

# QUALI INSEGNAMENTI DOPO DIECI ANNI DI RICERCA GENETICA SULLA CALCOLOSI RENALE DI CALCIO?

V. Paloschi<sup>1</sup>, T. Arcidiacono<sup>1</sup>, P. Stella<sup>1</sup>, F. Rainone<sup>1</sup>, A. Terranegra<sup>2</sup>, E. Dogliotti<sup>2</sup>, L. Soldati<sup>2</sup>, G. Vezzoli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unità di Nefrologia e Dialisi, Istituto Scientifico San Raffaele, Università Vita Salute, Milano

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Milano

## What do we know after ten years of genetic research into calcium kidney stones?

*Genetic studies of calcium kidney stones have so far assessed single candidate genes by testing linkage disequilibrium or association between a locus and stone disease. They showed the possible involvement of the calcium-sensing receptor gene, vitamin D receptor gene, and bicarbonate-sensitive adenylate cyclase gene. In addition to research in humans, the study of different strains of knock-out mice let us include the gene of phosphate reabsorption carrier NPT2, caveolin-1, protein NHERF-1 modulating calcium and urate reabsorption, osteopontin and Tamm-Horsfall protein among the possible determinants. However, the interactions between genes and also between environmental factors and genes are generally considered fundamental in calcium stone formation. Thus, the genetic studies carried out to date have not led to a significant growth of the knowledge about the causes of calcium kidney stones, even though they have allowed us to assess the size of the problem and define criteria to address it. Further knowledge of the causes of calcium stones may be obtained using the instruments that modern biotechnology and bioinformatics have made available to researchers. (G Ital Nefrol 2009; 26: 64-72)*

Conflict of interest: None

### KEY WORDS:

Calcium,  
Kidney stones,  
Genes,  
Polymorphism

### PAROLE CHIAVE:

Calcio,  
Calcoli renali,  
Geni,  
Polimorfismi

### ✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Giuseppe Vezzoli  
Unità di Nefrologia e Dialisi  
IRCCS Ospedale San Raffaele  
Via Olgettina, 60  
20132 Milano  
e-mail: vezzoli.giuseppe@hsr.it

## INTRODUZIONE

Lo studio metabolico dei pazienti ha evidenziato come la calcolosi renale di calcio si può associare a diversi difetti della escrezione degli elettroliti mono e bivalenti. Il più noto tra questi è l'ipercalciuria primaria, presente nel 50% dei pazienti calcolotici (1). Altri difetti, quali l'ipocitraturia, l'ipofosfatemia renale, l'iperuricuria e l'elevata escrezione di sodio e cloro, accompagnano la malattia calcolotica con frequenze inferiori. È quindi impossibile predire lo sviluppo di un calcolo di calcio sulla base di queste singole alterazioni e ciò fa supporre che esista un insieme di fattori che interagendo e/o sommandosi tra loro predispongano alla calcolosi calcica.

Nell'ultimo decennio la ricerca nefrologica ha cercato di definire le cause genetiche dei calcoli renali di calcio. Le nostre conoscenze a tale riguardo non sono però cresciute in maniera sostanziale e non è stato per-

ciò ancora possibile sviluppare efficaci criteri di prevenzione e trattamento. Tra i fattori predisponenti siamo soliti distinguere quelli di origine genetica e quelli ambientali, anche se la distinzione tra queste due componenti non è immediata in quanto i calcoli renali sono probabilmente il risultato della interazione tra geni e ambiente (2, 3). La calcolosi renale viene perciò inclusa nelle malattie complesse a patogenesi multifattoriale come l'ipertensione, il diabete, la cardiopatia ischemica, l'osteoporosi. Lo studio delle sue cause si prospetta difficile anche se i progressi delle conoscenze biologico-molecolare e le nuove biotecnologie hanno messo a disposizione potenti strumenti di analisi clinica. Grazie a queste metodiche, la ricerca genetica ha sicuramente compiuto dei grossi passi in avanti, ma è contemporaneamente cresciuta anche la consapevolezza della complessità del quadro patogenetico e dell'impegno che ad esso bisognerà dedicare per comprenderlo.

## GLI STUDI GENETICI DI *LINKAGE*

Lo studio genetico della calcolosi renale di calcio è stato sviluppato a partire dalla seconda metà degli anni '90. I primi studi sono stati condotti applicando metodiche di *linkage* che valutano la *cosegregazione* della calcolosi con un locus cromosomico nei componenti di famiglie affette da calcolosi di calcio. Esse sono robuste e rigorose nell'indicare i geni coinvolti nelle malattie, soprattutto quelle monogeniche, e per tale motivo sono state impiegate nella calcolosi renale (4). Taluni studi hanno anche valutato fenotipi implicati nella calcolosi, quali l'iperparatiroidismo.

Alcuni studi di *linkage* hanno considerato i loci di gene-candidato, che erano ritenuti patogeneticamente interessanti in accordo con le prevalenti ipotesi fisiopatologiche. Questa strategia è stata applicata in un campione di oltre 300 coppie di fratelli Franco-Canadesi affetti da calcolosi, nei quali sono stati testati i loci cromosomici che codificano per la  $1\alpha$ -idrossilasi renale della 25OH-vitamina D, il recettore della vitamina D (VDR) o il *calcium-sensing receptor* (CaSR). Ciascuna regione veniva saggiata con specifici marcatori polimorfici. Il locus della  $1\alpha$ -idrossilasi della 25-diidrossi-vitamina D (12q13.1-13.3) fu il primo ad essere studiato in questo campione, ma il suo ruolo non fu confermato dai risultati (5). Il locus del recettore della vitamina D (VDR) sul cromosoma 12q12-14, fu analizzato con sei diversi marcatori, quattro dei quali risultarono in *linkage disequilibrium* con la calcolosi e uno solo con l'iperparatiroidismo, ma con bassa significatività (6). Nella casistica di fratelli Franco-Canadesi non fu trovata *linkage* tra il locus del CaSR (3q13.3-21) e lo sviluppo di calcolosi (7).

