

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova  
DIPARTIMENTO DI *SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO*

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E  
SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE SANITARIA

INDIRIZZO di ONCO-EMATOLOGIA, GENETICA, MALATTIE RARE e  
MEDICINA PREVENTIVA  
CICLO: XXVII

**ANALISI MUTAZIONALE DI GENI COINVOLTI NELLA  
NEFROGENESI E RICERCA DI VARIAZIONI DI SEQUENZA  
NELLE LORO REGIONI TARGET PER MIRNA**

**Direttore della Scuola** : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Coordinatore d'indirizzo**: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Supervisore** : Dott.ssa Lina Artifoni

**Dottorando** : Susanna Negrisolò

## INDICE

PAG.1	ABSTRACT ITALIANO
PAG.3	ABSTRACT INGLESE
PAG.5	INTRODUZIONE
PAG.6	Embriogenesi Renale: Aspetti Morfologici
PAG.12	Anomalie del Rene e delle Vie Urinarie
PAG.19	Gene Regulatory Network dello Sviluppo Renale
PAG.29	miRNA e Sviluppo Renale
PAG.33	Geni analizzati
PAG.34	SIX1
PAG.37	PAX2
PAG.39	GATA3
PAG.41	SPRY1
PAG.44	SCOPO
PAG.46	MATERIALI E METODI
PAG.47	Casistica
PAG.47	Popolazione di controllo
PAG.48	Disegno dello Studio
PAG.48	Screening mutazionale dei geni dello sviluppo renale
PAG.52	HRMA
PAG.56	Analisi mutazionale dei target e dei MIRNA
PAG.62	Analisi bioinformatica predittiva delle variazioni di sequenza individuate e stima della frequenza
PAG.64	RISULTATI
PAG.74	DISCUSSIONE
PAG.81	CONCLUSIONI
PAG.83	BIBLIOGRAFIA

## ABSTRACT

Le anomalie congenite del rene e delle vie urinarie (CAKUT) rappresentano circa il 30% di tutte le anomalie di sviluppo embrionale (prevalenza e morbilità nella popolazione pediatrica 3-6/1000 nati vivi in Europa). Sono malformazioni caratterizzate da un'ampia variabilità fenotipica la cui rilevanza clinica varia da forme meno severe con lievi alterazioni della funzionalità renale, a forme gravi quali l'agenesia e l'ipodisplasia renale. Circa il 50% dei bambini in dialisi o portatori di trapianto renale sono affetti da CAKUT. I dati della letteratura suggeriscono che l'origine di queste malattie sia una disregolazione del complesso programma nefrogenetico. La presenza di mutazioni in geni fortemente coinvolti nello sviluppo del rene è stata associata ad alcune di queste malattie, ma ancora molto resta da chiarire sull'eziopatogenesi della maggior parte delle CAKUT. Recentemente è stato confermato il ruolo rilevante di corte sequenze di RNA non-codificante (microRNA), in qualità di regolatori genici post-trascrizionali, durante la nefrourogenesi dei mammiferi. Studi di perdita condizionale dell'espressione dei microRNA durante lo sviluppo embrionale del topo, suggeriscono che la loro disregolazione possa portare alle CAKUT. Pochi sono a tutt'oggi i dati relativi al loro coinvolgimento nella nefrourogenesi umana.

È stata condotta l'analisi mutazionale dei geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1, fortemente coinvolti nello sviluppo del rene e delle vie urinarie, su una popolazione di 53 pazienti con CAKUT. In tutti i soggetti che non presentavano mutazioni nei geni dello sviluppo analizzati, sono state ricercate variazioni di sequenza nelle regioni 3'UTR target per miRNA, identificate attraverso uno studio bioinformatico predittivo. La ricerca di variazioni di sequenza è stata quindi estesa anche ai geni codificanti per i MIRNA, che la predizione in silico aveva identificato come ipotetici regolatori post-trascrizionali dei geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1.

Sono state identificate 5 mutazioni causative di cui 4 a carico del gene PAX2, 1 a carico del gene GATA3, in sei pazienti con ipodisplasia renale in forma sindromica o isolata. Non è stata osservata alcuna mutazione a carico dei geni SIX1 e SPRY1, né a carico dei target 3'UTR e dei relativi MIR analizzati. E' stata inoltre osservata una microdelezione di 1.4Mb (CNV) nel braccio lungo del cromosoma 17 in una paziente con una forma sindromica di ipodisplasia renale.

E' ipotizzabile che l'assenza di variazioni di sequenza nelle regioni geniche regolate dai microRNA e nei geni codificanti per i MIRNA osservata nella nostra coorte di pazienti con CAKUT, possa essere imputabile a frequenze di mutazione molto basse. Bisogna tuttavia considerare che l'interazione molecolare predetta per i microRNA dallo studio in silico, dovrebbe essere validata mediante studi funzionali per confermare il loro coinvolgimento durante il processo della nefrourogenesi.

L'identificazione di mutazioni causative di geni coinvolti nello sviluppo renale, ci permette di confermare il ruolo dei geni PAX2 e GATA3 nella determinazione delle CAKUT. L'analisi molecolare del gene PAX2 e GATA3 viene prevalentemente eseguita in pazienti con fenotipo completo delle sindromi associate (papillo-renale e iperparatiroidismo, sordità e rene). L'aver identificato mutazioni di questi geni anche in soggetti pediatrici non sindromici, è un'ulteriore conferma della necessità di estendere l'analisi anche ad una più ampia categoria di pazienti. I risultati di questa ricerca, aumentando le conoscenze relative ai meccanismi molecolari anche post-trascrizionali coinvolti nella determinazione di anomalie renali e ureterali, possono inoltre contribuire a meglio definire un "*targeted gene panel*" da analizzare per una più precisa e precoce diagnosi di queste patologie

## ABSTRACT

Congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT) are prominent diseases in the pediatric population in terms of prevalence and morbidity (3-6/1000 live births) and responsible of 50% chronic renal failure in pediatric populations. CAKUT encompass a wide phenotypic variability whose clinical relevance varies from less severe forms with mild renal functional impairment, to serious forms such as agenesis and renal hypodysplasia. Medical literature suggests that diseases could result from aberration in spatio-temporal regulation of nephrogenetic program, which involves a complex gene network. Mutations in several kidney developmental genes, have been associated with some of these anomalies, but much remains to be clarified on the etiopathogenesis of most CAKUT.

