénomène nécessite un temps d'observation plus important que 48 ou 72 heures, période au-delà de laquelle pour les transfectants transitoires l'expression de THP était fortement diminuée. Pour palier à ce problème, nous avons tenté de générer des transfectants stables en commençant par le type sauvage et le mutant P236L. L'étape de sélection à la

puromycine était réussie, mais lors de l'amplification des clones positifs, alors que les cellules avec la THP wt se divisaient bien, les cellules positives pour P236L mourraient au bout de quelques jours, avant d'être amplifiées en nombre suffisant. Il se pourrait que les colonies exprimant des mutants de la THP sous promoteur CMV accumulent des agrégats toxiques et meurent rapidement. Une solution envisageable serait l'insertion du gène de la THP dans des plasmides contenant un promoteur inducible, par exemple à la tétracycline. Des lignées stables inducibles permettraient l'étude à long terme des effets de mutations de la THP sur le stress du RE et l'apoptose ainsi que l'interaction entre ces deux phénomènes.

Les paragraphes qui suivent décrivent de quelle façon les résultats obtenus in vitro au cours de ce projet pourraient être reliés aux phénotypes observés en clinique chez les patients atteints de NHFJ.

THP intracellulaire et urinaire

Des biopsies rénales de patients atteints démontraient des accumulations intracellulaires de THP (Dahan *et al.*, 2003) (Rampoldi *et al.*, 2003), ce qui est compatible avec les agrégats que nous avons observés par microscopie à fluorescence sur des cellules transfectées. Par ailleurs, plusieurs études précédentes avaient dénoté une diminution de l'excrétion urinaire de THP chez les patients atteints de NHFJ par la méthode d'immunobuvardage. (Dahan *et al.*, 2003) Dans cette étude, nous notons

également, par méthode ELISA, une diminution de l'excrétion de THP chez les individus atteints, toutefois avec un certain chevauchement avec des individus sains. Les résultats obtenus *in vitro* laissent penser que la diminution de THP urinaire pourrait être due à une apoptose ou une dysfonction des cellules de l'anse, suite à une rétention intracellulaire et une agrégation de la protéine. Toutefois, des études plus poussées devraient être faites pour s'assurer qu'il a effectivement engagement vers la voie apoptotique.

Excrétion fractionnelle d'urate et hyperuricémie

Chez les patients que nous avons étudiés, l'excrétion fractionnelle d'urate était basse, ce qui est en accord avec les résultats d'études précédentes. (Moro *et al.*, 1991) Cependant, là encore, il y avait dans certains cas un chevauchement avec des individus non atteints, rendant cette donnée un critère de diagnostic non suffisant. Par contre, l'hyperuricémie semble être une caractéristique bien définie de la maladie. Il n'est pas connu de quelle façon des mutations d'une protéine présente dans l'anse ascendante large de Henlé, soit la THP, peuvent influencer l'urate, une substance considérée comme étant réabsorbée et un peu sécrétée uniquement au niveau du tubule proximal par l'échangeur URAT1. Par contre, il n'est pas exclu que des transporteurs d'urate soient présents dans d'autres sections du néphron. Le transporteur OAT1 a été identifié dans la membrane basolatérale des cellules du tubule proximal, comme un échangeur anion-urate. (reviewé par Rafey *et al.*, 2003) Récemment, deux autres isoformes du transporteur, soit OAT2 et OAT3, ont été

identifiées chez le rat au niveau de l'anse de Henlé et des tubules collecteurs, mais il reste à déterminer si elles sont réellement impliquées dans le transport de l'urate et si leurs équivalents se retrouvent chez l'être humain. (Kojima *et al.*, 2002) Chez le rat, OAT3 se retrouve à la membrane basolatérale, alors que OAT2 est présent à la membrane apicale. Fait intéressant, OAT2 présente un marquage membranaire sous forme de plaques, plutôt qu'un marquage linéaire dans les cellules de l'anse ascendante large. (Kojima *et al.*, 2002) Dans notre étude, nous avons observé ce genre de marquage pour la THP. Il n'est donc pas essentiel que la THP soit associée à des transporteurs d'urate. Cependant, pour l'instant, tout transport d'urate au-delà du tubule proximal reste spéculatif, mais c'est une voie qui mérite investigation.