Gli studi di *linkage* hanno fornito risultati più significativi quando sono stati studiati i componenti delle famiglie dei pazienti calcolotici, disposti in diverse generazioni. Uno studio ha riconsiderato il locus del VDR ed ha sostanzialmente confermato in quattro famiglie Indiane i risultati ottenuti sui fratelli Franco-Canadesi (8). Un altro ha confermato l'assenza di mutazioni sul gene del CaSR in sette famiglie Europee (9). Un unico studio familiare ha utilizzato marcatori cromosomici che coprivano l'intero genoma (*genome-wide scan*). Questa metodica ha consentito di procedere senza l'elaborazione di una ipotesi patogenetica e la definizione di un gene-candidato. Esplorando l'intero genoma con marcatori polimorfici, i risultati dello studio hanno fornito indicazioni sui loci dove potevano essere trovati i geni implicati nella calcolosi. In altre parole, l'analisi di *genome-wide scan* consente di elaborare un'ipotesi patogenetica sulla base dei risultati ottenuti. Mediante questo approccio è stato individuato un *linkage* tra il cromosoma 1q23.3-24 e l'iperparatiroidismo in tre famiglie affette da iperparatiroidismo

assorbitiva e calcolosi renale (10). L'interpretazione di questo risultato è stata affidata ad un successivo studio caso-controllo nel quale è stata trovata una associazione della iperparatiroidismo con sei polimorfismi del gene della adenilato ciclasi bicarbonato sensibile (sAC). Questi stessi polimorfismi risultavano anche associati a bassi valori di massa minerale ossea (11). Il ruolo funzionale della sAC non è stato ancora chiarito, anche se sappiamo che è espressa nel rene, nell'intestino e nelle cellule ossee e che la sua funzione è attivata dal bicarbonato e modulata dai cationi bivalenti (12). Il *linkage* tra gene sAC ed iperparatiroidismo non è stato però confermato in uno studio Europeo su nove famiglie (13).

Nonostante la maggiore solidità degli studi di *linkage*, gli studi condotti con strategie alternative, come l'analisi dell'associazione tra un genotipo e la calcolosi di calcio, sono stati molto più numerosi. Le cause di questo orientamento risiedono in molteplici problemi di ordine pratico e teorico. Il primo consiste nella difficoltà nel trovare gruppi familiari disposti su almeno tre generazioni e numericamente adeguati per gli studi di *linkage*. Un altro problema risiede nella incapacità di individuare con gli studi di *linkage* i geni con effetto fenotipico scarso (3, 4). Questo problema vale in modo particolare per la calcolosi renale, perché è possibile che essa non sia causata dalla alterazione di uno o pochi geni con effetto fortemente predominante, ma risulti dalla sommatoria delle modificazioni provocate da molteplici geni, ciascuno incapace da solo di provocare la malattia (14). Se questa possibilità fosse vera, il substrato causale potrebbe essere talmente variabile ed eterogeneo, da rendere molto difficili gli studi genetici e l'identificazione dei singoli geni.

A queste specifiche problematiche si aggiunge anche la più generale difficoltà di classificare un individuo come affetto; un calcolo può infatti comparire alle più diverse età, oppure restare misconosciuto. Può anche accadere che un individuo che possiede il patrimonio genetico predisponente non formi calcoli quando altri geni o nutrienti che agiscono in senso antilitogeno prevalgono sui fattori litogeni (15). Un chiaro esempio di questo fenomeno nell'ambito della calcolosi renale è fornito dalla dieta iposodica nei soggetti iperparatiroidici. In questi soggetti il rischio litogeno viene aumentato dalla elevata escrezione di calcio, ma la restrizione dell'apporto dietetico di sodio e cloro riduce il rischio litogeno prodotto dalla iperparatiroidismo che come è noto ha un substrato genetico (16). È inoltre possibile che siano diverse le cause genetiche che intervengono nei pazienti con calcolosi ricorrente, rispetto a quelli che producono un solo calcolo nel corso della loro vita (17).

## TEST DI VERIFICA

### 1) Per malattia complessa si intende:

- Una malattia dovuta a cause genetiche di tipo poligenico
- Una malattia dovuta alla mutazione di un singolo gene
- Una malattia dovuta a cause ambientali
- Una malattia dovuta a cause nutrizionali
- Una malattia dovuta all'interazione di diversi fattori ambientali e genetici.

### 2) Sulla base degli studi eseguiti, quale tra le seguenti affermazioni relative al gene sAC è falsa:

- Codifica per una adenilatociclastasi
- È implicato nella calcolosi renale
- È implicato nella escrezione renale di calcio
- È implicato nella escrezione renale di sodio
- È implicato nell'osteoporosi.

### 3) Quale tra le seguenti situazioni rappresenta una limitazione degli studi di linkage nella calcolosi:

- La calcolosi è una malattia complessa
- La calcolosi è una malattia poligenica
- L'età di esordio della calcolosi è variabile
- La dieta può modificare il rischio di sviluppo di calcolosi
- Tutte le precedenti.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gjn](http://www.sin-italy.org/gjn) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

## GLI STUDI GENETICI DI ASSOCIAZIONE

Gli studi di associazione tra un genotipo e la calcolosi di calcio sono l'alternativa più comune agli studi genetici di *linkage*. Essi valutano se un allele o un genotipo sono più o meno frequenti nei pazienti con calcoli renali rispetto ai non affetti. La ricerca di questa associazione può prevedere l'analisi dell'intero genoma oppure di geni-candidato. Fino ad oggi nell'ambito della calcolosi sono stati testati solo geni-candidato (18), ma l'analisi con marcatori che coprono l'intero genoma rappresenta il metodo del prossimo futuro (19). Negli studi di associazione i pazienti e i controlli sono stati genotipizzati per i polimorfismi di singola base disposti lungo la sequenza dei geni-candidato. Questi polimorfismi hanno una frequenza media di uno ogni 1200 basi e contribuiscono alla variabilità del fenotipo. Possono essere posti in regioni codificanti e provocare cambio di amminoacido, oppure su

regioni non-trascritte e lasciare inalterata la sequenza amminoacidica nella proteina (Tab. I). Il loro possibile effetto sul fenotipo resta spesso ignoto e questo aspetto rappresenta un punto cruciale di critica di queste analisi (20).

