

ARTICOLI ORIGINALI

Malattie renali associate ad uromodulina (o proteina di Tamm-Horsfall)



Martina Brunati, Luca Rampoldi

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

Corrispondenza a: Luca Rampoldi; Unità di Genetica Molecolare delle Malattie Renali, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Via Olgettina 58, 20132 Milano, Italia.; Tel:+39 0226434947 Fax:+39 0226434767 Mail: rampoldi.luca@hsr.it

Abstract

L'uromodulina è la più abbondante proteina secreta nelle urine in condizioni fisiologiche. È espressa esclusivamente nel rene dalle cellule tubulari epiteliali del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle del nefrone e localizzata prevalentemente sulla membrana plasmatica apicale, dalla quale viene rilasciata mediante un taglio proteolitico. La sua funzione biologica non è ancora chiarita, ma sembra avere un ruolo nella protezione dalle infezioni delle vie urinarie e dalla formazione di calcoli renali, nella regolazione dell'assorbimento renale di sale e nella modulazione dell'immunità innata del rene.

Mutazioni a carico del gene *UMOD*, che codifica per l'uromodulina, causano rare malattie a trasmissione autosomica dominante, collettivamente denominate 'malattia renale associata ad uromodulina', caratterizzate da progressivo danno tubulo-interstiziale, iperuricemia, cisti renali ed insufficienza renale. Recenti studi di associazione *genome-wide* hanno identificato l'uromodulina come un fattore di rischio per la malattia renale cronica e l'ipertensione. Le varianti del gene *UMOD* associate a maggior rischio sono comuni in tutte le popolazioni studiate e determinano una maggior espressione e secrezione urinaria della proteina.

Parole chiave: ipertensione, malattia renale associata ad uromodulina, malattia renale cronica, proteina di Tamm-Horsfall, Uromodulina

Kidney diseases associated with uromodulin (Tamm-Horsfall protein)

Uromodulin is the most abundant protein excreted in the urine under physiological conditions. It is exclusively expressed in the kidney by epithelial cells lining the thick ascending limb of Henle's loop. It is mainly localized at the apical plasma membrane of tubular cells and released through a proteolytic cleavage. Although its function is still elusive it is proposed to have a protective role against urinary tract infection and kidney stone formation, in ion transport and in kidney innate immunity.

*Mutations in the gene *UMOD* encoding uromodulin lead to rare autosomal dominant diseases, collectively referred to as 'uromodulin-associated kidney disease', that are characterized by progressive tubulo-interstitial damage, impaired urinary concentrating ability, hyperuricemia, and progressive renal failure. Recently, genome-wide association studies identified uromodulin as a risk factor for chronic kidney disease and hypertension. Risk variants in the *UMOD* gene are common in all studied populations and are associated with higher expression and urinary level of the protein.*

Key words: chronic kidney disease, hypertension, Tamm-Horsfall protein, Uromodulin, uromodulin-associated kidney disease

Scoperta dell'uromodulina

La proteina di Tamm-Horsfall (THP) costituisce la proteina più abbondante nelle urine in condizioni fisiologiche, con un tasso di secrezione di 50-100 mg al giorno [1] [2]. Venne scoperta nel 1950 da Tamm e Horsfall (perciò il nome THP), che isolarono dalle urine una mucoproteina in grado di inibire l'emoagglutinazione virale [3]. Nel 1985 Muchmore e Decker purificarono una glicoproteina dalle urine di donne gravide e la denominarono uromodulina, poiché mostrava una potente attività immunosoppressiva [4]. Due anni più tardi, uno studio sulle sequenze di cDNA dimostrò che uromodulina e THP erano in realtà la stessa proteina [5]. Per chiarezza nel resto del testo si farà riferimento alla proteina come "uromodulina".

Proprietà biochimiche e struttura

L'uromodulina è una glicoproteina di 105 kDa specifica del rene, espressa esclusivamente dalle cellule tubulari epiteliali del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (TAL) del nefrone [6] (Figura 1a).

È localizzata prevalentemente sulla membrana plasmatica apicale delle cellule del TAL, anche se è stata riportata una sua localizzazione sulla membrana basolaterale delle stesse cellule. Studi sul traffico intracellularare in cellule epiteliali polarizzate e la presenza di uromodulina a basse concentrazioni nel circolo sanguigno sembrano avvalorare un suo trasporto e rilascio basolaterale [7] (full text).

La composizione in domini di uromodulina comprende un peptide segnale, fondamentale per l'ingresso della proteina nella via secretoria della cellula, tre domini EGF-like (*Epidermal Growth Factor*), dei quali l'EGF-II e l'EGF-III in grado di legare il calcio, presumibilmente coinvolti in interazioni proteina-proteina, un dominio centrale a funzione non nota denominato D8C (poiché contiene 8 residui conservati di cisteina), un dominio zona pellucida (ZP) importante per la polimerizzazione della proteina [8] e un sito di attacco per l'ancora di glicosifosfatidilinositol (GPI) (residuo 614) (2) (Figura 1a). L'uromodulina viene sintetizzata a partire da un precursore di 640 amminoacidi. La generazione della forma matura prevede l'ingresso del precursore nella