Calcium et Magnésium

Les individus atteints ne présentent pas d'hypercalciurie ni d'hypermagnésiurie. Si la fonction des cellules de l'anse ascendante large était compromise, une augmentation de ces deux ions serait prévisible dans l'urine, puisque cette partie du néphron contribue de façon significative à leur réabsorption. La première hypothèse est que ces ions étant transportés de façon paracellulaire, cette voie ne serait pas affectée dans les cellules accumulant des mutations de la THP. L'autre solution pour le rein, serait d'augmenter la réabsorption de ces ions à d'autres endroits du néphron. Ainsi, le calcium pourrait être réabsorbé davantage au niveau du tubule proximal, phénomène médié par une augmentation de la parathormone qui sent les diminutions du calcium sanguin. Pour sa part, la réabsorption du magnésium

pourrait être augmentée dans le tubule proximal et le tubule distal, bien que ces deux sites contribuent normalement beaucoup moins à ce phénomène que les cellules de l'anse.

Polyurie

Les patients atteints de NHFJ présentent une augmentation du volume urinaire, mais pas beaucoup plus élevée que la moyenne. Généralement, des perturbations dans le fonctionnement de l'anse de Henlé entraînent une polyurie. C'est le cas du syndrome de Bartter, causé par des mutations de gènes codant pour des transporteurs de sels ou des protéines régulant ces transporteurs, ce qui résulte entre autres en une perte importante de sels dans l'urine, menant à l'augmentation du volume urinaire. (Hebert *et al.*, 2003) Par contre, dans la NHFJ, il n'y a pas de perte marquée de sels, possiblement dû à une augmentation de la réabsorption dans d'autres segments du néphron, ce qui prévient la nécessité de diluer l'urine en augmentant la sécrétion d'eau.

Phénotype clinique et moléculaire

En concluant, il semble que le phénotype clinique ne soit pas nécessairement lié au phénotype moléculaire observé *in vitro*. De façon évidente, le mutant P236L a un effet dramatique sur les cellules transfectées, alors que les patients développent

une insuffisance rénale seulement après la quarantaine ou la cinquantaine. Par contre, la mutation C217G produit *in vitro* un effet moins délétère, alors qu'en clinique, les individus atteints présentent une insuffisance rénale très précoce, soit dans la vingtaine. Par contre, le mutant D196A occasionne un phénotype moins sévère autant *in vitro* qu'en clinique.

Perspectives

Tentatives thérapeutiques

Une voie intéressante serait de tenter d'améliorer le repliement des protéines THP mutantes par l'administration de chaperones chimiques. Des études *in vitro* ont montré que des composés comme le DMSO, TMAO ou 4-PBA aident des protéines mutantes à être correctement repliées et à atteindre leur destination finale, par des mécanismes qui n'ont pas encore été clarifiés. (reviewé par Perlmutter *et al.*, 2002) Dans notre laboratoire, le DMSO, le 4-PBA, la N-acétylcystéine, la taurine ainsi que la colchicine n'ont pas montré d'amélioration de la maturation de THP mutante dans les transfections transitoires, mais il n'est pas exclu que l'utilisation de ces produits à plus long terme puisse avoir des effets bénéfiques.

Parallèlement, les chaperones pharmacologiques présentent des options plus intéressantes, puisqu'elles sont très spécifiques. Il s'agit d'administrer un ligand de la

protéine mutée, par exemple l'agoniste d'un récepteur qui va lier la protéine à l'intérieur de la cellule et favoriser son repliement. (reviewé par Bernier *et al.*, 2004) Aucun ligand n'est connu pour la THP, mais il serait possible de faire un criblage à grande échelle de différents composés.

Études in vivo

Pour se rapprocher de l'étude de la NHFJ chez l'humain, il faut passer de systèmes *in vitro* à des modèles *in vivo*. Pour ce faire, dans le laboratoire, nous avons généré des souris transgéniques avec les mutants N128S et P236L. Les premiers résultats montrent que ces souris présentent des phénotypes de polyurie et l'hyperuricémie, ce qui suggère qu'elles pourraient être un bon modèle de la maladie, à l'encontre de souris knock-out pour la THP générées par d'autres équipes et qui ne montrent pas de signes de NHFJ. (Bates *et al.*, 2004) (Mo *et al.*, 2004)

