

Sindrome di Bartter, grave patologia renale rara orfana di farmaci: un passo avanti verso la terapia mediante studi farmacogenetici ed epidemiologici

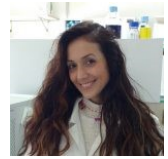
Editoriali

Elena Conte, Paola Imbrici, Dalila Sahbani, Antonella Liantonio e Diana Conte

Dipartimento di Farmacia – Scienze del Farmaco, Università di Bari

Corrispondenza a:

Dott.ssa Diana Conte
Dipartimento di Farmacia – Scienze del Farmaco, Università di Bari
Via Orabona 4, CAMPUS, 70125 Bari, Italia
e-mail: diana.conte@uniba.it



Dott.ssa Diana Conte

ABSTRACT

Le sindromi di Bartter (BS tipo 1-5) rappresentano un gruppo di tubulopatie renali rare a carattere autosomico recessivo che si manifestano con fenotipi clinici parzialmente sovrapponibili caratterizzati da perdita di sali, alcalosi metabolica, ipokaliemica, poliuria, polidipsia, debolezza muscolare e ritardo della crescita. Tali patologie sono dovute a un difetto nel riassorbimento dello ione sodio, potassio e cloro a causa di mutazioni in geni che codificano per proteine canale o trasportatori presenti in diversi tratti nel nefrone. In particolare, la BS di tipo 3 è una canalopatia clinicamente eterogenea causata da mutazioni con perdita di funzione nel gene *CLCNKB* che codifica per il canale al cloro ClC-Kb coinvolto nel riassorbimento di NaCl. Ad oggi, il trattamento della BS è puramente sintomatico, non essendo ancora disponibile una terapia farmacologica mirata per tali sindromi renali. La comprensione del background genetico e dei meccanismi molecolari alla base della BS, nonché la caratterizzazione farmacologica dei canali al cloro renali ClC-K sono essenziali per il disegno di approcci terapeutici mirati per i pazienti affetti da BS. In quest'editoriale sono descritti recenti studi che rappresentano significativi avanzamenti nel settore ed esempi di proficua interazione tra la ricerca di base e la ricerca clinica che aprono la strada ad una medicina di precisione e personalizzata per il trattamento di questa canalopatia renale.

PAROLE CHIAVE: Sindrome di Bartter, canali al cloro ClC-K, farmacogenetica, malattie rare

ABSTRACT

Bartter syndromes (BS) types 1-5 are rare salt-losing tubulopathies presenting with overlapping clinical phenotypes including marked salt wasting and hypokalemia leading to polyuria, polydipsia, volume contraction, muscle weakness and growth retardation. These diseases are due to an impairment of sodium, potassium, chloride reabsorption caused by mutations in genes encoding for ion channel or transporters expressed in specific nephron tubule segments. Particularly, BS type 3 is a clinically heterogeneous form caused by mutations in *CLCNKB* gene which encodes the ClC-Kb chloride channel involved in NaCl reabsorption in the renal tubule. Specific therapy for BS is lacking and the only pharmacotherapy up today available is purely symptomatic and characterized by limiting side effects. The improvement of our understanding of the phenotype/genotype correlation and of the precise pathogenic mechanisms associated with BS type 3 as well as the pharmacological characterization of ClC-K chloride channels are fundamental to design therapies tailored upon patients' mutation. This mini review focused on recent studies representing relevant forward steps in the field as well as noteworthy examples of how basic and clinical research can cooperate to gain insight into the pathophysiology of this renal channelopathy, paving the way for a personalized therapy.

KEYWORDS : Bartter syndrome, ClC-K chloride channels, pharmacogenetics, rare diseases