via secretoria della cellula. Qui il peptide segnale viene rimosso, la proteina viene glicosilata, si formano i ponti disolfuro e il C-terminale viene tagliato per essere legato all'ancora GPI. La maturazione di uromodulina risulta un passaggio molto lungo dovuto alla complessa struttura terziaria che la proteina deve raggiungere. I 48 residui di cisteina della proteina (7% del suo contenuto aminoacidico) devono infatti formare 24 ponti disolfuro intramolecolari [9] e la proteina deve subire una significativa N-glicosilazione che contribuisce per il 30% del suo peso molecolare. La presenza di un così alto contenuto di glicani (sono anche riportate evidenze di O-glicosilazione [10] (full text)) è importante per la funzione e per le proprietà chimico-fisiche della proteina (vedi paragrafo successivo). L'uromodulina matura viene poi trasportata alla membrana plasmatica delle cellule epiteliali e viene inserita nel lato luminale della membrana. Da qui la proteina viene secreta nel fluido tubulare mediante un taglio proteolitico conservato [11]. Nelle urine l'uromodulina forma polimeri ad alto peso molecolare ($Mr 1-10 \times 10^6$), visibili al microscopio elettronico come una matrice composta da fibrille con uno spessore di circa 100 Å e una lunghezza media di 25,000 Å. A seconda delle condizioni ioniche, questa matrice può formare strutture simili a un gel che risultano impermeabili all'acqua ma che permettono il passaggio di ioni [12]. La polimerizzazione di uromodulina è mediata dal dominio ZP, un modulo conservato identificato in diverse proteine extracellulari che formano filamenti o matrici, tra cui le proteine che compongono la zona pellucida dell'oocita ZP1, ZP2 e ZP3 e le componenti della membrana tectoriale α - e β -tectorina [13]. Il meccanismo con cui il dominio ZP regola la polimerizzazione di queste proteine è stato identificato [14] (full text) [15] (full text) e dimostrato essere conservato anche in uromodulina [16] (full text). Due sequenze idrofobiche conservative, una localizzata all'interno del dominio ZP, e l'altra tra il sito di taglio proteolitico ed il sito di ancoraggio alla membrana, interagiscono tra loro mantenendo il dominio ZP in una conformazione chiusa. Questo blocco impedisce alla proteina di polimerizzare intracellularmente. Una volta raggiunta la membrana, il taglio proteolitico C-terminale rilascia l'interazione tra i due moduli idrofobici. Questo permette al dominio ZP di

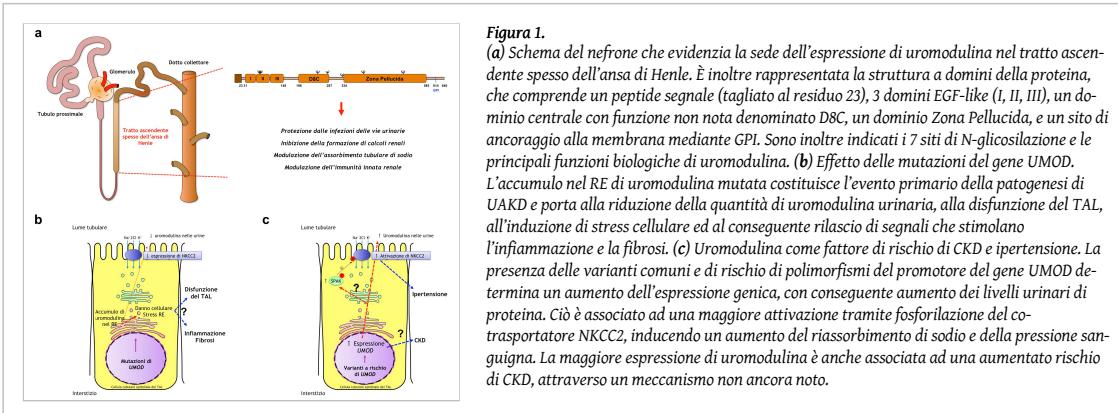
assumere una conformazione aperta, che consente alla proteina di polimerizzare extracellularmente.

Funzioni biologiche

Nonostante l'uromodulina sia nota da più di 60 anni, le sue funzioni biologiche restano ancora poco chiare e la maggior parte di esse sono state predette sulla base della struttura primaria della proteina, della sua localizzazione, da esperimenti in vitro ed analizzando il fenotipo degli animali *knock-out* per uromodulina.

Le proprietà di gelificazione di uromodulina e le sue caratteristiche fisico-chimiche [12] suggeriscono un suo coinvolgimento nella funzione di regolazione del bilancio del sodio e dell'acqua nel TAL. L'espressione di uromodulina risulta aumentata in presenza di una dieta ad alto contenuto di sale e di somministrazione cronica del diuretico dell'ansa furosemide [17] (full text). Inoltre, è stata descritta una sua aumentata secrezione urinaria dipendente dall'assorbimento di sodio [18]. Evidenze più dirette derivano da due lavori che dimostrano in vivo un ruolo chiave dell'uromodulina nella regolazione dell'attività di ROMK e NKCC2, i due trasportatori ionici più importanti della membrana apicale delle cellule epiteliali di questo segmento del nefrone. L'assenza di uromodulina in vivo risulta infatti associata ad un difetto di trasporto alla membrana apicale dei due trasportatori ed a una loro diminuita attività [19] (full text) [20] (full text). Evidenze più recenti confermano l'importanza del ruolo di uromodulina nell'assorbimento di sale nel TAL, con importanti implicazioni per l'ipertensione arteriosa (vedi sotto).

Studi in vitro e su modelli murini *knock-out* per il gene *Umod* (*Umod*^{-/-}), che codifica per uromodulina, attribuiscono a questa proteina un duplice ruolo protettivo contro le infezioni delle vie urinarie e contro la formazione di calcoli renali. Negli animali *Umod*^{-/-} si osserva infatti una maggior colonizzazione della vescica rispetto a topi di controllo dopo inoculo intra-vescica di *E. coli* fimbriati di tipo 1 [21] [22] (full text). Ciò dipende dalla capacità di uromodulina di legare direttamente patogeni del tratto urinario tramite i propri residui di mannosio. Uromodulina si comporta quindi come un recettore solubile, formando un rivestimento sulle adesine batteriche che



compete con il legame alle uroplakine delle cellule uroteliali, facilitando l'eliminazione dei patogeni dal tratto urinario [23] (full text).