Bibliographie

- Andermarcher, E., Bossis, G., Farras, R., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M., 2005, Proteasomal degradation: from addressing of substrates to therapeutical perspectives, *Med Sci (Paris)* **21**(2):141-9.
- Anelli, T., Alessio, M., Bachi, A., Bergamelli, L., Bertoli, G., Camerini, S., Mezghrani, A., Ruffato, E., Simmen, T., and Sitia, R., 2003, Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44, *Embo J* **22**(19):5015-22.
- Aridor, M., and Hannan, L. A., 2000, Traffic jam: a compendium of human diseases that affect intracellular transport processes, *Traffic* **1**(11):836-51.
- Bachmann, S., Mutig, K., Bates, J., Welker, P., Geist, B., Gross, V., Luft, F. C., Alenina, N., Bader, M., Thiele, B. J., Prasadana, K., Raffi, H. S., and Kumar, S., 2005, Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice, *Am J Physiol Renal Physiol* **288**(3):F559-67. Epub 2004 Nov 2.
- Bannykh, S. I., Nishimura, N., and Balch, W. E., 1998, Getting into the Golgi, *Trends Cell Biol* **8**(1):21-5.
- Barone, M. V., Crozat, A., Tabae, A., Philipson, L., and Ron, D., 1994, CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest, *Genes Dev* **8**(4):453-64.
- Bates, J. M., Raffi, H. M., Prasadana, K., Mascarenhas, R., Laszik, Z., Maeda, N., Hultgren, S. J., and Kumar, S., 2004, Tamm-Horsfall protein knockout mice

are more prone to urinary tract infection: rapid communication, *Kidney Int* **65**(3):791-7.

Bence, N. F., Sampat, R. M., and Kopito, R. R., 2001, Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation, *Science* **292**(5521):1552-5.

Bernier, V., Lagace, M., Bichet, D. G., and Bouvier, M., 2004, Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases, *Trends Endocrinol Metab* **15**(5):222-8.

Brown, D., and Breton, S., 2000, Sorting proteins to their target membranes, *Kidney Int* **57**(3):816-24.

Buckig, A., Tikkanen, R., Herzog, V., and Schmitz, A., 2002, Cytosolic and nuclear aggregation of the amyloid beta-peptide following its expression in the endoplasmic reticulum, *Histochem Cell Biol* **118**(5):353-60. Epub 2002 Oct 3.

Calado, J., Gaspar, A., Clemente, C., and Rueff, J., 2005, A novel heterozygous missense mutation in the UMOD gene responsible for Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy, *BMC Med Genet* **6**:5.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D., 2002, IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, *Nature* **415**(6867):92-6.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D., 2002, IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, *Nature* **415**(6867):92-6.

Cavallone, D., Malagolini, N., and Serafini-Cessi, F., 1999, Binding of human neutrophils to cell-surface anchored Tamm-Horsfall glycoprotein in tubulointerstitial nephritis, *Kidney Int* **55**(5):1787-99.

- Cavallone, D., Malagolini, N., and Serafini-Cessi, F., 2001, Mechanism of release of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein from the kidney GPI-anchored counterpart, *Biochem Biophys Res Commun* **280**(1):110-4.
- Chapple, J. P., Grayson, C., Hardcastle, A. J., Saliba, R. S., van der Spuy, J., and Cheetham, M. E., 2001, Unfolding retinal dystrophies: a role for molecular chaperones?, *Trends Mol Med* **7**(9):414-21.
- Chatterjee, S., and Mayor, S., 2001, The GPI-anchor and protein sorting, *Cell Mol Life Sci* **58**(14):1969-87.
- Choi, S. W., Ryu, O. H., Choi, S. J., Song, I. S., Bleyer, A. J., and Hart, T. C., 2005, Mutant tamm-horsfall glycoprotein accumulation in endoplasmic reticulum induces apoptosis reversed by colchicine and sodium 4-phenylbutyrate, *J Am Soc Nephrol* **16**(10):3006-14.
- Cohen, F. E., and Kelly, J.W., 2003, Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases, *Nature* **426**(6968):905-9.
- Dahan, K., Devuyst, O., Smaers, M., Vertommen, D., Loute, G., Poux, J. M., Viron, B., Jacquot, C., Gagnadoux, M. F., Chauveau, D., Buchler, M., Cochat, P., Cosyns, J. P., Mougnot, B., Rider, M. H., Antignac, C., Verellen-Dumoulin, C., and Pirson, Y., 2003, A cluster of mutations in the UMOD gene causes familial juvenile hyperuricemic nephropathy with abnormal expression of uromodulin, *J Am Soc Nephrol* **14**(11):2883-93.
- Deen, P. M., Verdijk, M. A., Knoers, N. V., Wieringa, B., Monnens, L. A., van Os, C. H., and van Oost, B. A., 1994, Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine, *Science* **264**(5155):92-5.