Il primo gene ad essere analizzato con questa metodica è stato quello del VDR, del quale sono stati considerati i polimorfismi della regione 3'-non tradotta o del codone di inizio della trascrizione. In diversi studi questi polimorfismi sono risultati associati alla calcolosi di calcio e alcuni di essi hanno anche osservavano che pazienti portatori delle varianti alleliche ai polimorfismi della regione 3'-terminale presentavano insorgenza più precoce dei calcoli, una malattia calcolotica più aggressiva e una minore escrezione urinaria di citrato (21-23). Nonostante che alcuni lavori non abbiano confermato queste associazioni (24), l'insieme dei risultati ottenuti fornisce l'idea che i polimorfismi genetici del VDR possano intervenire nello sviluppo della calcolosi di calcio. Resta ancora indefinito se i polimorfismi del VDR studiati comportino un effetto funzionale determinante per la calcolosi o l'associazione sia solo dovuta alla loro cosegregazione (ovvero sono in *linkage disequilibrium*) con altri polimorfismi funzionalmente rilevanti. Il loro legame funzionale con la calcolosi viene generalmente giustificato tramite l'attivazione che il complesso VDR-vitamina D produce sull'assorbimento intestinale del calcio (Fig. 1). Sembra però che il complesso VDR-vitamina D sia anche capace di ridurre l'escrezione urinaria del citrato. Esso, infatti, può dereprimere l'espressione della *fosfoenol-piruvatocarbossil-chinase* che, stimolando il *carrier* di riassorbimento del citrato sulla membrana luminale delle cellule del tubulo prossimale, ne può limitare l'escrezione renale (25).

Risultati particolari sono stati ottenuti mediante l'analisi del gene del CaSR, del quale sono stati studiati i polimorfismi dell'esone 7 (3'-terminale) e i polimorfismi del primo introne e della regione 5'-non tradotta vicini al promotore. Il polimorfismo Arg990Gly dell'esone 7 si associa all'iperparatiroidismo sia tra i pazienti con calcolosi che senza calcolosi. I risultati *in vitro* su cellule embrionali renali HEK293 trasfettate con il gene del CaSR indicano che il polimorfismo Arg990Gly possa comportare un guadagno funzionale per il CaSR (26, 27). A conferma di ciò i pazienti iperparatiroidici primitivi e secondari portatori della variante allelica presentano livelli circolanti medi di PTH più bassi rispetto ai portatori dell'allele arginina (28). È perciò possibile che l'allele glicina al codone 990 inibisca meno efficacemente il riassorbimento del calcio nelle cellule del tratto ascendente spesso dell'ansa, predisponendo chi ne è portatore ad una più elevata escrezione di calcio (Fig. 2). Resta da chiarire perché questi stessi soggetti non siano anche ipocalcemicici, come accade nei

TABELLA I - CARATTERISTICHE DEI POLIMORFISMI GENETICI

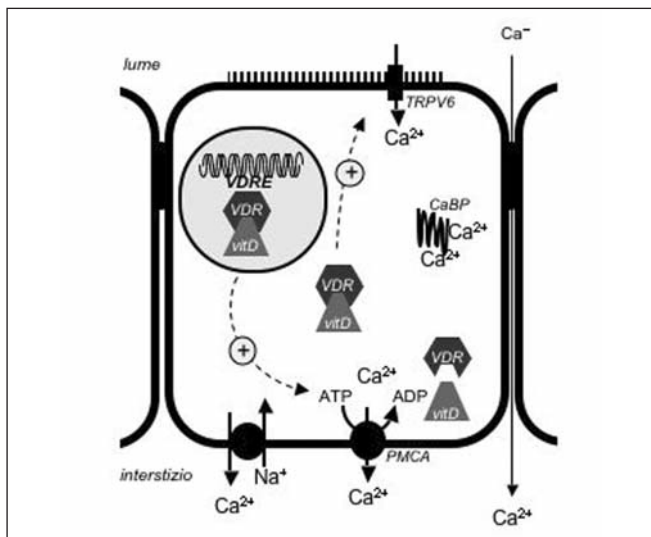
Tipo di variante	Sede	Effetto funzionale	Capacità predittiva del fenotipo
Non senso	Sequenza codificante	Stop della sequenza	Elevata
Non-sinonimo Non-conservativo	Sequenza codificante	Cambio con amminoacido con caratteristiche diverse	Da moderata ad elevata
Non-sinonimo Conservativo	Sequenza codificante	Cambio con amminoacido con caratteristiche simili	Da bassa ad elevata
Inserzione/delezione	Sequenza codificante	Cambia la struttura della proteina con effetti negativi sulla funzione	Molto elevata
Sinonimo	Sequenza codificante o non codificante	Non cambia amminoacido può alterare lo <i>splicing</i>	Da bassa ad elevata
Promotore Regioni regolatrici	Promotore 5'-UTR, 3'-UTR	Modifica espressione	Da bassa ad elevata
Siti di <i>splicing</i> Confini esone-introne	Ultime 10 paia di basi nell'esone	Modifica <i>splicing</i>	Da bassa ad elevata
Intronico	Introne	Può modificare espressione o stabilità di mRNA	Molto bassa
Intergenico	Regioni non codificanti tra i geni	Può modificare espressione interferendo con <i>enhancer</i>	Molto bassa

portatori delle mutazioni attivanti il gene CaSR. Si può ipotizzare a tale riguardo che il polimorfismo Arg990Gly influenzi in modo diverso i sistemi di *signalling* usati dalle cellule paratiroidi e renali: esso potrebbe perciò inibire con efficacia diversa il riassorbimento di tubulare di calcio e la produzione di PTH nelle cellule paratiroidi. L'importanza di questo polimorfismo per la calciuria è stata anche confermata nei pazienti con iperparatiroidismo primitivo, perché i pazienti portatori della variante allelica 990Gly presentavano una più elevata escrezione di calcio urinario ed una maggiore frequenza di calcolosi (28).