Le sindromi di Bartter (BS tipo 1-5) rappresentano un gruppo di tubulopatie renali rare a carattere autosomico recessivo che si manifestano con fenotipi clinici parzialmente sovrapponibili caratterizzati da perdita di sali, alcalosi metabolica, ipokaliemica, poliuria, polidipsia, debolezza muscolare e ritardo della crescita. La qualità di vita dei pazienti affetti è compromessa e il tasso di ospedalizzazione è elevato. Nelle forme più severe l'aspettativa di vita è ridotta. Tali patologie sono dovute a un difetto nel riassorbimento dello ione sodio, potassio e cloro a causa di mutazioni in geni che codificano per proteine canale o trasportatori presenti in diversi tratti nel nefrone (1, 2). In particolare, la BS di tipo 3 è una canalopatia clinicamente eterogenea causata da mutazioni con perdita di funzione nel gene *CLCNKB* che codifica per il canale al cloro CLC-Kb coinvolto nel riassorbimento di NaCl (3). Mutazioni con perdita di funzione nel gene *BSND* che codifica per la subunità accessoria barttina sono responsabili della più severa forma di BS, definita di tipo 4 (4, 5). Il canale CLC-Kb è espresso con la barttina nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (TAL), nel tubulo contorto distale e nel dotto collettore, dove contribuisce al riassorbimento di ioni cloro verso il lato basolaterale delle cellule tubulari. La barttina è necessaria per la corretta espressione ed attivazione dei canali CLC-K. La perdita di funzione di CLC-Kb/barttina nel TAL, a causa di difetti di espressione o biofisici della proteina, si traduce in una minore estrusione di cloro, ridotto riassorbimento di NaCl attraverso il cotrasportatore Na-K-2Cl e ridotto riassorbimento di cationi bivalenti, tutti eventi cellulari responsabili del fenotipo Bartter (6). La BS di tipo 3 è caratterizzata da ipocloremia, segno diagnostico distintivo di tale forma di BS rispetto alle altre varianti. Il trattamento della BS è puramente sintomatico, rivolto alla correzione della disidratazione e dei disordini elettrolitici e alla riduzione dei livelli di renina e prostaglandine, e pertanto basato su supplementi di potassio e magnesio, diuretici risparmiatori di potassio, antiinfiammatori non steroidei, ACE inibitori e sartani con effetti collaterali che limitano la compliance del paziente soprattutto nel lungo periodo (2, 7).

Ad oggi, non è disponibile una terapia farmacologica mirata per tali sindromi renali. La ricerca di base e la ricerca clinica in questo campo sono pertanto orientate, da un lato, alla comprensione dei meccanismi patogenetici associati alla BS di tipo 3 e alla definizione di una correlazione genotipo/fenotipo e, dall'altro, allo sviluppo di ligandi dei canali CLC-K potenzialmente utili per un trattamento mirato di tale patologia renale. A differenza di altri canali ionici, la caratterizzazione elettrofisiologica e l'identificazione di molecole attive sul canale CLC-Kb renale è stata rallentata da difficoltà tecniche nell'espressione di questo canale ionico. Solo in tempi recenti, sono state infatti individuate le condizioni sperimentali ottimali per lo studio del canale in sistemi di espressione eterologa che garantiscono la corretta espressione, stabilità e degradazione cellulare della proteina canale (4, 8, 9).

Recentemente, diversi autori hanno contribuito in modo significativo a delucidare i meccanismi molecolari alla base della BS di tipo 3 e a correlare i difetti biofisici e di espressione dei canali mutati con i sintomi clinici descritti per i pazienti affetti da BS di tipo 3 (10–12), aprendo la strada a una terapia personalizzata (13). Cheng e collaboratori (10) hanno raccolto una casistica di pazienti omozigoti per mutazioni in *CLCNKB* con fenotipi BS di diversa severità. Quindi, combinando studi di elettrofisiologia e biochimica, gli autori hanno esaminato le conseguenze funzionali di 18 mutazioni di *CLCNKB*, valutando le variazioni di gating e di espressione proteica di ciascun canale mutato espresso in cellule di mammifero. Da questo studio è emerso che la severità del difetto funzionale delle mutazioni in *CLCNKB* è altamente correlata con la severità del fenotipo BS ed in particolare con la minore età alla diagnosi, l'elevata escrezione di calcio urinario e la ridotta concentrazione di cloruro plasmatico, che sono caratteristiche cliniche spesso utilizzate per differenziare la BS dalla sindrome di Gitelman. In parallelo, guidati dalla struttura cristallina del CmCLC eucariotico, lo stesso studio ha evidenziato che le mutazioni più severe sono localizzate nell'elica B del canale necessaria per l'interazione con la barttina, nell'interfaccia tra i due protopori e nel filtro di

selettività, tutti domini importanti per l'attività del canale.