- Dietz, H. C., Cutting, G. R., Pyeritz, R. E., Maslen, C. L., Sakai, L. Y., Corson, G. M., Puffenberger, E. G., Hamosh, A., Nanthakumar, E. J., Curristin, S. M., and et al., 1991, Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene, *Nature* **352**(6333):337-9.
- DiMeglio, L. A., Gagliardi, P. C., Browning, J. E., Quigley, C. A., and Repaske, D. R., 2001, A missense mutation encoding cys(67) --> gly in neurophysin ii is associated with early onset autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus, *Mol Genet Metab* **72**(1):39-44.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H., 1999, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu Rev Biochem.* **68**:383-424.
- Egea, P. F., Stroud, R. M., and Walter, P., 2005, Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle, *Curr Opin Struct Biol* **15**(2):213-20.
- Ellgaard, L., and Ruddock, L. W., 2005, The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties, *EMBO Rep* **6**(1):28-32.
- Fairbanks, L. D., Cameron, J. S., Venkat-Raman, G., Rigden, S. P., Rees, L., Van, T. H. W., Mansell, M., Pattison, J., Goldsmith, D. J., and Simmonds, H. A., 2002, Early treatment with allopurinol in familial juvenile hyperuricaemic nephropathy (FJHN) ameliorates the long-term progression of renal disease, *Qjm* **95**(9):597-607.
- Ferrari, D. M., and Soling, H. D., 1999, The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds, *Biochem J* **339**(Pt 1):1-10.

- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E., 2002, Human caspase 12 has acquired deleterious mutations, *Biochem Biophys Res Commun* **293**(2):722-6.
- Fischer, U., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K., 2003, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell Death Differ* **10**(1):76-100.
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T., and Rothman, J. E., 1991, Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP, *Nature* **353**(6346):726-30.
- Frand, A. R., and Kaiser, C. A., 1999, Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum, *Mol Cell* **4**(4):469-77.
- Freedman, R. B., Hirst, T. R., and Tuite, M. F., 1994, Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding, *Trends Biochem Sci* **19**(8):331-6.
- Frickel, E. M., Frei, P., Bouvier, M., Stafford, W. F., Helenius, A., Glockshuber, R., and Ellgaard, L., 2004, ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase, *J Biol Chem* **279**(18):18277-87. Epub 2004 Feb 10.
- Fujiwara, T. M., and Bichet, D. G., 2005, Molecular biology of hereditary diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol* **16**(10):2836-46.
- Gaucher, C., Uno, H., Yamazaki, T., Mashiba, H., and Mazurier, C., 1998, A new candidate mutation (N528S) within the von Willebrand factor propeptide identified in a Japanese patient with phenotype IIC of von Willebrand disease, *Eur J Haematol* **61**(2):145-8.
- Gelebart, P., Opas, M., and Michalak, M., 2005, Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, *Int J Biochem Cell Biol* **37**(2):260-6.
- Groll, M., and Huber, R., 2004, Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach, *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3):33-44.

- Gulow, K., Bienert, D., and Haas, I. G., 2002, BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency, *J Cell Sci* **115**(Pt 11):2443-52.
- Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E., and Johnson, A. E., 1997, The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane, *Cell* **89**(4):535-44.
- Hammond, C., and Helenius, A., 1994, Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus, *J Cell Biol* **126**(1):41-52.
- Hart, T. C., Gorry, M. C., Hart, P. S., Woodard, A. S., Shihabi, Z., Sandhu, J., Shirts, B., Xu, L., Zhu, H., Barmada, M. M., and Bleyer, A. J., 2002, Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy, *J Med Genet* **39**(12):882-92.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K., 1999, Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress, *Mol Biol Cell* **10**(11):3787-99.
- Hebert, S. C., 2003, Bartter syndrome, *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**(5):527-32.
- Helenius, A., and Aebi, M., 2001, Intracellular functions of N-linked glycans, *Science* **291**(5512):2364-9.
- Hendil, K. B., 1988, The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells, *Biochem Int* **17**(3):471-7.
- Hershko, A., and Ciechanover, A., 1998, The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* **67**:425-79.