It has been recently confirmed the role of short non-coding RNA named microRNA (miRNA) as gene regulators during the mammalian nephrourogenesis. Studies of conditional loss of kidney miRNAs during embryonic development in mice, suggest that their deregulation may underlie CAKUT.

Mutational analysis was performed in 53 CAKUT patients for SIX1, PAX2, GATA3 and SPRY1 genes, which are involved in nephrogenesis. We used an integrated bioinformatics resource for animal miRNA-target interactions, to define which miRNA may be involved in the regulation of our selected kidney developmental genes. Analysis of miRNA target regions of these genes was performed in order to identify sequence variations that can modify homology/complementarity features to the targeted microRNAs and their translational mechanism. Sequence variation were checked also in miRNA gene identified by predictive bioinformatic tools

Five causative mutations have been identified in six patients with syndromic or isolated renal hypodysplasia: 4 mutations in the PAX2

gene and 1 mutation in GATA3 gene. No mutations were observed in SIX1 and SPRY1 genes, and also in 3'UTR targets and in related MIRNA genes analyzed. In one patient with syndromic hypodysplasia CGH array analysis showed a proximal microdeletion of about 1.4Mb in 17q12.

We hypothesized that the absence of sequence's variations, both in genomic regions regulated by miRNA and in genes codifying for miRNA, observed in our CAKUT patients, may be due to a very low incidence of these mutations. It must be considered that molecular interactions predicted by in silico studies for miRNA should be validated by functional studies to confirm their involvement during the nephrourogenesis.

Identification of causing-disease mutation in PAX2 and GATA3 genes confirmed their role in CAKUT phenotype. Molecular screening of PAX2 and GATA3 genes is mainly performed only in patients with complete phenotype of papillorenal syndrome and hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal disease syndrome.

The identification of these mutations in not syndromic pediatric subjects confirms the necessity to extend the analysis to a higher number of patients. The increased understanding of the post-transcriptional molecular mechanisms responsible of renal and urethral anomalies, will contribute to the identification of a "targeted gene panel" that could be used in an early and accurate diagnosis of these pathologies.

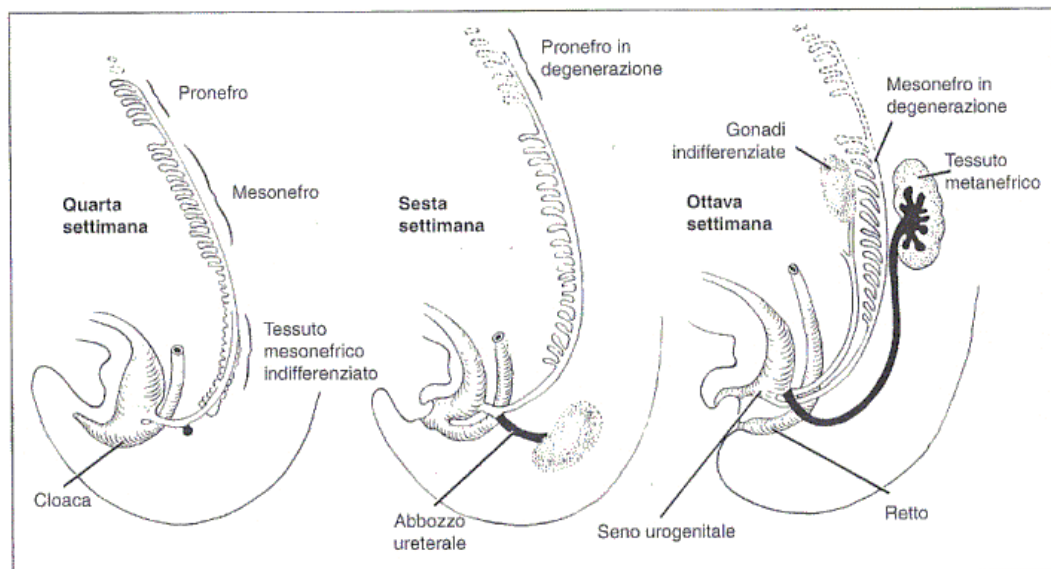
# INTRODUZIONE

## Embriogenesi Renale: Aspetti Morfologici

Nell'uomo l'embriogenesi renale avviene a partire dalla 3° settimana gestazionale (SG) e prosegue fino alla 34 SG.

La nefrogenesi e lo sviluppo delle vie escretrici è suddivisibile in tre fasi che si susseguono in senso spazio-temporale (fig1). In successione cranio caudale si identificano tre apparati escretori:

- *Pronefro* (in posizione cervicale-toracica tra il II e VI somite dell'embrione)
- *Mesonefro* (nel segmento addominale)
- *Metanefro* (in regione pelvica a livello del XXVIII somite).



**fig.1:** Evoluzione dei tre stadi del rene embrionale (pronefro, mesonefro e metanefro) tratto da F. P. Schena, F. P. Selvaggi: *Malattie dei Reni e delle Vie Urinarie*. Mc Graw Hill.,3 edizione maggio 2003.

Il passaggio da uno stadio embrionale al successivo è graduale, e termina con la degenerazione dell'apparato più primitivo.

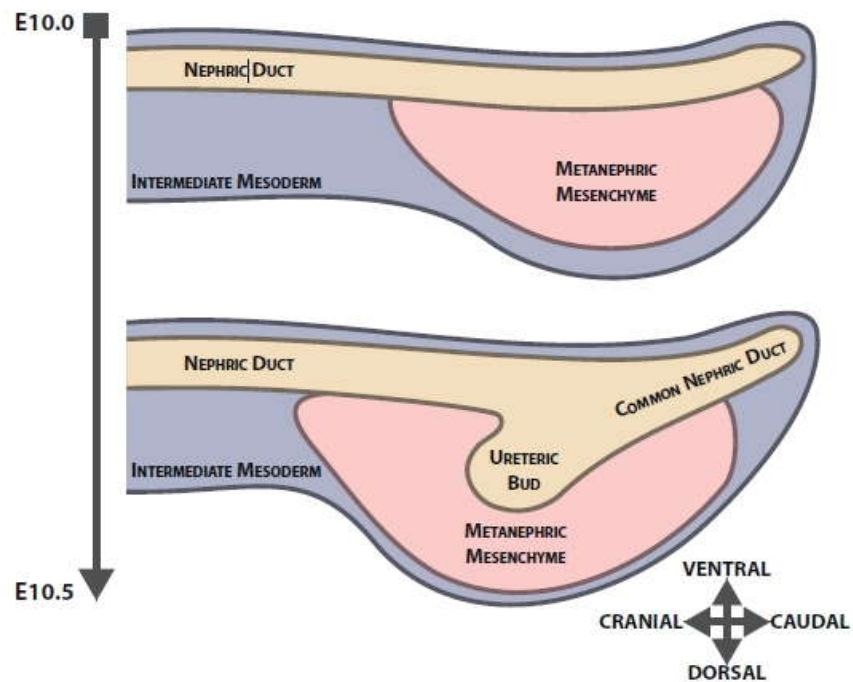
Il *pronefro* si sviluppa dalla fine della 3° SG, è un sistema di filtrazione del sangue molto semplice, che riversa il filtrato nella cavità celomatica mediante 6-10 tubuli rudimentali. Questa fase



rimane nell'uomo solo come un ricordo evolutivo, non è infatti funzionale. Nei vertebrati inferiori come i pesci, questo apparato escretore rimane funzionale nella vita adulta.