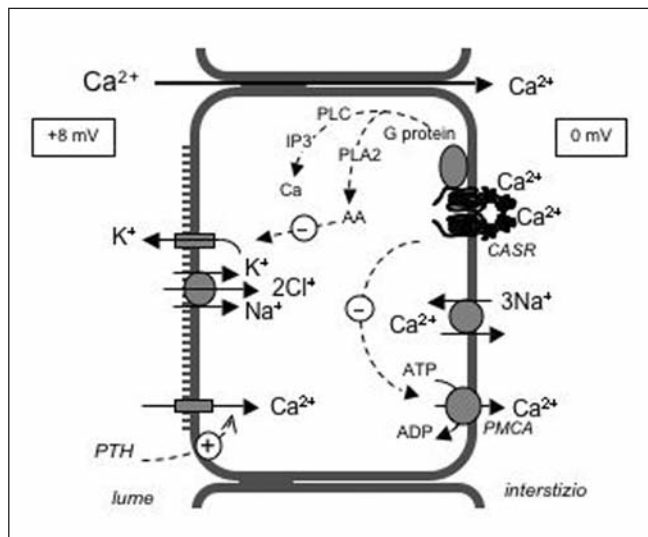
I polimorfismi della regione del promotore del gene

CaSR, siti nel primo introne o nella regione 5'-non tradotta, sono stati recentemente associati alla calcolosi della popolazione Italiana (29). Essi non comportano cambio amminoacidico e si suppone che possano intervenire modificando la trascrizione del gene e l'espressione del CaSR nei tubulociti della papilla renale, data la vicinanza con il promotore del gene. È verosimile che in presenza delle elevate concentrazioni di calcio nella papilla renale, una diversa espressione cellulare del CaSR possa essere cruciale per la precipitazione dei sali di calcio e la formazione dei calcoli di ossalato (30).

Sono risultati associati alla calcolosi anche i poli-



**Fig. 1** - L'assorbimento intestinale del calcio è ritenuto particolarmente rilevante per lo sviluppo di calcolosi. L'assorbimento transcellulare viene mediato da un sistema di trasporto che prevede l'ingresso di calcio dal lume all'enterocita attraverso il canale del calcio TRPV6, mentre sulla membrana basolaterale la pompa del calcio (PMCA) e lo scambiatore sodio-calcio trasportano lo ione calcio nell'interstizio. La PMCA interviene nell'assorbimento solo nel digiuno e nel duodeno, dove l'assorbimento è attivo. Nel citoplasma la calbindina 9k (CBP) lega gli ioni calcio assorbiti e li guida verso i trasportatori della membrana basolaterale. Il complesso vitamina D (vitD)-recettore (VDR) controlla l'espressione genica di tutti questi trasportatori e della CBP e regola l'attività di TRPV6 mediante un effetto non-genomico. Il complesso vitD-VDR si lega ad una sequenza genica specifica detta VDRE (elemento di risposta alla vitD) che dereprime i geni delle proteine vitD-dipendenti. A fianco di questi meccanismi c'è anche un assorbimento paracellulare di calcio.



**Fig. 2** - La figura mostra un modello schematico di una cellula del tratto ascendente spesso, dove sono illustrati gli effetti del CaSR. Il CaSR inibisce il cotrasporto Na-K-Cl e il riassorbimento del sodio attraverso l'attivazione della fosfolipasi A2 (PLA2) e la produzione di acido arachidonico (AA) ed acido eicosatetraenoico. Questa inibizione riduce il potenziale elettrico tra interstizio e lume che di per sé ostacola il riassorbimento passivo paracellulare di calcio e di altri cationi. Inoltre l'attivazione del riassorbimento di calcio ha un effetto diretto sulla pompa del calcio (PMCA), che inibisce il riassorbimento attivo di calcio.

morfismi dei geni che codificano per osteopontina, urochinasi, recettore dell'interleuchina-1, canale intestinale del calcio TRPV6, E-caderina, *epidermal growth factor* (13, 31-36). Di questi geni non è ancora chiaro il ruolo fisiopatogenetico nella calcolosi e mancano lavori che confermino questi primi risultati. Del gene *TRPV6*, che codifica per il canale del calcio espresso nella mucosa intestinale, è stato però ottenuto un risultato funzionale secondo il quale le mutazioni attivanti sarebbero associate alla calcolosi (32), attraverso un aumento dell'assorbimento intestinale del calcio (Fig. 2).

Gli studi di associazione sono sicuramente più facili da realizzare rispetto alle analisi di *linkage*, tuttavia non sono esenti da problemi. Anche per essi vale la già citata difficoltà di classificare un individuo come affetto. Sono inoltre gravati da una bassa ripetibilità dei risultati nelle diverse popolazioni, attribuibile alle differenze di substrato genetico o ambientale che creano stratificazioni misconosciute tali da rendere disomogenee le diverse popolazioni (37). Questo può valere anche all'inverso, ovvero creare condizioni per risultati falsamente positivi frutto di stratificazioni favorevoli e misconosciute. Essi possono però mettere in evidenza anche geni con scarso effetto sul fenotipo,

come probabilmente nel caso della relazione tra ipercalcemia e polimorfismo Arg990Gly del gene *CaSR*. La variante allelica 990Gly è stata trovata associata alla ipercalcemia e spiegava il 4% della variabilità del fenotipo della calciuria nella popolazione in oggetto (24); viceversa il locus del gene *CaSR* non era in *linkage* con l'ipercalcemia o la calcolosi nelle coppie di fratelli Franco-Canadesi (7). È verosimile che proprio la scarsa influenza del polimorfismo Arg990Gly sulla variabilità della calciuria sia responsabile della negatività degli studi di *linkage*.