- Hession, C., Decker, J. M., Sherblom, A. P., Kumar, S., Yue, C. C., Mattaliano, R. J., Tizard, R., Kawashima, E., Schmeissner, U., Heletky, S., and et al., 1987, Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines, *Science* **237**(4821):1479-84.
- Hirano, K., Zuber, C., Roth, J., and Ziak, M., 2003, The proteasome is involved in the degradation of different aquaporin-2 mutants causing nephrogenic diabetes insipidus, *Am J Pathol* **163**(1):111-20.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., and Tohyama, M., 2004a, Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death, *J Cell Biol* **165**(3):347-56. Epub 2004 May 3.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., and Tohyama, M., 2004b, Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12, *Neurosci Lett* **357**(2):127-30.
- Humphries, M. M., Rancourt, D., Farrar, G. J., Kenna, P., Hazel, M., Bush, R. A., Sieving, P. A., Sheils, D. M., McNally, N., Creighton, P., Erven, A., Boros, A., Gulya, K., Capecchi, M. R., and Humphries, P., 1997, Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene, *Nat Genet* **15**(2):216-9.
- Jazwinska, A., Ribeiro, C., and Affolter, M., 2003, Epithelial tube morphogenesis during *Drosophila* tracheal development requires Piopio, a luminal ZP protein, *Nat Cell Biol* **5**(10):895-901. Epub 2003 Sep 14.

- Johnston, J. A., Ward, C. L., and Kopito, R. R., 1998, Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins, *J Cell Biol* **143**(7):1883-98.
- Jorgensen, M. M., Jensen, O. N., Holst, H. U., Hansen, J. J., Corydon, T. J., Bross, P., Bolund, L., and Gregersen, N., 2000, Grp78 is involved in retention of mutant low density lipoprotein receptor protein in the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* **275**(43):33861-8.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E., and Wassarman, P. M., 2002, The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins, *Nat Cell Biol* **4**(6):457-61.
- Kassenbrock, C. K., and Kelly, R. B., 1989, Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides, *Embo J* **8**(5):1461-7.
- Kaushal, S., and Khorana, H. G., 1994, Structure and function in rhodopsin. 7. Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa, *Biochemistry* **33**(20):6121-8.
- Kobayashi, K., Yanagihara, K., Ishiguro, K., and Fukuoka, S., 2004, GP2/THP gene family of self-binding, GPI-anchored proteins forms a cluster at chromosome 7F1 region in mouse genome, *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2):659-64.
- Kojima, R., Sekine, T., Kawachi, M., Cha, S. H., Suzuki, Y., and Endou, H., 2002, Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney, *J Am Soc Nephrol* **13**(4):848-57.
- Kudo, E., Kamatani, N., Tezuka, O., Taniguchi, A., Yamanaka, H., Yabe, S., Osabe, D., Shinohara, S., Nomura, K., Segawa, M., Miyamoto, T., Moritani, M., Kunika, K., and Itakura, M., 2004, Familial juvenile hyperuricemic

nephropathy: detection of mutations in the uromodulin gene in five Japanese families, *Kidney Int* **65**(5):1589-97.

Lawless, M. W., Greene, C. M., Mulgrew, A., Taggart, C. C., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G., 2004, Activation of endoplasmic reticulum-specific stress responses associated with the conformational disease Z alpha 1-antitrypsin deficiency, *J Immunol* **172**(9):5722-6.

Le, A., Ferrell, G. A., Dishon, D. S., Le, Q. Q., and Sifers, R. N., 1992, Soluble aggregates of the human PiZ alpha 1-antitrypsin variant are degraded within the endoplasmic reticulum by a mechanism sensitive to inhibitors of protein synthesis, *J Biol Chem* **267**(2):1072-80.

Legler, D. F., Doucey, M. A., Schneider, P., Chapatte, L., Bender, F. C., and Bron, C., 2005, Differential insertion of GPI-anchored GFPs into lipid rafts of live cells, *Faseb J* **19**(1):73-5. Epub 2004 Oct 29.

Lin, H. H., Stacey, M., Saxby, C., Knott, V., Chaudhry, Y., Evans, D., Gordon, S., McKnight, A. J., Handford, P., and Lea, S., 2001, Molecular analysis of the epidermal growth factor-like short consensus repeat domain-mediated protein-protein interactions: dissection of the CD97-CD55 complex, *J Biol Chem* **276**(26):24160-9. Epub 2001 Apr 10.