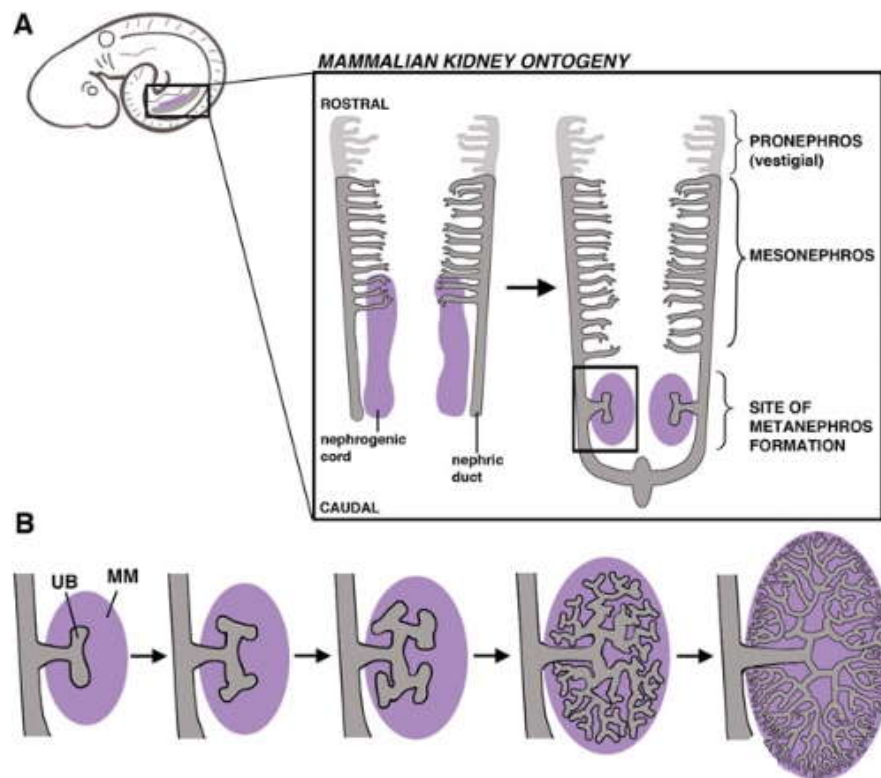
Nella fase successiva, tra la 4° e 5° SG, dal mesoderma intermedio prende forma il *mesonefro*, sistema di filtrazione più efficace, effettuata da glomeruli primitivi posti alle estremità di tubuli uriniferi che si allungano e sfociano in un dotto escretore chiamato dotto di Wolff, collegato a sua volta alla cloaca. In questa fase embrionale il dotto di Wolff ha funzioni analoghe all'uretere, che nel rene adulto convoglia le urine alla vescica. Il dotto di Wolff, essenziale per lo sviluppo del rene definitivo e dell'uretere, tuttavia non fa parte dell'apparato urinario definitivo, ma concorre nel maschio, alla formazione dell'apparato genitale, mentre nella femmina involge.

Il metanefro, terzo sistema di filtrazione, deriva dalla gemma metanefritica, un'estroflessione del dotto Wolffiano che origina caudalmente in prossimità dello sbocco in cloaca, verso la 5°-6° settimana di gestazione. Tale gemma metanefritica o abbozzo ureterale, invade la masserella di mesenchima che la affianca, detta blastema metanefrico, che deriva dalla porzione caudale della corda nefrogenica e ne induce la condensazione. L'interazione dei due elementi è fondamentale per indurre il corretto sviluppo del rene (fig.2).



**fig.2:** Primi stadi di interazione del dotto Wolffiano (o dotto nefritico) con il mesenchima metanefrico, e successiva induzione della gemma ureterale. Nell'uomo avviene alla 5° SG, nel topo invece al 10° giorno embrionale (E). [tratto da Blake J. and Roseblum N., *Seminars in Cell & Developmental Biology* 36 (2014) 2-12]

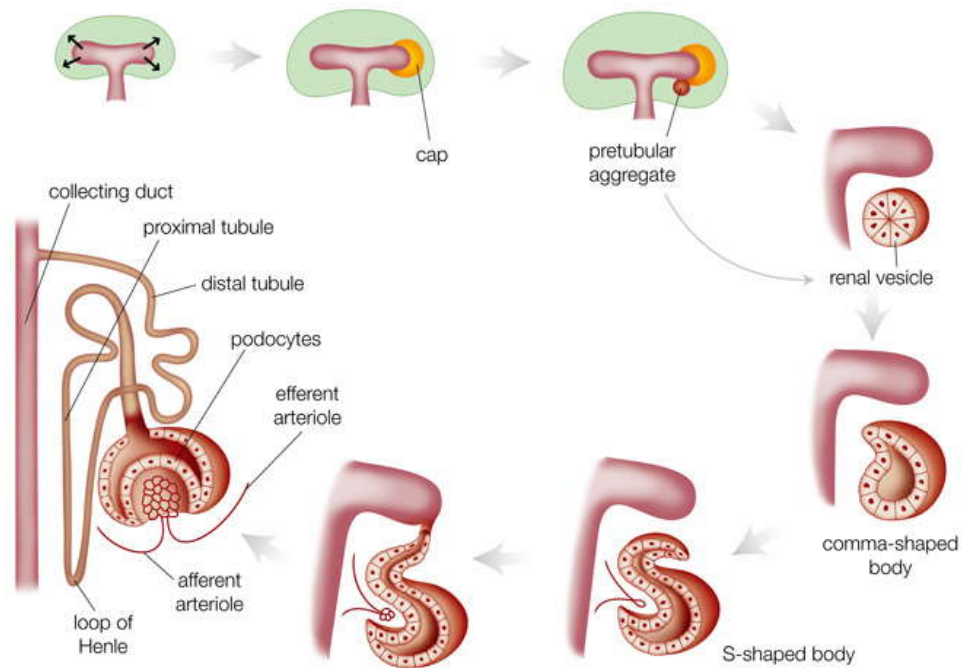
In questa fase il mesonefro regredisce, mentre l'interazione della gemma ureterale con il mesenchima metanefrico, a partire dalla 6° SG, permette l'allungamento e la ramificazione dell'abbozzo ureterale, che darà origine al sistema di raccolta delle urine costituito dai dotti escretori, pelvi e uretere (fig.3).