La caratterizzazione funzionale delle mutazioni di CLC-K è fondamentale per progettare terapie specifiche per le diverse mutazioni di cui i pazienti sono portatori. Ad oggi, sono noti solo pochi ligandi dei canali CLC-K e nessun farmaco in commercio usato nella terapia della BS ha come target i canali CLC-K. L'identificazione *in vitro* di particolari cambiamenti biofisici o di difetti di espressione in membrana di proteine CLC-K mutate potrebbe indirizzare la ricerca farmacologica verso composti che funzionino come correttori del difetto di gating o facilitatori del trasporto della proteina canale in membrana. A questo scopo, sono stati fondamentali i lavori di Park e collaboratori (14) e di Louet e collaboratori (15). I primi hanno risolto la struttura di un canale CLC-K bovino che ha evidenziato una differenza critica della via di trasporto dello ione cloro tra i canali CLC-K e i trasportatori Cl⁻/H⁺ (14); i secondi hanno costruito un modello di omologia del canale CLC-Kb sulla base di tale struttura bovina e identificato residui amminoacidici importanti per la funzione del canale. Gli stessi autori hanno identificato una tasca di legame extracellulare per piccole molecole e utilizzando tecniche di docking molecolare e studi funzionali hanno identificato una serie di composti capaci di legare il canale CLC-Kb con buona affinità, tra cui diflunisal e loperamide (15). I risultati di questi due studi sono quindi essenziali per lo screening e la progettazione razionale di nuovi agenti farmacologici che agiscono sui canali CLC-K.

Attraverso la realizzazione di un vasto studio struttura-attività condotto da diversi anni nei nostri laboratori di ricerca, abbiamo identificato l'acido niflumico come unico attivatore dei canali CLC-K espressi e una serie di composti biciclici, quali per esempio i derivati benzofuranici, capaci di bloccare con affinità micromolare i canali CLC-K, e infine sviluppato un modello farmacoforico (9, 16–20). Studi farmacologici preclinici *in vivo* su roditori, ci hanno permesso, inoltre, di dimostrare che la somministrazione di alcuni derivati benzofuranici causa un effetto diuretico, a conferma della capacità di queste molecole di avere come bersaglio i canali al cloro renali, nonché di definire alcune caratteristiche farmacocinetiche e tossicologiche associate a tali molecole di nuova sintesi (21, 22).

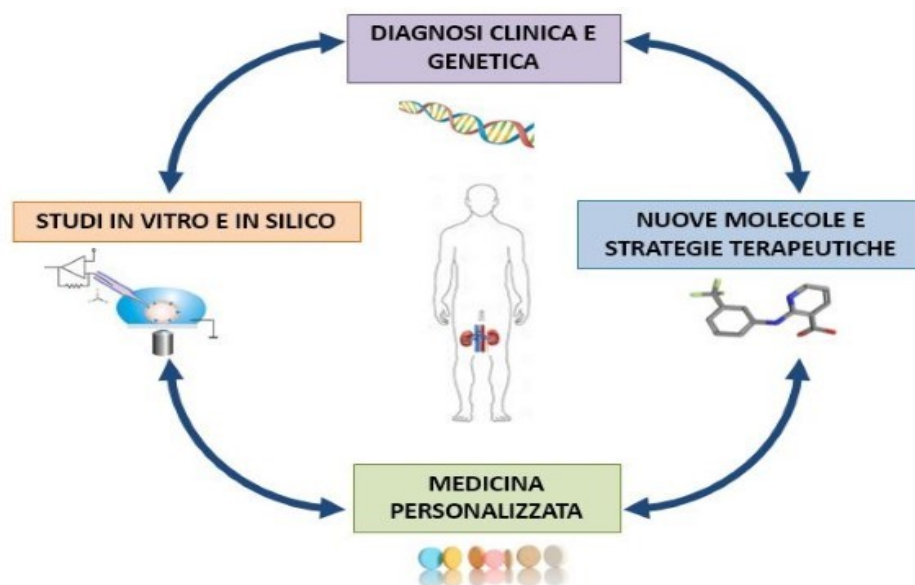
Al fine di ottimizzare la terapia dei pazienti affetti da BS di tipo 3, cercando nello stesso tempo di permettere l'uso di molecole in tempi brevi in clinica, sono in fase di studio nuove strategie farmacologiche, come il riposizionamento di farmaci in commercio, ovvero l'identificazione di farmaci attualmente in uso con altre indicazioni terapeutiche che potrebbero risultare potenzialmente utili per la terapia di BS. E' oggi infatti consolidata l'idea che il riposizionamento di farmaci già in commercio, ha notevoli vantaggi in termini di rapidità di ricerca preclinica soprattutto per le malattie rare, perché lo studio di molecole con già nota biodisponibilità e azione farmacologica negli uomini accelererebbe notevolmente il relativo uso in terapia (23, 24). A tale riguardo, recentemente, attraverso l'uso integrato di un registro di farmacovigilanza, tecniche di elettrofisiologia e di docking molecolare, abbiamo identificato molecole già in commercio capaci di legare i canali CLC-K e definito i requisiti molecolari di legame (25). In particolare, dall'analisi di un registro di farmacovigilanza (Food and Drug Administration-Adverse Effects Reporting System database), abbiamo individuato farmaci in commercio che inducono la sindrome di Bartter come effetto collaterale. Utilizzando specifici criteri di esclusione/inclusione (numero di pazienti con reazioni avverse, proprietà chimico-fisiche delle molecole, meccanismo noto di effetto Bartter-simile non correlato al blocco dei canali CLC-K), una serie di molecole quali micofenolato mofetile, quinalapril, valsartan, candesartan cilexetile e acenocumarolo sono state selezionate per i successivi test *in vitro* di valutazione dell'effetto sulle correnti sostenute dai canali CLC-K espressi in sistemi eterologhi. Il micofenolato mofetile, l'acenocumarolo e il quinalapril hanno mostrato una bassa affinità per i canali CLC-Ka, provocando un blocco delle correnti al cloro minore del 20% alla dose di 50 μ M, mentre il valsartan, alla stessa concentrazione, ha causato una riduzione delle correnti pari al 60%. L'uso delle altre isoforme di canali CLC ha permesso di dimostrare che il