Liovic, M., Bowden, P. E., Marks, R., and Komel, R., 2004, A mutation (N177S) in the structurally conserved helix initiation peptide motif of keratin 5 causes a mild EBS phenotype, *Exp Dermatol* **13**(5):332-4.

Liu, C. Y., Wong, H. N., Schauerte, J. A., and Kaufman, R. J., 2002, The protein kinase/endoribonuclease IRE1alpha that signals the unfolded protein response

has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain, *J Biol Chem* **277**(21):18346-56. Epub 2002 Mar 15.

Lleo, A., Blesa, R., Gendre, J., Castellvi, M., Pastor, P., Queralt, R., and Oliva, R., 2001, A novel presenilin 2 gene mutation (D439A) in a patient with early-onset Alzheimer's disease, *Neurology* **57**(10):1926-8.

Lomas, D. A., and Parfrey, H., 2004, Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology, *Thorax* **59**(6):529-35.

Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S. F., and Lee, A. S., 2003, Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements, *J Biol Chem* **278**(39):37375-85. Epub 2003 Jul 18.

Maggi, D., Barbetti, F., and Cordera, R., 1999, Role of proline 193 in the insulin receptor post-translational processing, *Diabetologia* **42**(4):435-42.

Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A., 1998, Protein translocation: tunnel vision, *Cell* **92**(3):381-90.

Mattey, M., and Naftalin, L., 1992, Mechanoelectrical transduction, ion movement and water stasis in uromodulin, *Experientia* **48**(10):975-80.

McBride, M. B., Rigden, S., Haycock, G. B., Dalton, N., Van't Hoff, W., Rees, L., Raman, G. V., Moro, F., Ogg, C. S., Cameron, J. S., and Simmonds, H. A., 1998, Presymptomatic detection of familial juvenile hyperuricaemic nephropathy in children, *Pediatr Nephrol* **12**(5):357-64.

McCracken, A. A., Kruse, K. B., and Brown, J. L., 1989, Molecular basis for defective secretion of the Z variant of human alpha-1-proteinase inhibitor:

secretion of variants having altered potential for salt bridge formation between amino acids 290 and 342, *Mol Cell Biol* **9**(4):1406-14.

McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., and Holbrook, N. J., 2001, Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state, *Mol Cell Biol* **21**(4):1249-59.

Mishra, B. B., Fernandes, A. M., Blaese, R. M., and Muchmore, A. V., 1994, Characterization of T cell ligands for uromodulin: a possible role in costimulation, *Cell Immunol* **159**(2):113-23.

Miyoshi, K., Katayama, T., Imaizumi, K., Taniguchi, M., Mori, Y., Hitomi, J., Yui, D., Manabe, T., Gomi, F., Yoneda, T., and Tohyama, M., 2000, Characterization of mouse Ire1 alpha: cloning, mRNA localization in the brain and functional analysis in a neural cell line, *Brain Res Mol Brain Res* **85**(1-2):68-76.

Mo, L., Huang, H. Y., Zhu, X. H., Shapiro, E., Hasty, D. L., and Wu, X. R., 2004a, Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation, *Kidney Int* **66**(3):1159-66.

Mo, L., Zhu, X. H., Huang, H. Y., Shapiro, E., Hasty, D. L., and Wu, X. R., 2004b, 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* **286**(4):F795-802. Epub 2003 Dec 9.

Molinari, M., and Helenius, A., 2000, Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum, *Science* **288**(5464):331-3.

- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y., 2002, An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12, *J Biol Chem* **277**(37):34287-94. Epub 2002 Jul 3.
- Moro, F., Ogg, C. S., Simmonds, H. A., Cameron, J. S., Chantler, C., McBride, M. B., Duley, J. A., and Davies, P. M., 1991, Familial juvenile gouty nephropathy with renal urate hypoexcretion preceding renal disease, *Clin Nephrol* **35**(6):263-9.
- Muchmore, A. V., and Decker, J. M., 1985, Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women, *Science* **229**(4712):479-81.
- Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M., and Mori, K., 2004, Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum, *Mol Biol Cell* **15**(6):2537-48.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J., 2000, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta, *Nature* **403**(6765):98-103.
- Orlowski, M., and Wilk, S., 2003, Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome, *Arch Biochem Biophys* **415**(1):1-5.
- Ou, W. J., Cameron, P. H., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J., 1993, Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation, *Nature* **364**(6440):771-6.