**fig.3:** A) Successione temporale delle strutture di filtrazione nei mammiferi: pronefro, mesonefro, metanefro. Dettaglio della formazione della gemma ureterale e del suo branching nel mesenchima metanefrico per dare origine al sistema di raccolta delle urine (Tratto da Mc Campbell K.K and Wingert R. Review in Biochem. J. (2012) 444, 153-168 )

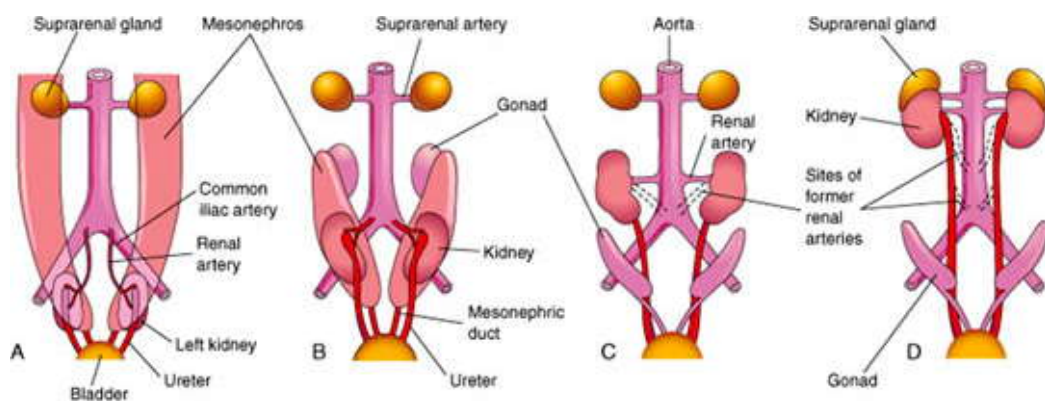
Il blastema metanefrico, sotto l'influenza dell'abbozzo ureterale, si condensa intorno a ciascuna estremità apicale dello stesso e subisce una trasformazione mesenchimo-epiteliale dando origine prima alle vescicole renali, poi a formazioni a virgola (comma shake body) ed infine ad S (s-shaped body), le quali evolvono in glomeruli e quindi in nefroni definitivi, completi di tubuli (fig.4).

Il primo strato di glomeruli si forma a partire dalla 7° SG, ma la ramificazione e la formazione dei nefroni continua in senso centrifugo, fino alla 34° SG.



**fig.4:** Ciascun apice originato dal branching dell'uretere induce la trasformazione mesenchimo-epiteliale del tessuto metanefrico. Si formano prima le vescicole renali, seguono i corpi a virgola (comma shaped body), i corpi a S (S-shaped bodies) ed infine i nefroni. Nel senso distale originano invece i tubuli prossimali e distali. [tratto da Moriz K.M. et al. Factors Influencing Mammalian Kidney Development: Implications for Health in Adult Life. Volume 196 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008]

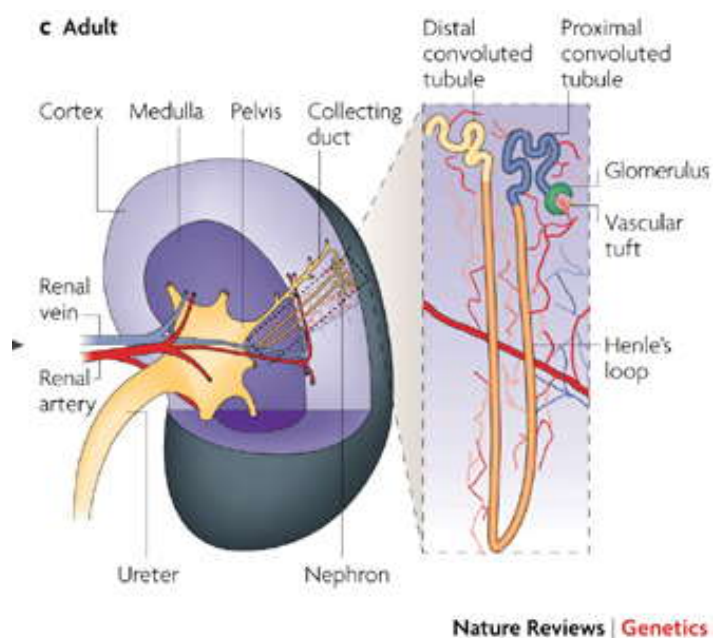
Il rene adulto è situato nella regione lombare; infatti tra la 4° e 8° SG l'abbozzo ureterale si allunga e il rene migra in senso cefalico, continuando il differenziamento del blastema metanefrico (fig.5).



**fig.5** Migrazione dei reni in senso cefalico dalla zona pelvica a quella lombare. Invece di "trascinare" il loro apporto di sangue, i reni inducono angiogenesi nel luogo di migrazione sempre più craniale e vi è la regressione dei rami più caudali. [Tratto da

SKANDALAKIS' SURGICAL ANATOMY: The Embryologic and Anatomic Basis of Modern Surgery - 2 Volumes. Cap. 23 Kidney and Ureteres. John E. Skandalakis et al. 2004]

La maturazione, crescita e differenziazione della corteccia nefrogenica (fig.6) si conclude in epoca post-natale [1].



**fig.6:** Anatomia del rene adulto e struttura del nefrone. [Tratto da Schedl A. Nature Review Genetics 2007]

## **Anomalie del rene e delle vie urinarie**

L'incidenza delle anomalie congenite del rene e del tratto urinario (CAKUT: Congenital Abnormalities of the Kidney and Urinary tract) è pari a 3-6/1000 gravidanze, costituendo la più frequente malformazione d'organo congenita nell'uomo. Tali anomalie possono presentarsi in forma isolata o in associazione a fenotipi sindromici anche complessi. Esistono più di 500 sindromi descritte con coinvolgimento renale o del tratto urinario [2]. La maggior parte dei pazienti manifesta CAKUT in forma sporadica, ma forme familiari sono state osservate con una frequenza del 10%. La presenza di storia familiare positiva per queste anomalie supporta l'influenza genetica nella determinazione della patologia.