Studi in vitro complementati da indagini in vivo hanno dimostrato che l'uromodulina è in grado di ridurre l'aggregazione di cristalli di calcio. Grover *et al* hanno dimostrato che la frazione urinaria con la più alta concentrazione di uromodulina polimerica è responsabile dell'inibizione dell'attacco dei cristalli di ossalato di calcio monoidrato a cellule renali [24] (full text). Tale effetto sembra essere mediato dal legame diretto di uromodulina ai cristalli. Inoltre, la mancanza di uromodulina nel modello *Umod*^{-/-} dà luogo alla formazione spontanea di cristalli di calcio intra-renali e alla progressiva calcificazione renale [25] (full text). L'azione inibitoria di uromodulina sulla formazione di cristalli di calcio sembra essere sinergica con quella esercitata da un'altra proteina urinaria, osteopontina [26] (full text) [27].

Nonostante sia supportata da numerose evidenze in vivo, l'importanza dell'uromodulina come molecola protettiva contro le infezioni del tratto urinario e contro la nefrolitiasi, è ancora controversa. Infatti, individui con livelli urinari dell'uromodulina estremamente ridotti, come nel caso di pazienti con mutazioni nel gene *UMOD* (vedi paragrafo seguente), non mostrano un aumento delle infezioni del tratto urinario e della formazione di calcoli renali. Inoltre, non ci sono ad oggi evidenze da studi di popolazione che identifichino un'associazione del gene *UMOD* con maggiore predisposizione a infezioni del tratto urinario. Il ruolo protettivo dell'uromodulina nei confronti dello sviluppo di calcoli renali è invece avvalorato da uno studio di associazione *genome-wide* (GWAS) [28] (full text).

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che l'uromodulina abbia importanza nell'immunità innata del rene. Tuttavia l'esatto ruolo di questa proteina resta ancora enigmatico, poiché sono state descritte sia una sua funzione pro- che anti-infiammatoria.

Il ruolo pro-infiammatorio è suggerito dalla capacità di uromodulina di legare in vitro molecole infiammatorie, quali IL-1, IgG, il fattore 1q del complemento e TNF-alfa [29] [30] (full text) [31] (full text), e cellule dell'immunità innata, quali monociti, neutrofili [32] e cellule dendritiche mieloidi [33], inducendone l'attivazione. Un ruolo pro-infiammatorio dell'uromodulina è anche supportato dall'osservazione che la somministrazione intravenosa di uromodulina provoca infiammazione sistematica e produzione di anticorpi anti-uromodulina [33]. Inoltre, nanoparticelle di uromodulina attivano l'inflammasoma nei monociti umani, portando al rilascio di IL-1 β e a morte cellulare [34] (full text).

In apparente contraddizione con gli studi appena descritti, recenti evidenze sperimentali ottenute in vivo suggeriscono un ruolo anti-infiammatorio di uromodulina. La mancanza della proteina in un modello murino sottoposto a danno renale da ischemia-

riperfusione causa, infatti, un'infiammazione più grave, un'aumentata formazione di *casts* intratubulari ed un peggioramento della funzionalità renale [35] (full text). Tale effetto sembra essere dipendente dalla rilocalizzazione e dal rilascio di uromodulina dalla membrana basolaterale delle cellule del TAL [36] (full text). L'uromodulina esercita inoltre un ruolo protettivo in vivo, interagendo con le citochine urinarie per promuovere la loro eliminazione sistemica ed evitare una loro attivazione dell'epitelio [37] (full text).

Le evidenze appena descritte suggeriscono che il duplice ruolo di uromodulina possa essere controllato dalla sua precisa localizzazione. La proteina agirebbe da nefroprotettore quando confinata nei tubuli, e come DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) endogeno pro-infiammatorio quando dislocata nell'interstizio renale, in seguito a condizioni che alterano l'integrità tubulare [38].

Malattie renali associate a mutazioni del gene *UMOD*

Mutazioni a carico del gene *UMOD* sono state identificate come causali nella malattia cistica della midollare di tipo 2 (MCKD2; MIM 603860), nella nefropatia familiare iperuricemica giovanile (FJHN; MIM 162000) [39] (full text) e nella glomerulocisti con iperuricemia (GCKD; MIM 609886) [40] (full text). Queste entità cliniche sono oggi raggruppate sotto il termine di malattia renale associata ad uromodulina (*Uromodulin-Associated Kidney Disease*, UAKD). UAKD è una malattia genetica rara a trasmissione autosomica dominante ed ha una prevalenza stimata di circa 1/100.000 (www.orphanet.org). La malattia è caratterizzata da difetto della capacità di concentrazione delle urine, iperuricemia, gotta e progressiva insufficienza renale. Il quadro istologico mostra un danno tubulo-interstiziale con atrofia tubulare, ispessimento della lamina basale dell'epitelio, fibrosi interstiziale ed infiltrato infiammatorio [41]. Le cisti renali sono raramente presenti e prevalentemente localizzate alla giunzione cortico-midollare [42] (full text) [43] (full text). Sebbene la UAKD mostri una certa etereogeneità in termini di età di esordio, quadro clinico e presenza di cisti, essa evolve invariabilmente verso l'insufficienza renale cronica (*Chronic Kidney Disease*, CKD) nel corso della terza-quinta decade di vita [43] (full text). Non c'è ad oggi una terapia specifica per UAKD, ma piuttosto sintomatologica. L'iperuricemia ad esempio può essere trattata con una certa efficacia con allopurinolo [44] o con farmaci ad azione uricosurica come il benzbromarone [45].

Ad oggi, sono state descritte più di 100 mutazioni di *UMOD*. Tutte, ad eccezione di tre delezioni *in-frame*, sono mutazioni missenso localizzate quasi esclusivamente nella metà N-terminale della proteina. Circa la metà delle mutazioni riportate sono a carico di uno dei 48 residui di cisteina. L'effetto predetto per la maggior parte delle mutazioni di uromodulina è quello di causare un difetto del *folding* della proteina, o perché causano direttamente la rottura di uno dei

ponti disolfuro, o perché destabilizzano la struttura dei domini EGF-like.