- Pan Y., Wilson P., and Gitschier J., 1994, The effect of eight V2 vasopressin receptor mutations on stimulation of adenylyl cyclase and binding to vasopressin, *J Biol Chem* **269**(50):31933-7.
- Peach, R. J., Day, W. A., Ellingsen, P. J., and McGiven, A. R., 1988, Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall protein in human kidney using immunogold electron microscopy, *Histochem J* **20**(3):156-64.
- Pelham, H. R., 1998, Getting through the Golgi complex, *Trends Cell Biol* **8**(1):45-9.
- Pennica, D., Kohr, W. J., Kuang, W. J., Glaister, D., Aggarwal, B. B., Chen, E. Y., and Goeddel, D. V., 1987, Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein, *Science* **236**(4797):83-8.
- Perlmutter, D. H., 2002, Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking, *Pediatr Res* **52**(6):832-6.
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P., and Bouvier, M., 2001, Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome, *J Biol Chem* **276**(6):4416-23.
- Pfister, M., Thiele, H., Van Camp, G., Fransen, E., Apaydin, F., Aydin, O., Leistenschneider, P., Devoto, M., Zenner, H. P., Blin, N., Nurnberg, P., Ozkarakas, H., and Kupka, S., 2004, A genotype-phenotype correlation with gender-effect for hearing impairment caused by TECTA mutations, *Cell Physiol Biochem* **14**(4-6):369-76.
- Picard, V., Dautzenberg, M. D., Villoutreix, B. O., Orliaguet, G., Alhenc-Gelas, M., and Aiach, M., 2003, Antithrombin Phe229Leu: a new homozygous variant

leading to spontaneous antithrombin polymerization in vivo associated with severe childhood thrombosis, *Blood* **102**(3):919-25.

Rafey, M. A., Lipkowitz, M. S., Leal-Pinto, E., and Abramson, R. G., 2003, Uric acid transport, *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**(5):511-6.

Rampoldi, L., Caridi, G., Santon, D., Boaretto, F., Bernascone, I., Lamorte, G., Tardanico, R., Dagnino, M., Colussi, G., Scolari, F., Ghiggeri, G. M., Amoroso, A., and Casari, G., 2003, Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics, *Hum Mol Genet* **12**(24):3369-84.

Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., and Bredesen, D. E., 2001, Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation, *J Biol Chem* **276**(36):33869-74.

Reinhardt, D. P., Ono, R. N., and Sakai, L. Y., 1997, Calcium stabilizes fibrillin-1 against proteolytic degradation, *J Biol Chem* **272**(2):1231-6.

Romero, M. C., Nocera, S., and Nesse, A. B., 1997, Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients, *Clin Biochem* **30**(1):63-7.

Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J., 2004, A trip to the ER: coping with stress, *Trends Cell Biol* **14**(1):20-8.

Saemann, M. D., Weichhart, T., Zeyda, M., Staffler, G., Schunn, M., Stuhlmeier, K. M., Sobanov, Y., Stulnig, T. M., Akira, S., von Gabain, A., von Ahsen, U., Horl, W. H., and Zlabinger, G. J., 2005, Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism, *J Clin Invest* **115**(2):468-75.

- Saliba, R. S., Munro, P. M., Luthert, P. J., and Cheetham, M. E., 2002, The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation, *J Cell Sci* **115**(Pt 14):2907-18.
- Schmitt, R., Kahl, T., Mutig, K., and Bachmann, S., 2004, Selectively reduced expression of thick ascending limb Tamm-Horsfall protein in hypothyroid kidneys, *Histochem Cell Biol* **121**(4):319-27.
- Schulein, R., 2004, The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **151**:45-91.
- Schwaller, M., Wilkinson, B., and Gilbert, H. F., 2003, Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase, *J Biol Chem* **278**(9):7154-9.
- Serafini-Cessi, F., Malagolini, N., and Cavallone, D., 2003, Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance, *Am J Kidney Dis* **42**(4):658-76.
- Serafini-Cessi, F., Malagolini, N., Hoops, T. C., and Rindler, M. J., 1993, Biosynthesis and oligosaccharide processing of human Tamm-Horsfall glycoprotein permanently expressed in HeLa cells, *Biochem Biophys Res Commun* **194**(2):784-90.
- Shen, J., and Prywes, R., 2004, Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6, *J Biol Chem* **279**(41):43046-51.
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., and Haass, C., 1999, A

loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling, *J Biol Chem* **274**(40):28669-73.