blocco mediato dal valsartan è alquanto selettivo sull'isoforma CIC-Ka e richiede la presenza della barttina. Il valsartan appartiene alla classe dei sartani, farmaci antagonisti dei recettori per l'angiotensina II (recettori AT1) con azione antipertensiva. Al fine di determinare i requisiti strutturali per legare e bloccare il canale CIC-Ka, è stato valutato l'effetto di altri sartani quali losartan, telmisartan, candesartan cilexetile e olmesartan. Il valsartan e l'olmesartan, che contengono entrambi l'anello tetrazolico e il gruppo carbossilico, sono risultati i bloccanti più efficaci dei canali CIC-Ka/barttina. Attraverso studi di docking molecolare abbiamo identificato i siti di legame del valsartan e di olmesartan sui canali CIC-Ka. La deprotonazione che avviene a pH fisiologico dell'anello tetrazolico e dell'acido carbossilico garantiscono l'instaurarsi di legami con i residui K165 e N68 che rappresentano quindi il sito di legame. L'assenza di una delle due interazioni con questi residui aminoacidici, è responsabile della ridotta capacità di blocco del canale CIC-Ka associata agli altri sartani strutturalmente diversi. I risultati di questo studio possono avere anche implicazioni cliniche, escludendo l'uso di valsartan e olmesartan in pazienti che presentano già disfunzione renale.

Le molecole qui descritte, pur mostrando attività di blocco dei canali CIC-K, potrebbero avere un elevato potenziale terapeutico per il trattamento della BS di tipo 3, perché essendo dei ligandi dei canali potrebbero funzionare come *chaperone* farmacologici favorendo il "traffico" del canale verso la membrana plasmatica. Sono in corso studi *in vitro* su alcuni mutanti responsabili di BS di tipo 3, caratterizzati da una ridotta espressione in membrana, al fine di valutare mediante tecniche di elettrofisiologia e di biologia molecolare la potenziale attività di *chaperone* associata a queste molecole.

In conclusione, comprendere il background genetico e i meccanismi molecolari alla base della sindrome BS è essenziale per il disegno di approcci terapeutici mirati per i pazienti affetti da tale patologia genetica (Figura 1).

Figura 1.



Interazione tra ricerca di base e ricerca clinica per l'identificazione di terapie personalizzate.

A tal proposito, i recenti lavori qui citati rappresentano esempi di proficua interazione tra la ricerca di base e la ricerca clinica con l'obiettivo di sviluppare una medicina di precisione e personalizzata per il trattamento di questa canalopatia renale ereditaria.