Studi in vitro

Studi in vitro eseguiti in diverse linee cellulari hanno confermato l'effetto predetto delle mutazioni di *UMOD* dimostrando che le isoforme mutate di uromodulina hanno un difetto di trasporto verso la membrana plasmatica, e sono in gran parte trattenute nel reticolo endoplasmatico (RE) [40] (full text) [46] [47]. Questi risultati sono in accordo con le osservazioni ricavate dall'analisi delle biopsie renali dei pazienti con UAKD che mostrano la presenza di grossi aggregati intracellulari di uromodulina nelle cellule del TAL, considerati un tratto caratteristico della malattia [40] (full text) [42] (full text). L'indagine ultrastrutturelle mostra l'accumulo di materiale fibrillare o amorfio all'interno delle cisterne del RE che appaiono dilatate o iperplastiche [41]. Il difetto di trasporto intracellulare di uromodulina mutata determina una drammatica riduzione della quantità di proteina nelle urine dei pazienti UAKD. Tale riduzione non è correlata con la funzione renale e suggerisce un possibile effetto dominante negativo sulla secrezione della proteina *wild type* [42] (full text). Nel loro insieme questi dati indicano che la ritenzione dell'uromodulina mutata nel RE sia un evento centrale nella patogenesi della malattia e consentono di annoverare UAKD tra le numerose malattie da accumulo proteico [48].

È interessante notare come gli studi effettuati in modelli cellulari abbiano mostrato che le mutazioni di *UMOD* possono essere classificate in due classi, sulla base del grado del difetto di trasporto intracellulare della proteina mutata. Non sembra però esserci una chiara correlazione tra la tipologia di mutazione, considerando sostituzioni a carico di cisteine o di amino acidi polari, e la gravità della malattia [43] (full text). Piuttosto, i dati riportati da Moskowitz *et al.*, che mostrano un'età di insorgenza dell'insufficienza renale cronica minore in portatori di mutazioni più vicine all'N-terminale della proteina, rispetto a portatori di mutazioni più distali, sembrano suggerire che la posizione della mutazione possa essere importante per prevedere il decorso della malattia [49] (full text). Ulteriori studi in questa direzione su casistiche più numerose saranno necessari per verificare tale correlazione.

Sebbene i modelli cellulari abbiano consentito di identificare un comune effetto delle mutazioni di uromodulina, non ci sono dati conclusivi che dimostrino quali siano le conseguenze a livello cellulare dell'espressione di uromodulina mutata. Recentemente abbiamo dimostrato che parte della proteina mutata sfugge ai meccanismi di controllo del RE e viene trasportata alla membrana, dove tende a formare aggregati sulla superficie cellulare e nel lume tubulare che intrappolano la proteina *wild type* e ne impediscono la polimerizzazione in filamenti polimerici. Ciò suggerisce che le mutazioni di uromodulina possano avere un effetto dominante negativo riducendo il trasporto intracellulare ed alte-

rando la struttura della proteina *wild type* [50]. Alcuni studi in modelli cellulari hanno inoltre mostrato che l'espressione di uromodulina mutata porta a morte cellulare mediante apoptosi, un effetto che può essere recuperato trattando le cellule con colchicina o con la *chaperone* chimica fenilbutirrato di sodio [51] (full text) [52] (full text). Tuttavia tale effetto non è stato osservato in studi in cui sono stati usati modelli cellulari diversi, sia in condizioni basali che di stress cellulare [7] (full text). Dal momento che i modelli cellulari studiati sino ad oggi sono stati sviluppati in cellule che non esprimono uromodulina endogena, sembra necessario utilizzare cellule differenziate del TAL per valutare precisamente quali siano le conseguenze dell'espressione di uromodulina a livello cellulare.

Studi in vivo

Sono stati riportati e caratterizzati due modelli murini *knock-out* per uromodulina [21] [22] (full text). Come precedentemente descritto, tali modelli risultano maggiormente suscettibili alle infezioni del tratto urinario e alla formazione di calcoli renali e nefrocalcinosi. Tuttavia gli animali *Umod*^{-/-} mostrano pochi segni di UAKD, quale un lieve difetto di concentrazione urinaria dopo test di depravazione idrica, che potrebbe essere dovuto a un difetto nella capacità di riassorbimento del TAL [53] (full text). Come precedentemente discusso, a supporto di tale ipotesi, dati recenti hanno mostrato una riduzione della quantità del canale ROMK in membrana in questi animali, ed un suo aumento nel pool vescicolare [19] (full text). Tali modelli non sviluppano insufficienza renale né fibrosi interstiziale e cisti renali, e non presentano infiltrato infiammatorio fino ai 3 anni di età [54].

Il nostro laboratorio ha generato e caratterizzato un modello in vivo di UAKD, ovvero una linea murina transgenica esprimente l'uromodulina mutata (*Tg^{UmodC147W}*) [55] (full text). La mutazione introdotta nella proteina murina (C147W) corrisponde alla mutazione umana C148W precedentemente identificata nei pazienti e caratterizzata in vitro [40] (full text). Il fenotipo dei topi *Tg^{UmodC147W}* è stato confrontato con quello di topi transgenici con paragonabile overespressione della proteina *wild type* (*Tg^{Umodwt}*). I topi *Tg^{UmodC147W}* mostrano segni progressivi di danno renale, con fibrosi tubulo-interstiziale, presenza di infiltrato infiammatorio, dilatazione e atrofia tubulare. È interessante notare che non si osserva aumentata apoptosi delle cellule del tubulo distale in questi animali, anche in fasi avanzate della malattia, ma piuttosto segni di necrosi cellulare. Come osservato nei pazienti UAKD [41], la progressione del danno tubulo-interstiziale nei topi *Tg^{UmodC147W}* è caratterizzata da un progressivo aumento dell'infiltrato infiammatorio, che è principalmente composto da granulociti e macrofagi. Analogamente ai pazienti UAKD, i topi *Tg^{UmodC147W}* hanno difetti di concentrazione urinaria di origine renale, con poliuria, polidipsia e ridotta osmolarità urinaria, segni