Gli studi di associazione e di *linkage* sono stati condotti sino ad oggi scegliendo a priori i geni e i polimorfismi sottoposti ad indagine. Mentre la scelta dei geni si è basata in genere sulle conoscenze fisiopatologiche, la scelta dei polimorfismi solo raramente è stata indirizzata da conoscenze funzionali (20). Questo importante punto di debolezza potrà essere evitato grazie all'introduzione delle metodiche di esplorazione dell'intero genoma. L'esplorazione dell'intero genoma è oggi praticabile con spese elevate ma sostenibili, tuttavia necessita di tecnologie e software bioinformatici capaci di testare ed elaborare un numero di campioni e dati elevatissimo. Infine, indi-



pendentemente dalla strategia di studio, resta fondamentale che i risultati genetici siano comprovati da studi funzionali in modelli cellulari e animali. Questi possibili sviluppi e le esperienze citate hanno fatto sì che gli studi di associazione siano stati progressivamente rivalutati nel corso degli ultimi anni.

#### TEST DI VERIFICA

**4) Quale tra le seguenti affermazioni relative al gene VDR è falsa:**

- È stato associato all'escrezione renale di fosfato
- È stato associato all'escrezione renale di calcio
- È stato associato alla BMD
- È stato associato all'escrezione renale di citrato
- È stato associato alla calcolosi.

**5) Quale tra questi geni è risultato associato alla calcolosi renale di calcio in studi caso-controllo nell'uomo:**

- Il gene del canale del calcio TRPV5
- Il gene della pompa del calcio PMCA
- Il gene del *carrier* della osteopontina
- Il gene del *carrier* del fosfato NPT2
- Il gene della calbindina.

**6) Il polimorfismo Arg990Gly del gene del CaSR:**

- Influenza la funzione del promotore del gene del CaSR
- Sembra comportare una maggiore sensibilità del CaSR al PTH
- Nei pazienti con iperparatiroidismo primitivo determina una maggiore escrezione urinaria di calcio
- Nei pazienti con iperparatiroidismo primitivo determina una minore escrezione urinaria di calcio
- Non influenza i livelli di PTH nei pazienti con iperparatiroidismo secondario.

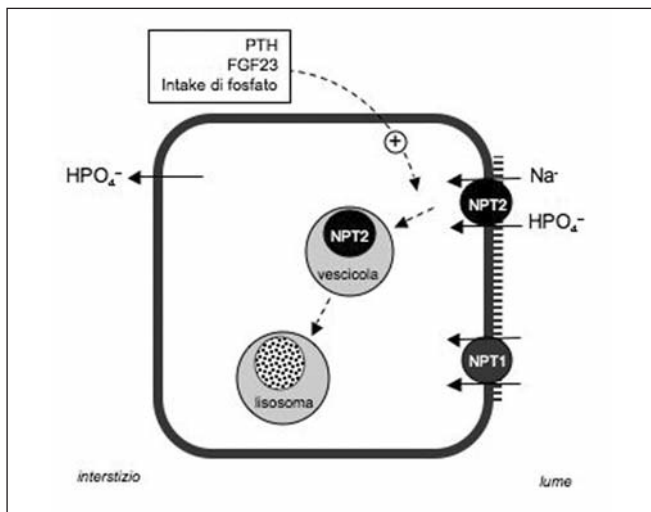
#### I MODELLI ANIMALI DI MALATTIA GENETICA

I topi *knockout* sono animali geneticamente programmati per non esprimere un gene. Lo sviluppo di calcolosi nel fenotipo di un ceppo *knockout* indica che il gene silenziato è importante per impedire lo sviluppo della calcolosi. Cinque ceppi di topi *knockout* sono noti perché sviluppano calcificazioni renali. I topi *knockout* per il gene *slc26a13*, mancano del *carrier* che secerne ossalato nel lume intestinale. Di conseguenza questi animali accumulano ossalato nel loro organismo e ne aumentano l'escrezione renale con conseguente precipitazione urinaria e formazione di calcoli (38). I topi *knockout* per la caveolina-1 non sono in grado di produrre caveole nelle cellule renali, cioè le invagina-

zioni della membrana plasmatica dove si raccolgono proteine importanti per le funzioni cellulari, quali la pompa del calcio, il CaSR e il VDR. Questi topi non riescono perciò a riassorbire calcio dal lume tubulare; essi diventano così ipercalcemici e sviluppano depositi di calcio-fosfato nel tubulo (39). Il terzo ceppo *knockout* manca di una proteina (NHERF-1) che modula il riassorbimento di sodio, calcio ed acido urico. Le escrezioni di calcio e urato aumentano con conseguente formazione di depositi papillari di calcio (40). I topi del ceppo doppio *knockout* per l'osteopontina e per la proteina di *Tamm-Horsfall* presentano depositi interstiziali papillari nel 39% degli animali, verosimilmente a causa della incapacità delle loro urine di inibire la precipitazione dei sali di calcio. L'effetto antilipogeno delle due proteine sembra sinergico, dato che la mancanza di una sola delle due causa depositi papillari nel 10-15% degli animali (41).

Da ultimo i topi *knockout* per il *carrier* renale dei fosfati (NPTa) sono un interessante modello di animali il cui fenotipo è caratterizzato da ipofosforemia secondaria a perdita renale di fosfato, elevata sintesi renale di vitamina D, ipercalcemia e produzione di calcoli renali (42). Questo quadro è analogo a quello che si sviluppa nei pazienti con rachitismo ipofosforemico autosomico dominante con ipercalcemia (HHRH). I topi *knockout* per NPT2a sono stati perciò considerati come un modello del difetto renale dei pazienti con HHRH. Non è stata però trovata alcuna alterazione del gene NPT2a nei pazienti con HHRH, mentre sono state trovate mutazioni del *carrier* prossimale del fosfato NPT2c (43). Nell'uomo e nel topo esiste perciò una diversa organizzazione del riassorbimento prossimale del fosfato. Mentre il primo utilizza probabilmente NPT2c come principale *carrier* per il riassorbimento del fosfato nel tubulocita prossimale (Fig. 3), il secondo utilizza NPT2a. I due *carrier* sono funzionalmente diversi poiché NPT2a sostiene un cotrasporto elettrogenico di tre ioni sodio e uno fosfato, mentre NPT2c produce un cotrasporto elettroneutro che riasorbe due ioni sodio e uno fosfato. Il deficit di NPTa o NPT2c sembra coinvolgere in modo diverso l'osso dato che il fenotipo dei topi non prevede il rachitismo che si osserva invece nell'uomo. È possibile che i due *carriers* del fosfato siano diversamente espressi nelle cellule ossee; in particolare NPT2a è presente negli osteoclasti e i topi *knockout* per NPT2a sembrano avere osteoclasti in minor numero e meno attivi (44).