BIBLIOGRAFIA

- Krämer BK, Bergler T, Stoelcker B, Waldegger S. Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels CLCKA and CLCKB, the Barttin subunit, and their clinical relevance. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4:38-46.
- Loudon KW, Fry AC. The renal channelopathies. *Ann Clin Biochem* 2014; 51:441-458.
- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* 1997; 17:171-178.
- Estévez R, Boettger T, Stein V, Birkenhäger R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ. Barttin is a Cl⁻ channel beta subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* 2001; 414: 558–561.
- Birkenhäger R, Otto E, Schürmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, et al. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001; 29:310–314.
- Fahlke C, Fischer M. Physiology and pathophysiology of CLC-K/barttin channels. *Front Physiol* 2010; 1:155.
- Bhat YR, Vinayaka G, Sreelakshmi K. Antenatal bartter syndrome: a review. *Int J Pediatr* 2012; 2012:857136.
- Scholl U, Hebeisen S, Janssen AG, Müller-Newen G, Alekov A, Fahlke C. Barttin modulates trafficking and function of CLC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(30):11411-6.
- Imbrici P, Liantonio A, Gradogna A, Pusch M, Camerino DC. Targeting kidney CLC-K channels: pharmacological profile in a human cell line versus *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838:2484-2491.
- Cheng CJ, Lo YF, Chen JC, Huang CL, Lin SH. Functional severity of CLCNKB mutations correlates with phenotypes in patients with classic Bartter's syndrome. *J Physiol* 2017; 595(16):5573-5586.
- Seys E, Andrini O, Keck M, Mansour-Hendili L, Courand PY, Simian C, Deschenes G, Kwon T, Bertholet-Thomas A, Bobrie G, Borde JS, Bourdat-Michel G, Decramer S, Cailliez M, Cozette P, Delbet JD, Dubourg L, Chaveau D, Fila M, Jourde-Chiche N, Knebelmann B, Lavocat MP, Lemoine S, Djeddi D, Llanas B, Louillet F, Merieau E, Mileva M, Mota-Vieira L, Mousson C, Nobili F, Novo R, Roussey-Kesler G, Vrillon I, Walsh SB, Teulon J, Blanchard A, Vargas-Poussou R. Clinical and Genetic Spectrum of Bartter Syndrome Type 3. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(8):2540-2552.
- Andrini O, Keck M, Briones R, Lourdel S, Vargas-Poussou R, Teulon J. CLC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 308(12):F1324-34.
- Imbrici P, Conte D, Liantonio A. Paving the way for Bartter syndrome type 3 drug discovery: a hope from basic research. *J Physiol* 2017;595(16):5403-5404.
- Park E, Campbell EB, MacKinnon R. Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature* 2017; 541(7638):500-505.
- Louet M, Bitam S, Bakouh N, Bignon Y, Planelles G, Lagorce D, Miteva MA, Eladari D, Teulon J, Villoutreix BO. In silico model of the human CLC-Kb chloride channel: pore mapping, biostructural pathology and drug screening. *Sci Rep* 2017; 7(1):7249.
- Liantonio A, Pusch M, Picollo A, Guida P, De Luca A, Pierno S, et al. Investigations of pharmacologic properties of the renal CLC-K1 chloride channel co-expressed with barttin by the use of 2-(p-Chlorophenoxy)propionic acid derivatives and other structurally unrelated chloride channels blockers. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:13-20.
- Picollo A, Liantonio A, Didonna MP, Elia L, Conte D, Pusch M. Molecular determinants of differential pore blocking of kidney CLC-K chloride channels. *EMBO Rep* 2004; 5: 584-589.
- Liantonio A, Picollo A, Babini E, Carbonara G, Fracchiolla G, Loiodice F, et al (2006) Activation and inhibition of kidney CLC-K chloride channels by fenamates. *Mol Pharmacol* 69:165-173.
- Liantonio A, Picollo A, Carbonara G, Fracchiolla G, Tortorella P, Loiodice F, et al (2008) Molecular switch for CLC-K Cl⁻ channel block/activation: optimal pharmacophoric requirements towards high affinity ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1369-1373.
- Gradogna A, Imbrici P, Zifarelli G, Liantonio A, Camerino DC, Pusch M (2014) I-J loop involvement in the pharmacological profile of CLC-K channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1838:2745-2756.
- Liantonio A, Gramegna G, Camerino GM, Dinardo MM, Scaramuzzi A, Potenza MA, et al. In-vivo administration of CLC-K kidney chloride channels inhibitors increases water diuresis in rats: a new drug target for hypertension? *J Hypertens* 2012; 30:153-167.
- Liantonio A, Imbrici P, Camerino GM, Fracchiolla G, Carbonara G, Giannico D, Gradogna A, Mangiatordi GF, Nicolotti O, Tricarico D, Pusch M, Camerino DC. Kidney CLC-K chloride channels inhibitors: structure-based studies and efficacy in hypertension and associated CLC-K polymorphisms. *J Hypertens* 2016; 34:981-92.
- Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today* 2011; 16(7-8): 298-310
- Bellomo F, Medina DL, De Leo E, Panarella A, Emma F. High-content drug screening for rare diseases. *J Inherit Metab Dis* 2017; 40(4): 601-607.
- Imbrici P, Tricarico D, Mangiatordi GF, Nicolotti O, Lograno MD, Conte D, Liantonio A. Pharmacovigilance database search discloses CLC-K channels as a novel target of the AT1 receptor blockers valsartan and olmesartan. *Br J Pharmacol* 2017; 174(13):1972-83.