presenti già in animali giovani e che precedono l'insufficienza renale. La ridotta capacità di concentrazione urinaria dei topi mutati è presente nonostante normali livelli e reattività della vasopressina e delle proteine coinvolte nella via di risposta a tale ormone, ed è probabilmente dovuta ad una disfunzione del TAL. Infatti, i topi $Tg^{UmodC147W}$ sono caratterizzati da una ridotta espressione di NKCC2, ROMK, CLC-Kb, la cui attività determina la formazione di un interstizio ipertonico che è necessario per concentrare le urine. L'accumulo di uromodulina nel RE delle cellule del TAL precede tutti gli altri sintomi ed è già presente in animali di una settimana di età, costituendo l'evento primario della patogenesi della malattia renale.

Due ulteriori modelli di UAKD sono stati ottenuti per mutagenesi con trattamento con Etil-Nitrosurea (ENU), esprimendo le varianti di uromodulina A227T e C93F ($Umod^{A227T}$ e $Umod^{C93F}$) [56] (full text) [57] (full text) [58] (full text). Sebbene tali mutazioni non siano state ad oggi descritte in pazienti UAKD, esse causano probabilmente un effetto simile, dal momento che i topi $Umod^{A227T}$ e $Umod^{C93F}$, analogamente ai topi $Tg^{UmodC147W}$, mostrano aggregazione di uromodulina in membrane espanso e dilatate del RE. Anche questi modelli sviluppano un difetto di concentrazione delle urine, riduzione della frazione escreta di acido urico, ed un progressivo danno tubulo-interstiziale con quadro fibrotico-infiammatorio. Sia i topi $Umod^{A227T}$ che $Umod^{C93F}$ mostrano anche alterazioni metaboliche, con ridotto peso corporeo, ridotti livelli di trigliceridi e colesterolo, ed osteopenia, probabilmente come conseguenza di ipercalciuria cronica. Sembra probabile che il fenotipo aggiuntivo dei modelli ENU rispetto al modello $Tg^{UmodC147W}$ possa essere dovuto al diverso *background* genetico (C3H e FVB rispettivamente). Al momento non è chiaro quale sia la rilevanza clinica di tale difetto metabolico.

Complessivamente gli studi nei modelli murini consentono di stabilire che l'effetto delle mutazioni di uromodulina è principalmente di tipo *gain of function*. A questo proposito, è interessante notare come il confronto dei due modelli ENU evidenzi un fenotipo significativamente più severo per il topo $Umod^{C93F}$, che esprime un'isoforma mutata maggiormente trattenuata nel RE, rispetto al topo $Umod^{A227T}$ [57] (full text). Dal momento che i topi $Umod^{-/-}$ mostrano un difetto di concentrazione delle urine, pensiamo che una componente *loss of function* non possa essere esclusa, probabilmente dovuta all'effetto dominante negativo della proteina mutata sul trasporto e la polimerizzazione della proteina *wild type*.

Sulla base della conoscenza attuale ipotizziamo un modello di patogenesi di UAKD che veda come evento primario la ritenzione nel RE di uromodulina mutata (Figura 1b). Ciò determina un danno strutturale e funzionale del TAL che potrebbe essere alla base del difetto di concentrazione delle urine e

dell'iperuricemia, probabilmente secondaria ad una maggiore attivazione del trasporto di sodio nel tubulo prossimale, con un meccanismo simile a quanto osservato in seguito a somministrazione di diuretici dell'ansa [48]. Il processo infiammatorio-fibrotico, che sembra avere un ruolo fondamentale nel danneggiare progressivamente l'organo e la funzione renale, potrebbe essere attivato da *pathway* di stress del RE, come suggerito da recenti dati che mostrano l'attivazione di NFkB nelle cellule epiteliali del TAL nei modelli ENU [59] (full text).

La disponibilità di modelli murini che riproducono le caratteristiche principali della malattia sarà di fondamentale importanza per caratterizzare ulteriormente i meccanismi alla base della patogenesi di UAKD e per validare possibili approcci terapeutici. A questo proposito, sembra importante osservare come il trattamento con fenilbutirrato di sodio, che ha dato risultati interessanti nei modelli cellulari, si sia rivelato del tutto inefficace nei modelli ENU [59] (full text).