Le CAKUT sono rappresentative di un'ampia varietà di disordini dello sviluppo renale, che includono malformazioni del parenchima dovute a displasia, ridotto numero di nefroni, agenesia, formazioni cistiche e disgenesia tubulare, ma anche anomalie ureterali come duplicità, ectopie, dilatazioni, reflusso ed ostruzioni. Le anomalie possono presentarsi sia bilaterali che unilaterali e possono coesistere più quadri malformativi contemporaneamente.

Dato l'ampio spettro delle caratteristiche cliniche delle CAKUT e la variabilità di espressione descritta in letteratura è indispensabile, per la diagnosi di queste patologie, raccogliere una corretta anamnesi familiare ed un'anamnesi del probando corredata dei dati riguardanti l'epoca prenatale. L'esame obiettivo del probando deve inoltre riguardare altri organi o apparati, in particolare l'apparato visivo ed acustico, in quanto le malformazioni possono fare parte di quadri sindromici.

I progressi nel campo delle indagini strumentali ed in particolare di quelle ecografiche hanno permesso di diagnosticare il 20-30% delle CAKUT già in epoca prenatale. La diagnosi precoce di malformazioni

renali quali il rene multicistico, le ostruzioni ureterali e l'idronefrosi, è fondamentale, in quanto è oggi possibile intervenire chirurgicamente già in epoca prenatale o subito dopo la nascita. Uno studio condotto dall'ITALKID (Registro Pediatrico Italiano dell'Insufficienza Renale) ha messo in evidenza che le malformazioni severe delle vie urinarie rappresentano l'80% di tutte le patologie che portano ad insufficienza renale terminale in età pediatrica [3]. E' quindi importante sia poter diagnosticare precocemente tali malformazioni, sia aumentare le conoscenze sui meccanismi molecolari che sottendono all'ontogenesi renale, per poter riconoscere eventuali disregolazioni geniche e le loro ripercussioni sul funzionamento dell'organo.

**Principali anomalie congenite del rene e delle vie urinarie** (fig.7 e fig.8):

**AGENESIA RENALE BILATERALE:** assenza di entrambi i reni. Ha un'incidenza di 1/5000-10000 nati ed è una condizione patologica grave, incompatibile con la vita.

**AGENESIA RENALE UNILATERALE:** assenza di un rene. Si presenta in 1/1100 casi alla nascita, con maggiore frequenza nel maschio. Si tratta di un arresto dello sviluppo della gemma ureterale o un mancato raggiungimento del blastema metanefrico. Questa condizione si associa nel 20-40% dei casi ad anomalie dell'apparato genitale, ma possono essere coinvolti l'apparato cardiovascolare, quello gastrointestinale ed il muscolo scheletrico. La condizione di agenesia monolaterale dovrebbe essere diagnosticata in epoca prenatale, poiché l'osservazione postuma, in età puberale, di un singolo rene potrebbe indurre ad una diagnosi errata. La condizione di monorene potrebbe non derivare da assenza di formazione della gemma ureterale, ma essere dovuta ad un'atrofia del rene controlaterale dovuta a rene multicistico o ipodisplasico.

**DISPLASIA RENALE:** il parenchima renale è costituito da tessuto indifferenziato, non funzionale e può avere uno spessore ridotto (aplasia) o presentare cisti.

**IPOPLASIA RENALE:** ridotto sviluppo dell'organo che appare, tuttavia, morfologicamente regolare (ipoplasia armonica). Il parenchima renale contiene nefroni ben differenziati, ma in quantità ridotta rispetto al rene sano. L'ipoplasia renale può essere associata ad anomalie degli ureteri.

**IPOPLASIA OLIGOMEGANEFRONICA:** rara condizione congenita e sporadica, caratterizzata da ipoplasia bilaterale con nefroni di dimensioni maggiori rispetto alla norma, ma in numero ridotto.

**MALATTIE CISTICHE DEI RENI:** parenchima renale con funzionalità ridotta o assente per la presenza di cisti. La definizione comprende numerose patologie renali con sintomatologia ed eziologia molto differenti. Per alcune malattie cistiche, a trasmissione mendeliana, sono stati identificati i geni malattia (malattia cistica della midollare, cisti renali e diabete giovanile, rene policistico) per altre l'eziopatogenesi è ancora sconosciuta (rene multicistico, rene con midollare a spugna).

**RENE SOVRANNUMERARIO:** condizione molto rara. Il terzo rene può derivare da una divisione precoce dell'abbozzo ureterale o dalla formazione di un doppio abbozzo ureterale. Spesso è asintomatico.



RENE A FERRO DI CAVALLO: fusione dei reni durante lo sviluppo. Nel rene a ferro di cavallo possono essere presenti strutture displasiche.

DUPLICAZIONE URETERALE: è la più comune malformazione dell'apparato urogenitale, riscontrata nello 0,8% degli studi autoptici. Nella maggior parte dei casi è monolaterale e asintomatica, scoperta casualmente durante indagini radiologiche; si associa più frequentemente rispetto alla popolazione generale, ad infezione delle vie urinarie, idronefrosi e lesioni pielonefritiche.

URETEROCELE: Dilatazione sacciforme dell'uretere terminale. Può essere ortopico, se situato alla base della vescica, o ectopico se sul collo vescicale o nell'uretra. Spesso provoca ostruzione del meato ureterale con idronefrosi del rene.

IDRONEFROSI o PIELECTASIA CONGENITA: Dilatazione del bacinetto renale e talora anche dei calici, con ristagno di urina per malformazione che ne ostacola il deflusso. Può causare l'atrofia per compressione del parenchima renale. Clinicamente può essere distinta in aperta, chiusa o intermittente a seconda che il deflusso dell'urina sia impedito parzialmente, totalmente o discontinuamente.

ECTOPIA URETERALE: anomalia caratterizzata dallo sbocco del meato ureterale sul collo vescicale o in sede ancora più caudale, con un'incidenza di un caso su 1900. Spesso si associa ad ureterocele e alla duplicità ureterale. Nel 10% dei casi è bilaterale e i reni drenati da ureteri ectopici sono di solito displasici.