Le esperienze con i ceppi animali fin qui citati dimostrano che i topi *knockout* sono una fonte di informazioni, utile e relativamente facile da ottenere. Essi possono aprire nuove ipotesi di studio, ma non rappresentano la chiave di volta delle nostre ricerche perché comunque il trasferimento dei risultati dall'animale all'uomo comporta di conoscere il ruolo giocato dalla proteina oggetto di studio nella fisiologia umana. L'osteopontina, la Tamm-



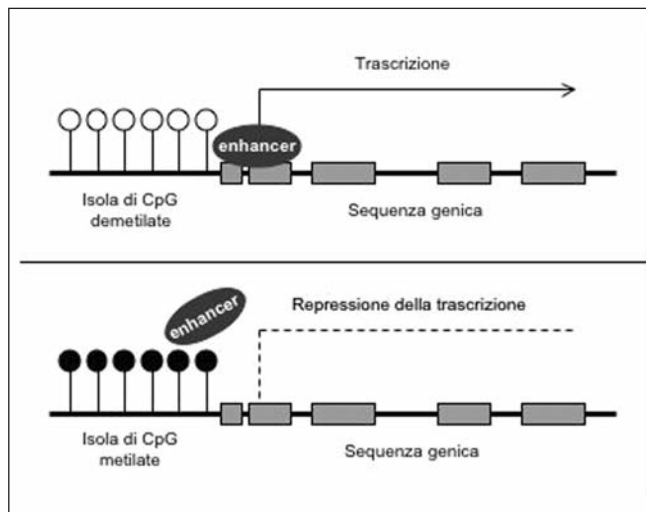
**Fig. 3** - Il trasportatore NPT2 nell'uomo ha il compito di riassorbire il fosfato nel tubulo prossimale. Nello specifico, la isoforma NPT2c è responsabile dell'85% del riassorbimento di fosfato, mentre il 15% è mediato dal trasportatore NPT1. L'intake di fosfato, l'FGF23 e il PTH inibiscono l'espressione di NPT2 sulla membrana luminale perché in loro presenza NPT2 viene internalizzato e lisato nei lisosomi. Con questo meccanismo viene da essi ridotto il riassorbimento di fosfato.

Horsfall sono note per l'attività antilitogena nell'uomo, viceversa non è stato ancora accertato nell'uomo il ruolo del carrier dell'ossalato *slc26a13* e di *NHERF-1*. Gli studi su NPT2 sono un esempio dell'impossibilità di trasferire nell'uomo i dati ottenuti nel topo.

### I FUTURI AMBITI DI STUDIO

Come si può capire da quanto finora descritto, non sono ancora noti i geni coinvolti nella calcolosi renale di calcio e le modalità di trasmissione della malattia. Nello scegliere i geni-candidato da indagare, i ricercatori hanno rivolto l'attenzione ai geni specificamente legati al metabolismo del calcio, e tra questi i geni del VDR, CaSR e sAC sembrano contribuire allo sviluppo dei calcoli di calcio, anche se la misura del loro contributo non è ancora chiarita. Questi geni possono essere coinvolti nello sviluppo dell'iperpariuria primaria e dell'osteoporosi e perciò l'associazione di questi disturbi con la calcolosi sottolinea l'importanza dell'iperpariuria come fattore patogenetico e spiega l'elevata frequenza di osteoporosi tra essi, indipendentemente dalla calciuria.

È però molto verosimile che, oltre al metabolismo del calcio, anche altri aspetti del metabolismo elettrolitico renale, fino ad oggi non considerati o ipotizzabili, pos-



**Fig. 4** - La metilazione del DNA avviene al carbonio 5' della citosina adiacente ad una guanina (CpG), grazie all'enzima DNA-metiltrasferasi. S-adenosilmetionina funge da donatore di metili e viene rimetilata attraverso una via che richiede folati e vitamina B12 come cofattori. Dinucleotidi CpG sono raggruppati in cluster siti in prossimità dei promotori genici. Circa il 60% dei geni contiene CpG nei promotori. Nella forma non-metilata i cluster di CpG permettono la trascrizione, ma la reprimono quando sono metilati. Tra i vari possibili meccanismi, la figura schematizza l'interferenza dei gruppi metile con un enhancer della trascrizione. L'ipermetilazione reprime l'espressione genica, mentre l'ipometilazione espone il cromosoma a fratture o a riarrangiamenti. Nei tumori si può trovare sia l'una che l'altra condizione.

sano essere patogeneticamente importanti per lo sviluppo dei calcoli. Un esempio è stato fornito dagli studi che hanno indicato il potenziale ruolo litogeno del gene sAC. Gli studi di *genome-wide scan* sono perciò attesi con molto interesse proprio per la loro possibilità di formulare nuove ipotesi e prospettive di ricerca che superano i limiti delle nostre attuali conoscenze.

Gli studi elencati hanno per lo più considerato un singolo gene, viceversa la interazione tra diversi geni e dei geni con l'ambiente vengono generalmente ritenute fondamentali nello sviluppo della calcolosi renale. I geni litogeni possono interagire con l'ambiente in maniera più o meno complessa dando origine a molteplici forme di interazione. Allo stato attuale degli studi le più interessanti sono le interazioni di tipo epigenetico, per le quali le influenze ambientali possono modificare il fenotipo in modo stabile e trasmissibile alle successive generazioni, pur non cambiando il genotipo (45). Esse producono questo risultato modificando l'espressione genica mediante diversi meccanismi. Nell'uomo il più frequente consiste nella metilazione delle regioni promotrici dei geni, che può tradursi nella repressione della trascrizione o nel riarrangiamento genico, rispettivamente in caso di ipermetilazione o ipometilazione (Fig. 4) (46). Si ritiene che nella vita fetale e perinatale diverse condizioni ambientali possano produrre cambiamenti epigenetici, influenzando in questo modo la

suscettibilità del nascituro verso le malattie croniche. Lo studio dell'interazione tra geni e ambiente è destinato ad espandersi progressivamente nella calcolosi renale anche attraverso l'analisi epigenetica, ma studi di questo tipo non sono ancora stati eseguiti, né a livello epidemiologico né animale.