L'uromodulina come fattore di rischio di malattia renale cronica e ipertensione

L'attenzione della ricerca scientifica su uromodulina è ulteriormente cresciuta negli ultimi anni grazie al lavoro di Kottgen *et al*, che ha identificato varianti comuni nel gene *UMOD* associate al tasso di velocità di filtrazione glomerulare stimato (*estimated Glomerular Filtration Rate*, eGFR) ed al rischio di insorgenza di malattia renale cronica (CKD) [60]. In uno studio di associazione *genome-wide* condotto su circa 20.000 individui di discendenza europea da popolazioni del consorzio CHARGE, gli autori hanno identificato un polimorfismo del singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (rs12917707) situato a 3.6 kb a monte del gene *UMOD*. L'allele minore T di questo SNP è associato con il 20% di riduzione del rischio di CKD, e l'associazione è indipendente dai principali fattori di rischio di malattia renale, tra cui età avanzata, sesso maschile, e presenza di ipertensione o diabete. Questi risultati sono stati replicati da uno studio simile effettuato su una popolazione islandese [28] (full text) e da altri lavori su popolazioni ed isolati genetici di origine europea [61] [62] (full text). In tutti questi lavori una seconda variante del gene *UMOD*, rs4293393, è stata associata a funzione renale e rischio di CKD. Anche questo SNP è localizzato nel promotore del gene *UMOD*, 550 bp a monte del sito di inizio della trascrizione, ed è in completo *Linkage Disequilibrium* (LD) con la variante rs12917707. Uno studio di associazione caso-controllo ha inoltre dimostrato che un altro SNP, rs13333226, anch'esso nel promotore del gene *UMOD* e nello stesso blocco di LD, è associato a rischio di ipertensione e malattia cardiovascolare [63] (full text). Come nel caso delle varianti di *UMOD* associate a CKD e funzione renale, la presenza dell'allele minore G della variante rs13333226 è associata ad un effetto protettivo. L'associazione di *UMOD* con ipertensione sembra essere indipendente e rimane inalterata dopo correzione per eGFR [63] (full

text). È da notare che due studi di associazione hanno rilevato come le varianti di *UMOD* associate a maggior rischio di CKD abbiano chiaramente un effetto dipendente dall'età, significativamente maggiore dopo i 65 anni [28] (full text) [64] (full text).

Per capire quale fosse l'effetto biologico delle varianti di *UMOD* associate a CKD, Kottgen *et al* hanno condotto uno studio caso-controllo e dimostrato che i livelli di uromodulina nelle urine degli individui portatori delle varianti rischio di *UMOD* erano significativamente più alti rispetto agli individui portatori delle varianti protettive, con un livello intermedio negli eterozigoti [65] (full text). Gli stessi autori, tramite un lavoro di sequenziamento dell'intero gene *UMOD*, hanno anche escluso la possibile presenza di altre varianti genetiche in LD con quelle presenti nel promotore [66] (full text). Questi dati suggeriscono quindi che le varianti identificate nei diversi GWAS abbiano un effetto sull'escrezione urinaria di uromodulina e che tale effetto determini un maggior rischio di CKD e ipertensione. Ciò è stato confermato in un lavoro di meta-analisi su 10.884 individui di origine europea che dimostra come i livelli urinari di uromodulina siano associati in modo significativo ($P = 7.85E-73$) con la variante rs12917707 [67] (full text). Ciascuna copia dell'allele G di tale SNP, associata con aumentato rischio di CKD nel lavoro di Kottgen *et al*, risulta associata con maggiori livelli di uromodulina urinaria.

Recentemente abbiamo dimostrato quali siano le basi biologiche dell'associazione genetica di *UMOD* con CKD e ipertensione [68]. Infatti, abbiamo dapprima dimostrato che le varianti a rischio nel promotore del gene *UMOD* degli SNPs rs12917707 e rs4293393 sono associate ad un'aumentata attività trascrizionale del promotore in vitro e in vivo (Figura 1c). Per riprodurre e valutare l'effetto della maggiore espressione dell'uromodulina in un modello in vivo, abbiamo quindi utilizzato un modello murino eterozigote ed uno omozigote per un transgene dell'uromodulina *wild type* (*Tg^{Umodwt}* e *Tg^{Umodwt/wt}*). Questi animali

hanno un aumento di espressione del gene *Umod* rispetto agli animali di controllo che è paragonabile a quanto osservato in individui con diverso genotipo. Gli animali che sovraesprimono l'uromodulina sviluppano ipertensione sale-sensibile dimostrando una relazione causale tra l'effetto delle varianti rischio (maggiore espressione di *UMOD*) e l'aumento della pressione sanguigna. Questo effetto dipende dalla maggiore attivazione nel TAL del co-trasportatore sodio-cloro-potassio (NKCC2) ad opera della chinasi SPAK. La maggiore attivazione di NKCC2 è dimostrata dalla maggiore natriuresi e calo di pressione sanguigna osservato nei topi transgenici rispetto agli animali di controllo dopo somministrazione in acuto di furosemide, noto inibitore di NKCC2. Questo interessante meccanismo sembra avere importanza anche per l'ipertensione in uomo, dal momento che la somministrazione di furosemide è risultata essere efficace nel ridurre la pressione solo in individui ipertesi omozigoti per le varianti rischio di uromodulina. È interessante notare che i topi transgenici mostrano anche segni di danno renale (dilatazione tubulare, presenza di aggregati proteici nel lume tubulare) dipendenti dall'età e visibili solo nell'animale anziano (dopo i 16 mesi di età). Analogamente abbiamo osservato una maggiore frequenza di simili lesioni all'analisi istologica di tessuto renale di individui sopra i 65 anni di età omozigoti per le varianti a rischio di *UMOD* rispetto ad omozigoti per le varianti protettive.

Questi studi hanno contribuito ad accrescere la nostra conoscenza del ruolo di uromodulina suggerendo che questa misteriosa proteina abbia uno o più ruoli di fondamentale importanza per la funzione renale e che variazioni dei suoi livelli contribuiscano al rischio di malattie comuni come CKD ed ipertensione, che assumono una rilevanza sempre maggiore dato l'invecchiamento della popolazione. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire il complesso ruolo biologico di uromodulina ed i meccanismi alla base delle malattie ad essa associate.