MEGAURETERE: Uretere eccessivamente dilatato, con gradi di tortuosità variabili, dilatazione della pelvi e dei calici. Non permettendo una normale peristalsi, comporta stasi dell'urina e

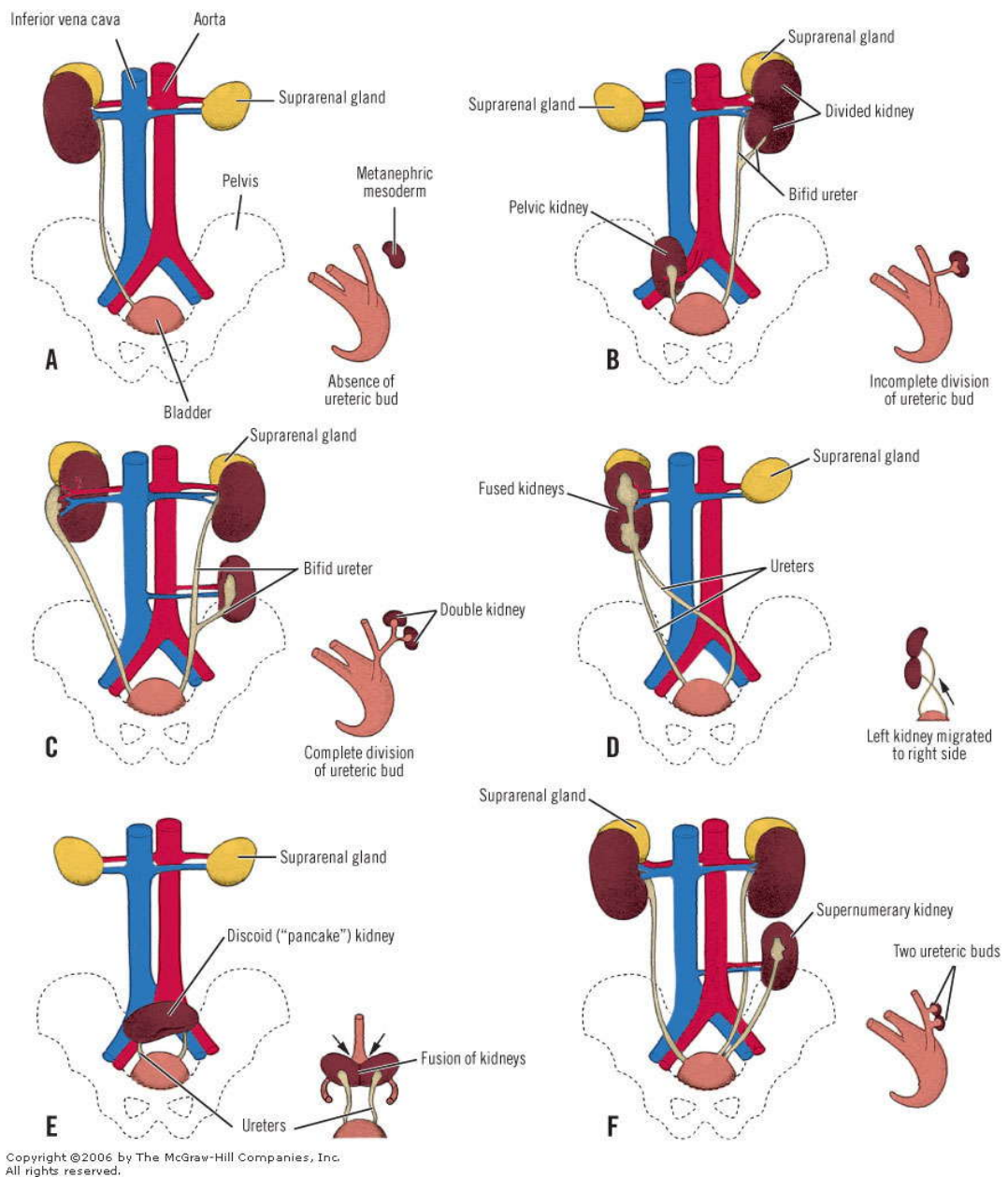
predispone a infezioni, formazione di calcoli e compromissione del parenchima renale. Il megauretere può essere di tipo ostruttivo o refluento.

UROPATIE OSTRUTTIVE: Predispongono a ricorrenti infezioni delle vie urinarie, dolore, ematuria e sofferenza renale. Si possono suddividere per posizionamento in:

- ostruzione della giunzione pielo-ureterale: è la più comune causa di uropatia ostruttiva delle vie escrettrici superiori, dovuta spesso a fibrosi o alterazione della parete muscolare della giunzione. È più frequente nei maschi. Comporta dilatazione del bacinetto e dei calici renali e se non viene corretta chirurgicamente, porta a danno renale.
- ostruzione della giunzione uretero-vescicale: consiste in un megauretere ostruttivo primitivo, causato da stenosi ureterale dovuta ad un ostacolo funzionale (es. ipertrofia del collagene con ipoplasia muscolatura ureterale).
- ostruzione cervico-uretrale: spesso identificate come valvole ureterali posteriori, ovvero pliche mucose che ostruiscono il lume uretrale a livello del veru montanum (collicolo seminale)