Stenflo, J., Stenberg, Y., and Muranyi, A., 2000, Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions, *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2):51-63.

Su, S. J., Chang, K. L., Lin, T. M., Huang, Y. H., and Yeh, T. M., 1997, Uromodulin and Tamm-Horsfall protein induce human monocytes to secrete TNF and express tissue factor, *J Immunol* **158**(7):3449-56.

Tamm, I., and Horsfall, F. L., 1950, Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine, *Proc Soc Exp Biol Med* **74**: 108-114.

Tarabal, O., Caldero, J., Casas, C., Oppenheim, R. W., and Esquerda, J. E., 2005, Protein retention in the endoplasmic reticulum, blockade of programmed cell death and autophagy selectively occur in spinal cord motoneurons after glutamate receptor-mediated injury, *Mol Cell Neurosci* **29**(2):283-98.

Thomas, D. B., Davies, M., Peters, J. R., and Williams, J. D., 1993, Tamm Horsfall protein binds to a single class of carbohydrate specific receptors on human neutrophils, *Kidney Int* **44**(2):423-9.

Tinschert, S., Ruf, N., Bernascone, I., Sacherer, K., Lamorte, G., Neumayer, H. H., Nurnberg, P., Luft, F. C., and Rampoldi, L., 2004, Functional consequences of a novel uromodulin mutation in a family with familial juvenile hyperuricaemic nephropathy, *Nephrol Dial Transplant* **19**(12):3150-4.

Turner, J. J., Stacey, J. M., Harding, B., Kotanko, P., Lhotta, K., Puig, J. G., Roberts, I., Torres, R. J., and Thakker, R. V., 2003, UROMODULIN mutations cause

familial juvenile hyperuricemic nephropathy, *J Clin Endocrinol Metab* **88**(3):1398-401.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., and Ron, D., 2000, Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1, *Science* **287**(5453):664-6.

Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P. K., Hughes, D. C., Schatteman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R. J., Somers, T., Offeciers, F. E., Van de Heyning, P., Richardson, G. P., Wachtler, F., Kimberling, W. J., Willems, P. J., Govaerts, P. J., and Van Camp, G., 1998, Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment, *Nat Genet* **19**(1):60-2.

Voeltz, G. K., Rolls, M. M., and Rapoport, T. A., 2002, Structural organization of the endoplasmic reticulum, *EMBO Rep* **3**(10):944-50.

Werner, J. M., Knott, V., Handford, P. A., Campbell, I. D., and Downing, A. K., 2000, Backbone dynamics of a cbEGF domain pair in the presence of calcium, *J Mol Biol* **296**(4):1065-78.

Wimmer, T., Cohen, G., Saemann, M. D., and Horl, W. H., 2004, Effects of Tamm-Horsfall protein on polymorphonuclear leukocyte function, *Nephrol Dial Transplant* **19**(9):2192-7. Epub 2004 Jul 20.

Wojcik, C., and DeMartino, G. N., 2003, Intracellular localization of proteasomes, *Int J Biochem Cell Biol* **35**(5):579-89.

Yang, H., Wu, C., Zhao, S., and Guo, J., 2004, Identification and characterization of D8C, a novel domain present in liver-specific LZIP, uromodulin and

glycoprotein 2, mutated in familial juvenile hyperuricaemic nephropathy, *FEBS Lett* **578**(3):236-8.

Ying, W. Z., and Sanders, P. W., 1998, Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats, *Kidney Int* **54**(4):1150-6.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K., 1998, Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors, *J Biol Chem* **273**(50):33741-9.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K., 2001, XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor, *Cell* **107**(7):881-91.

Yu, C. L., Lin, W. M., Liao, T. S., Tsai, C. Y., Sun, K. H., and Chen, K. H., 1992, Tamm-Horsfall glycoprotein (THG) purified from normal human pregnancy urine increases phagocytosis, complement receptor expressions and arachidonic acid metabolism of polymorphonuclear neutrophils, *Immunopharmacology*, **24**(3):181-90.

Zielenski, J., and Tsui, L. C., 1995, Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations, *Annu Rev Genet* **29**:777-807.

Zimmermann, K. C., and Green, D. R., 2001, How cells die: apoptosis pathways, *J Allergy Clin Immunol.* **108**(4 Suppl):S99-103.



Handwritten text at the bottom right of the page, possibly a signature or date.