Bibliografia

- [1] Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D *et al*. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation 2003 Oct;42(4):658-76
- [2] Rampoldi L, Scolari F, Amoroso A *et al*. The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. Kidney international 2011 Aug;80(4):338-47
- [3] Tamm I, HORSFALL FL Jr Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 1950 May;74(1):106-8
- [4] Muchmore AV, Decker JM Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. Science (New York, N.Y.) 1985 Aug 2;239(4712):479-81
- [5] Pennica D, Kohr WJ, Kuang WJ *et al*. Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. Science (New York, N.Y.) 1987 Apr 3;236(4797):83-8
- [6] Bachmann S, Metzger R, Bunnenmann B *et al*. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. Histochemistry 1990;94(5):517-23
- [7] Jennings P, Aydin S, Kotanko P *et al*. Membrane targeting and secretion of mutant uromodulin in familial juvenile hyperuricemic nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2007 Jan;18(1):264-73 (full text)

- [8] Jovine L, Qi H, Williams Z et al. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature cell biology* 2002 Jun;4(6):457-61
- [9] Serafini-Cessi F, Malagolini N, Hoops TC et al. Biosynthesis and oligosaccharide processing of human Tamm-Horsfall glycoprotein permanently expressed in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1993 Jul 30;194(2):784-90
- [10] Easton RL, Patankar MS, Clark GF et al. Pregnancy-associated changes in the glycosylation of tamm-horsfall glycoprotein. Expression of sialyl Lewis(x) sequences on core 2 type O-glycans derived from uromodulin. *The Journal of biological chemistry* 2000 Jul 21;275(29):21928-38 (full text)
- [11] Santambrogio S, Cattaneo A, Bernascone I et al. Urinary uromodulin carries an intact ZP domain generated by a conserved C-terminal proteolytic cleavage. *Biochemical and biophysical research communications* 2008 Jun 6;370(3):410-3
- [12] Wiggins RC Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1987 Feb 15;162(3):329-40
- [13] Jovine L, Darie CC, Litscher ES et al. Zona pellucida domain proteins. *Annual review of biochemistry* 2005;74:83-114
- [14] Jovine L, Qi H, Williams Z et al. A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 Apr 20;101(16):5922-7 (full text)
- [15] Han L, Monné M, Okumura H et al. Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3. *Cell* 2010 Oct 29;143(3):404-15 (full text)
- [16] Schaeffer C, Santambrogio S, Perucca S et al. Analysis of uromodulin polymerization provides new insights into the mechanisms regulating ZP domain-mediated protein assembly. *Molecular biology of the cell* 2009 Jan;20(2):589-99 (full text)
- [17] Ying WZ, Sanders PW Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats. *Kidney international* 1998 Oct;54(4):1150-6 (full text)
- [18] Torffvit O, Melander O, Hultén UL et al. Urinary excretion rate of Tamm-Horsfall protein is related to salt intake in humans. *Nephron. Physiology* 2004;97(1):p31-6
- [19] Renigunta A, Renigunta V, Saritas T et al. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *The Journal of biological chemistry* 2011 Jan 21;286(3):2224-35 (full text)
- [20] Mutig K, Kahl T, Saritas T et al. Activation of the bumetanide-sensitive Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *The Journal of biological chemistry* 2011 Aug 26;286(34):30200-10 (full text)
- [21] Bates JM, Raffi HM, Prasad K et al. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney international* 2004 Mar;65(3):791-7
- [22] 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. *American journal of physiology. Renal physiology* 2004 Apr;286(4):F795-802 (full text)
- [23] 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. *The Journal of biological chemistry* 2001 Mar 30;276(13):9924-30 (full text)
- [24] Grover PK, Thurgood LA, Ryall RL et al. Effect of urine fractionation on attachment of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells: implications for studying renal calculogenesis. *American journal of physiology. Renal physiology* 2007 May;292(5):F1396-403 (full text)
- [25] Liu Y, Mo L, Goldfarb DS et al. Progressive renal papillary calcification and ureteral stone formation in mice deficient for Tamm-Horsfall protein. *American journal of physiology. Renal physiology* 2010 Sep;299(3):F469-78 (full text)
- [26] Mo L, Liaw L, Evan AP et al. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. *American journal of physiology. Renal physiology* 2007 Dec;293(6):F1935-43 (full text)
- [27] Wu XR Interstitial calcinosis in renal papillae of genetically engineered mouse models: relation to Randall's plaques. *Urolithiasis* 2015 Jan;43 Suppl 1:65-76
- [28] Gudbjartsson DF, Holm H, Indridason OS et al. Association of variants at UMOD with chronic kidney disease and kidney stones-role of age and comorbid diseases. *PLoS genetics* 2010 Jul 29;6(7):e1001039 (full text)
- [29] Rhodes DC, Hinsman EJ, Rhodes JA et al. Tamm-Horsfall glycoprotein binds IgG with high affinity. *Kidney international* 1993 Nov;44(5):1014-21
- [30] Rhodes DC Binding of Tamm-Horsfall protein to complement 1q and complement 1, including influence of hydrogen-ion concentration. *Immunology and cell biology* 2002 Dec;80(6):558-66 (full text)
- [31] Sherblom AP, Decker JM, Muchmore AV et al. The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin. *The Journal of biological chemistry* 1988 Apr 15;263(11):5418-24 (full text)
- [32] Schmid M, Prajcer S, Gruber LN et al. Uromodulin facilitates neutrophil migration across renal epithelial monolayers. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2010;26(3):311-8
- [33] Säemann MD, Weichert T, Zeyda M et al. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation* 2005 Feb;115(2):468-75
- [34] Darisipudi MN, Thomasova D, Mulay SR et al. Uromodulin triggers IL-1β-dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012 Nov;23(11):1783-9 (full text)
- [35] El-Achkar TM, Wu XR, Rauchman M et al. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *American journal of physiology. Renal physiology* 2008 Aug;295(2):F534-44 (full text)
- [36] El-Achkar TM, McCracken R, Liu Y et al. Tamm-Horsfall protein translocates to the basolateral domain of thick ascending limbs, interstitium, and circulation during recovery from acute kidney injury. *American journal of physiology. Renal physiology* 2013 Apr 15;304(8):F1066-75 (full text)
- [37] Liu Y, El-Achkar TM, Wu XR et al. Tamm-Horsfall protein regulates circulating and renal cytokines by affecting glomerular filtration rate and acting as a urinary cytokine trap. *The Journal of biological chemistry* 2012 May 11;287(20):16365-78 (full text)
- [38] El-Achkar TM, Wu XR Uromodulin in kidney injury: an instigator, bystander, or protector? *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2012 Mar;59(3):452-61
- [39] 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. *Journal of medical genetics* 2002 Dec;39(12):882-92 (full text)
- [40] Rampoldi L, Caridi G, Santon D et al. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Human molecular genetics* 2003 Dec 15;12(24):3369-84 (full text)
- [41] Nasr SH, Lucia JP, Galgano SJ et al. Uromodulin storage disease. *Kidney international* 2008 Apr;73(8):971-6