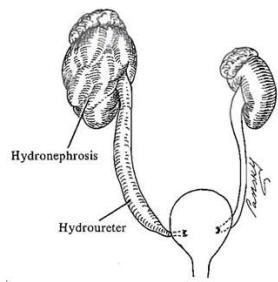
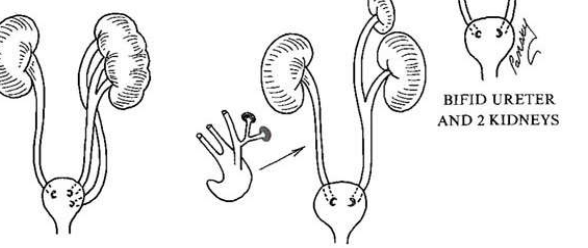
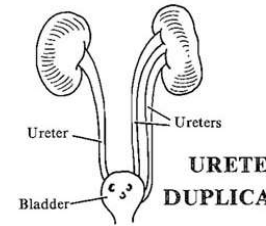
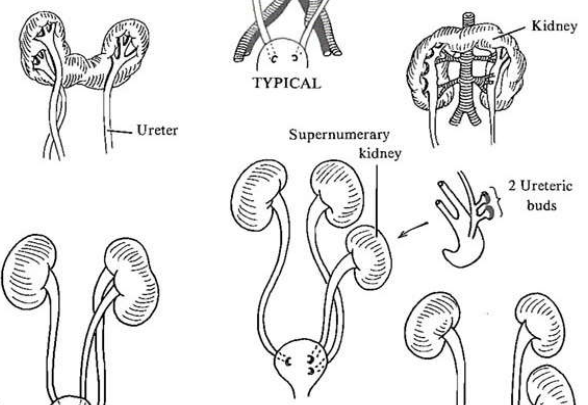
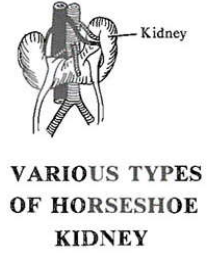
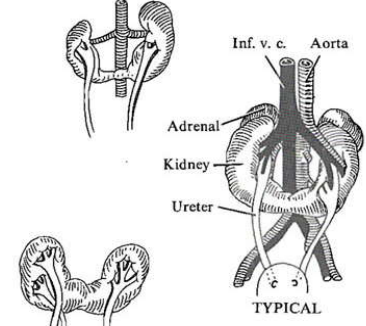
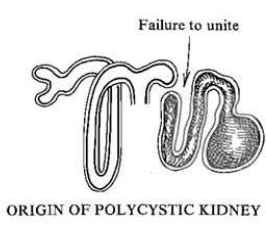
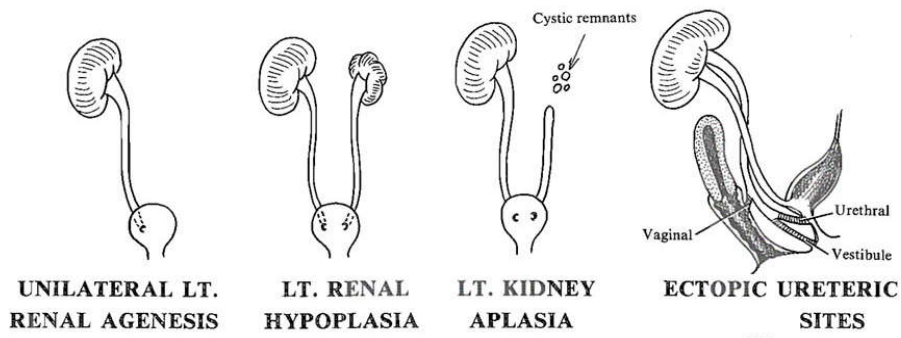
REFLUSSO VESCICO URETERALE PRIMITIVO (VUR): il VUR è una condizione patologica in cui la giunzione vescico ureterale diventa incompetente provocando il reflusso di urina nella vescica. Ha un'incidenza inferiore all'1/100 nella popolazione pediatrica sana. Si riconoscono cause congenite ed acquisite. La causa congenita più

frequente è il reflusso primitivo, che deriva da un'anomalia di sviluppo dell'abbozzo ureterale.



**fig.7:** Alcune anomalie del sistema urinario.

In basso a destra di ogni quadro malformativo, un piccolo disegno della probabile origine embrionale dell'anomalia. **A.** Agenesia Unilaterale. **B.** Rene con uretere bifido. **C.** Uretere bifido e duplicità renale. **D.** Ectopia ureterale e successiva fusione renale. **E.** 'Pancake' or rene a ferro di cavallo, originato da fusion dei reni in zona pelvica. **F.** Rene sovrannumerario sinistro dovuto a duplice sviluppo ureterale. [Tratto da SKANDALAKIS' SURGICAL ANATOMY: The Embryologic and Anatomic Basis of Modern Surgery - 2 Volumes. Cap. 23 Kidney and Ureters. John E. Skandalakis et al. 2006]



**fig. 8:** Anomalie congenite del rene e delle vie urinarie [modificato da REVIEW OF MEDICAL EMBRYOLOGY: BEN PANSKY, Ph.D., M.D. Copyright © 1982, Ben Pansky]

## **Gene Regulatory Network dello Sviluppo Renale**

Dal punto di vista molecolare, lo sviluppo del rene e delle vie urinarie è un processo molto complesso che coinvolge un ampio network di geni. La formazione dell'abbozzo ureterale, l'induzione del blastema metanefrico, il branching, la transizione mesenchimo-epiteliale e la formazione dei tubuli e dei glomeruli richiedono una precisa regolazione spazio-temporale dell'espressione di geni codificanti per fattori di trascrizione, molecole di adesione, fattori di crescita e morte cellulare.

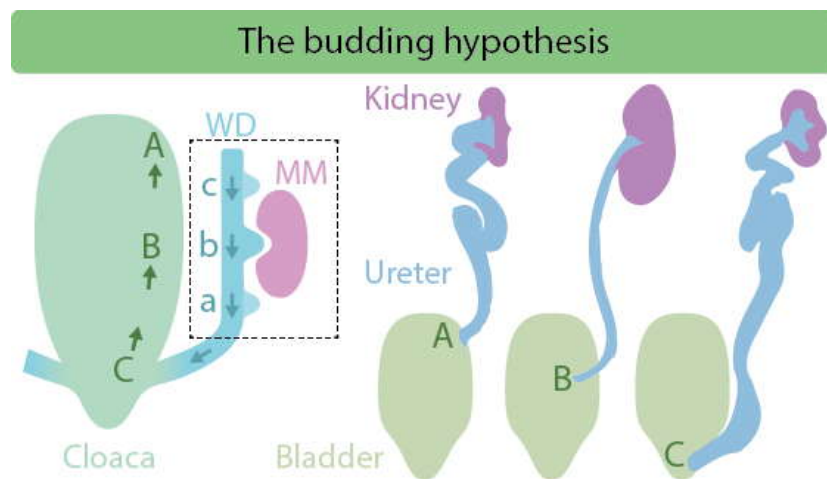
Alterazioni dell'espressione dei geni codificanti per tali fattori determinerebbero un difettoso cross talk tra la via ureterale in formazione ed il mesenchima metanefrico, che potrebbe causare malformazioni del rene o delle vie urinarie [2].