In conclusione, potremmo affermare che dieci anni di studi genetici sulla calcolosi renale non hanno portato a una sostanziale crescita delle nostre conoscenze circa le cause della calcolosi renale di calcio. Questa conclusione è però forse ingenerosa per chi si è impegnato in un ambito di ricerca difficile e insidiosa e potrebbe valere in generale per tutte le malattie complesse. Infatti, gli strumenti di indagine genetica a disposizione fino a poco tempo fa hanno dato risultati entusiasmanti per le patologie monogeniche a trasmissione mendeliana, ma risultati deludenti per le patologie complesse. Negli ultimi anni si sono però rese disponibili nuove metodiche di studio del genoma umano, mezzi di indagini genetica *high-throughput* a costi accessibili, *softwares* di bioinformatica in grado di gestire i dati raccolti da grandi campioni di popolazione in termini di numerosità. Gli studi condotti finora hanno perciò svolto il ruolo delle prime esplorazioni e pur con i loro limiti possono essere considerati come delle basi su cui poggiare i futuri sforzi di ricerca. Essi hanno ottenuto dei risultati relativi soprattutto alle alterazioni del metabolismo calcico nella calcolosi renale, ma hanno anche fornito criteri e saggiato la dimensione del problema. Anche alla luce di questi studi, i moderni strumenti biotecnologici e bioinformatici, se ben impiegati, potranno farci compiere ulteriori passi nella conoscenza delle cause genetiche della calcolosi renale di calcio. In questo sforzo bisogna però riconoscere che resta ancora fondamentale la raccolta del campione, perché sia il più possibile fenotipicamente omogeneo. Per ottenere risultati significativi con strumenti moderni resta quindi ancora necessaria un'arte antica, cioè la valutazione clinica del paziente e la capacità di raccogliere informazioni sulle sue caratteristiche in modo attento, preciso e standardizzato.

#### TEST DI VERIFICA

##### 7) I topi *knockout* per il gene *NPT2c* hanno:

- Ridotto riassorbimento di fosfato nel tubulo prossimale
- Elevato riassorbimento di fosfato nel tubulo prossimale
- Ridotto riassorbimento di fosfato nel tubulo distale
- Elevato riassorbimento di fosfato nel tubulo distale

e. Nessuna delle precedenti.

##### 8) I topi *knockout* per osteopontina e proteina di:

- Sviluppano sempre depositi intratubulari di calcio
- Sviluppano sempre depositi interstiziali papillari di calcio
- Sviluppano calcoli renali in percentuale maggiore rispetto ai topi *knockout* per una sola delle due proteine
- Sviluppano calcoli renali in percentuale minore rispetto ai topi *knockout* per una sola delle due proteine
- Hanno permesso di dimostrare l'effetto "pro-litogeno" delle due proteine.

##### 9) L'interazione epigenetica:

- Non riguarda i geni litogeni
- Riguarda modificazioni dell'espressione genica che possono modificare il fenotipo in modo stabile
- Riguarda le modificazioni del genotipo indotte dalle influenze ambientali
- Consiste nell'interazione di diversi geni tra loro
- Nessuna delle precedenti.

#### RIASSUNTO

*Gli studi genetici della calcolosi renale di calcio hanno sino ad oggi valutato singoli geni-candidato tramite metodiche che analizzavano il linkage disequilibrium o l'associazione tra un locus e la malattia. Essi hanno evidenziato il possibile coinvolgimento dei geni del Calcium-sensing receptor, del recettore della vitamina D e della adenilato ciclasi bicarbonato sensibile. Oltre alle ricerche sull'uomo, lo studio di diversi ceppi di topi knock-out ha permesso di includere tra i possibili determinanti i geni del trasportatore renale del fosfato *NPT2*, della caveolina-1, della proteina *NHERF-1* (modulatore del riassorbimento renale di calcio e acido urico), dell'osteopontina e della proteina di Tamm-Horsfall.*

*Tuttavia, nella formazione dei calcoli renali vengono generalmente ritenute fondamentali le interazioni tra i diversi geni come pure tra i geni e le componenti ambientali. Perciò, gli studi genetici sino ad oggi condotti non hanno garantito una sostanziale crescita della nostra conoscenza circa le cause della calcolosi renale di calcio, anche se hanno permesso di saggiare la dimensione del problema e di acquisire i criteri adeguati per affrontarlo. Ulteriori passi in questa conoscenza saranno probabilmente fatti con l'uso degli strumenti che la moderna biotecnologia e bioinformatica hanno messo a disposizione dei ricercatori.*

#### DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Hodkinson A, Pyrah LN. The urinary excretion of calcium and inorganic phosphate in 344 patients with calcium stones of renal origin. *Br J Surg* 1958; 46: 10-8.
2. Halebian GE, Cantor DA, Sur RL, Assimos DG, Preminger GM. Nephrolithiasis in identical twins: the impact of nature vs nurture. *BJU Int* 2007; 100: 621-3.
3. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith J. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003; 361: 865-72.
4. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265: 2037-48.
5. Scott P, Ouimet D, Proulx Y, et al. The 1 alpha-hydroxylase locus is not linked to calcium stone formation or calciuric phenotypes in French-Canadian families. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 425-32.
6. Scott P, Ouimet D, Valiquette L, et al. Suggestive evidence for a susceptibility gene near the vitamin D receptor locus in idiopathic calcium stone formation. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1007-13.
7. Petrucci M, Scott P, Ouimet D, et al. Evaluation of the calcium-sensing receptor gene in idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 2000; 58: 38-42.
8. Khullar M, Relan V, Singh SK. VDR gene and urinary calcium excretion in nephrolithiasis. *Kidney Int* 2006; 69: 943.
9. Lerolle N, Coulet F, Lantz B, et al. No evidence for point mutations of the calcium-sensing receptor in familial idiopathic hypercalciuria. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2317-22.
10. Reed BY, Heller HJ, Gitomer WL, Pak CY. Mapping a gene defect in absorptive hypercalciuria to chromosome 1q23.3-q24. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3907-13.
11. Reed BY, Gitomer WL, Heller HJ, et al. Identification and characterization of a gene with base substitutions associated with the absorptive hypercalciuria phenotype and low spine bone density. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1476-85.
12. Geng W, Wang Z, Zhang J, Reed BY, Pak CY, Moe OW. Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C1305-16. Epub 2005 Jan 19.
13. Müller D, Hoenderop JG, Vennekens R, et al. Epithelial Ca(2+) channel (ECAC1) in autosomal dominant idiopathic hypercalciuria. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1614-20.
14. Goodman HO, Holmes RP, Assimos DG. Genetic factors in calcium oxalate stone disease. *J Urol* 1995; 153: 301-7.
15. Wright A, Charlesworth B, Rudan I, Catothers A, Campbell H. A polygenic basis for late-onset disease. *Trends Genet* 2003; 19: 97-106.
16. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* 2002; 346: 77-84.
17. Gambaro G, Vezzoli G, Casari G, Rampoldi L, D'Angelo A, Borghi L. Genetics of hypercalciuria and calcium nephrolithiasis: from the rare monogenic to the common polygenic forms. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 963-86.
18. Manolio TA, Bailey-Wilson JE, Collins FS. Genes, environment and the value of prospective cohort studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 812-20.
19. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 109-18.
20. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 391-7.
21. Söylemezoğlu O, Ozkaya O, Gönen S, Misirlioğlu M, Kalman S, Buyan N. Vitamin D receptor gene polymorphism in hypercalciuric children. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 724-7. Epub 2004 May 13.
22. Rendina D, Mossetti G, Viceconti R, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and fasting idiopathic hypercalciuria in recurrent stone-forming patients. *Urology* 2004; 64: 833-8.
23. Relan V, Khullar M, Singh SK, Sharma SK. Association of vitamin D receptor genotypes with calcium excretion in nephrolithiatic subjects in northern India. *Urol Res* 2004; 32: 236-40. Epub 2004 Mar 18.
24. Vezzoli G, Soldati L, Proverbio MC et al. Polymorphism of vitamin D receptor gene start codon in patients with calcium kidney stones. *J Nephrol* 2002; 15: 158-64.
25. Sugiyama T, Wang JC, Scott DK, Granner DK. Transcription activation by the orphan nuclear receptor, chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI). Definition of the domain involved in the glucocorticoid response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem* 2000; 275: 3446-54.
26. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, et al. Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2517-23.
27. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, et al. R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *Kidney Int* 2007; 71: 1155-62. Epub 2007 Feb 28.
28. Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filipanti M, et al. R990G polymorphism of the calcium-sensing receptor and renal calcium excretion in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 687-92.
29. Terranegra A, Arcidiacono T, Biasion R, et al. Calcium-sensing receptor (CaSR), a candidate gene for calcium kidney stone disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21 (Suppl. 4): 292.
30. Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest* 2003; 111: 602-5.
31. Gao B, Yasui T, Itoh Y, et al. Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis. *Kidney Int* 2007; 72: 592-8. Epub 2007 May 23.
32. Suzuki Y, Pasch A, Bonny O, Mohaupt MG, Hediger MA, Frey FJ. Gain-of-function haplotype in the epithelial calcium channel TRPV6 is a risk factor for renal calcium stone formation. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1613-8. Epub 2008 Feb 13.
33. Chen WC, Wu HC, Chen HY, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. Interleukin-1beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms in patients with calcium oxalate stones. *Urol Res* 2001; 29: 321-4.
34. Tsai FJ, Lin CC, Lu HF, Chen HY, Chen WC. Urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism is associated with urolithiasis. *Urology* 2002; 59: 458-61.
35. Tsai FJ, Wu HC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Chen WC. Association of E-cadherin gene 3'-UTR C/T polymorphism with calcium oxalate stone disease. *Urol Int* 2003; 70: 278-81.
36. Chen WC, Chen HY, Wu HC, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is associated with calcium oxalate stone disease. *Urol Res* 2003; 31: 218-22. Epub 2003 Apr 29.
37. Freedman ML, Reich D, Penney KL, et al. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nat Genet* 2004; 36: 388-93. Epub 2004 Mar 28.
38. Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, et al. Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. *Nat Genet* 2006; 38: 474-8. Epub 2006 Mar 12.
39. Cao G, Yang G, Timme TL, et al. Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am J Pathol* 2003; 162: 1241-8.
40. Weinman EJ, Mohanlal V, Stoycheff N, et al. Longitudinal study of urinary excretion of phosphate, calcium, and uric acid in mutant NHERF-1 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F838-43. Epub 2005 Oct 25.
41. Mo L, Liaw L, Evan AP, Sommer Aj, Lieke JC, Wu XR. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F1935-43. Epub 2007 Sep 26.
42. Chau H, El-Maadawy S, McKee M, Tenenhouse HS. Renal calcification in mice homozygous for the disrupted type IIa Na/Pi cotransporter gene Npt2. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 644-57.
43. Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Eckstein G, et al. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria is caused by mutations in the sodium-phosphate cotransporter gene SLC34A3. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 193-201. Epub 2005 Dec 9.
44. Gupta A, Tenenhouse HS, Hoag HM, et al. Identification of the type II Na(+)-Pi cotransporter (Npt2) in the osteoclast and the skeletal phenotype of Npt2-/- mice. *Bone* 2001; 29: 467-76.
45. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 253-62.
46. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597-610.