- [42] 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. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003 Nov;14(11):2883-93 (full text)
- [43] Bollée G, Dahan K, Flamant M et al. Phenotype and outcome in hereditary tubulointerstitial nephritis secondary to UMOD mutations. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2011 Oct;6(10):2429-38 (full text)
- [44] Bleyer AJ, Zivná M, Kmoch S et al. Uromodulin-associated kidney disease. *Nephron. Clinical practice* 2011;118(1):c31-6
- [45] Lhotta K, Gruber J, Sgong R et al. Apoptosis of tubular epithelial cells in familial juvenile gouty nephropathy. *Nephron* 1998;79(3):340-4
- [46] Vyletal P, Kublová M, Kalbáková M et al. Alterations of uromodulin biology: a common denominator of the genetically heterogeneous FJHN/MCKD syndrome. *Kidney international* 2006 Sep;70(6):1155-69
- [47] Bernascone I, Vavassori S, Di Pentima A et al. Defective intracellular trafficking of uromodulin mutant isoforms. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2006 Nov;7(11):1567-79
- [48] Scolari F, Cardi G, Rampoldi L et al. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2004 Dec;44(6):987-99
- [49] Moskowitz JL, Piret SE, Lhotta K et al. Association between genotype and phenotype in uromodulin-associated kidney disease. *CJASN* 2013 Aug;8(8):1349-57 (full text)
- [50] Schaeffer C, Cattaneo A, Trudu M et al. Urinary secretion and extracellular aggregation of mutant uromodulin isoforms. *Kidney international* 2012 Apr;81(8):769-78
- [51] 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. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005 Oct;16(10):3006-14 (full text)
- [52] Ma L, Liu Y, El-Achkar TM et al. Molecular and cellular effects of Tamm-Horsfall protein mutations and their rescue by chemical chaperones. *The Journal of biological chemistry* 2012 Jan 6;287(2):1290-305 (full text)
- [53] Bachmann S, Mutig K, Bates J et al. Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *American journal of physiology. Renal physiology* 2005 Mar;288(3):F559-67 (full text)
- [54] Raffi H, Bates JM, Laszik Z et al. Tamm-Horsfall protein knockout mice do not develop medullary cystic kidney disease. *Kidney international* 2006 May;69(10):1914-5
- [55] Bernascone I, Janas S, Ikehata M et al. A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulo-interstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Human molecular genetics* 2010 Aug 1;19(15):2998-3010 (full text)
- [56] Kemter E, Rathkolb B, Rozman J et al. Novel missense mutation of uromodulin in mice causes renal dysfunction with alterations in urea handling, energy, and bone metabolism. *American journal of physiology. Renal physiology* 2009 Nov;297(5):F1391-8 (full text)
- [57] Kemter E, Prueckl P, Sklenak S et al. Type of uromodulin mutation and allelic status influence onset and severity of uromodulin-associated kidney disease in mice. *Human molecular genetics* 2013 Oct 15;22(20):4148-63 (full text)
- [58] Kemter E, Prückl P, Rathkolb B et al. Standardized, systemic phenotypic analysis of Umod(C93F) and Umod(A227T) mutant mice. *PloS one* 2013;8(10):e78337 (full text)
- [59] Kemter E, Sklenak S, Rathkolb B et al. No amelioration of uromodulin maturation and trafficking defect by sodium 4-phenylbutyrate in vivo: studies in mouse models of uromodulin-associated kidney disease. *The Journal of biological chemistry* 2014 Apr 11;289(15):10715-26 (full text)
- [60] Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nature genetics* 2009 Jun;41(6):712-7
- [61] Chambers JC, Zhang W, Lord GM et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nature genetics* 2010 May;42(5):373-5
- [62] Pattaro C, De Grandi A, Vitart V et al. A meta-analysis of genome-wide data from five European isolates reveals an association of COL22A1, SYT1, and GABRR2 with serum creatinine level. *BMC medical genetics* 2010 Mar 11;11:41 (full text)
- [63] Padmanabhan S, Melander O, Johnson T et al. Genome-wide association study of blood pressure extremes identifies variant near UMOD associated with hypertension. *PLoS genetics* 2010 Oct 28;6(10):e1001177 (full text)
- [64] Pattaro C, Köttgen A, Teumer A et al. Genome-wide association and functional follow-up reveals new loci for kidney function. *PLoS genetics* 2012;8(3):e1002584 (full text)
- [65] Köttgen A, Hwang SJ, Larson MG et al. Uromodulin levels associate with a common UMOD variant and risk for incident CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010 Feb;21(2):337-44 (full text)
- [66] Köttgen A, Yang Q, Shimmin LC et al. Association of estimated glomerular filtration rate and urinary uromodulin concentrations with rare variants identified by UMOD gene region sequencing. *PloS one* 2012;7(5):e38311 (full text)
- [67] Olden M, Corre T, Hayward C et al. Common variants in UMOD associate with urinary uromodulin levels: a meta-analysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2014 Aug;25(8):1869-82 (full text)
- [68] Trudu M, Janas S, Lanzani C et al. Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression. *Nature medicine* 2013 Dec;19(12):1655-60