I differenti quadri malformativi osservati, dipenderebbero dal momento in cui l'alterazione genica avviene; quanto più precocemente viene alterato il processo nefrogenetico, tanto più importante sarà l'anomalia nefrourinaria che si instaurerà [4]. Quindi se il difetto genico si esprimesse al momento cruciale dell'interazione tra abbozzo ureterale e blastema metanefrico, il fenotipo potrebbe variare a seconda che vi sia blocco o stimolo proliferativo. Nella prima ipotesi si avrà una mancata induzione renale con conseguente agenesia. Il verificarsi della seconda ipotesi potrebbe determinare una duplicità ureterale o renale. Un'alterazione genica che bloccasse il branching ureterale o che influisse sulla transizione mesenchimo-epiteliale porterebbe ad uno spettro di caratteristiche fenotipiche che andrebbero dal mancato differenziamento del tessuto renale (displasia renale) alla formazione di cisti. Un evento di alterazione genica che avvenisse in una fase dello sviluppo più tardiva porterebbe ad anomalie di numero e di dimensione dei glomeruli (ipoplasia oligomeganefronica), anomalie di dimensione dell'organo (ipoplasia),

ectopie e malformazioni dell'uretere responsabili del reflusso ureterovescicale (VUR) primario.

Esiste inoltre una teoria detta "budding hypothesis" la quale, con il supporto di studi classici sulle duplicità renali, mette in evidenza l'importanza della posizione della gemmazione ureterale in relazione allo svilupparsi delle CAKUT. Questa ipotesi è stata generata in seguito all'analisi anatomica di 51 duplicità renali, che hanno permesso di dimostrare una correlazione della gravità di ipodisplasia con il mal-posizionamento dell'orifizio ureterale [5].

Secondo la budding hypothesis la posizione precisa in cui la gemma ureterale emerge dal dotto di Wolff, è fondamentale per il normale sviluppo renale e del tratto urinario [fig 9]. Questa ipotesi è in parte supportata dal fatto che mutazioni in geni coinvolti nell'induzione della gemma ureterale effettivamente portano a CAKUT [6].



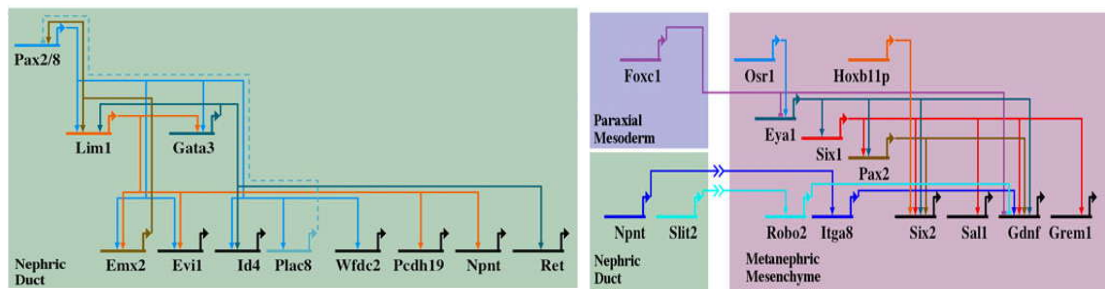
**fig 9** The budding hypothesis: l'emergenza ectopica (a, c) della gemma ureterale dal dotto di Wolff (WD) nel mesenchima metanefrico (MM) comporterebbe un'ectopica apertura ureterale nella vescica, con conseguente reflusso od ostruzione (A, C) e conseguente displasia tissutale. B normale sviluppo del rene e vie urinary [tratto da David Grote Thesis "The role of pax2/8 and gata3 transcription factors during mouse urogenital system development" Department of Biochemistry McGill University Montreal, Quebec, Canada, June 2009]

Nelle fasi precoci dello sviluppo del rene umano si susseguono una rapida proliferazione e differenziazione cellulare; la regolazione genica che sottende a tali processi è ancora poco conosciuta.

La maggior parte delle informazioni relative alla nefrogenesi e ai network genici di regolazione, sono state ottenute da studi effettuati su modelli animali, principalmente topi, ma anche *Xenopus* e Zebrafish con knock-out genici, oppure da studi su colture cellulari murine.

Il sito del GUDMAP (Genito Urinary Molecular Database Project-<http://www.gudmap.org/>) riporta un vero e proprio atlante di espressione genica con dati di localizzazione spazio-temporale di più di 3000 geni in associazione con fenotipi CAKUT e anomalie genitali nel topo. Sebbene molti di questi geni abbiano forti omologie con quelli umani, sono molto scarse le conoscenze sulla loro funzione e sull'effetto di una loro alterata espressione nell'uomo.

*Marcotte M et al* in una recente review riporta l'evidenza di un "Gene Regulatory Network" conservato nei vertebrati, che dirige le fasi precoci del primordium renale con l'induzione alla formazione del dotto di Wolff [7]. Gli autori sostengono che esista una vera gerarchia tra i fattori trascrizionali, che avrebbe come apice regolatorio Pax2/8, Gata3 e Lhx1 e che a loro volta, questi accendano un secondo livello di regolatori trascrizionali che attivano contemporaneamente effettori della morfogenesi e specializzazione cellulare. Seguirebbero poi segnali per l'elongazione e connessione del dotto alla cloaca e l'induzione del metanefro (terzo e definitivo stadio del rene embrionale). Ruolo centrale per questi processi viene dato all'attivazione e localizzazione del pathway Ret-Gdnf. Anche questo evento risulta regolato finemente da circuiti genici localizzati nel mesenchima metanefrico e nel dotto di Wolff [fig10].



**fig10** a) Sub-circuiti regolatori nell'induzione del dotto di Wolff. b) sub-circuiti regolatori che portano all'espressione di Gdnf nel mesenchima metanefrico. Freccie e linee interrotte indicano rispettivamente eventi regolatori positivi o inibitori, diretti o indiretti [tratto da Marcotte M, review 2014 ref 7]

Il sistema di signaling del gene RET (REarranged in Transfection) è il pathway maggiormente conservato tra topo e uomo e sembra essere indispensabile per un normale sviluppo di reni, ureteri, sistema nervoso periferico ed enterico. Sono molti gli studi su modelli murini che dimostrano che un'aberrante espressione di Ret è causa di un ampio spettro di anomalie renali, sottolineando l'importanza di una precisa regolazione di Ret durante lo sviluppo [8]. Nell'uomo si osserva che circa il 5% di pazienti con CAKUT presenta mutazioni nei geni del pathway di RET [9] e mutazioni del gene RET sono presenti nel 7% di feti morti con CAKUT con fenotipo severo [10].

RET è un recettore cellulare del tipo tirosin-chinasico che durante lo sviluppo renale è espresso nel dotto di Wolff assieme al co-recettore GFR $\alpha$ 1 e viene attivato dal ligando GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) espresso nel mesenchima metanefrico. Questa via di signaling attiva una cascata di geni e proteine che intervengono nel controllo della proliferazione, migrazione e apoptosi cellulare proprio nella fase di induzione della gemma ureterale e successivamente ad ogni step di branching della stessa.

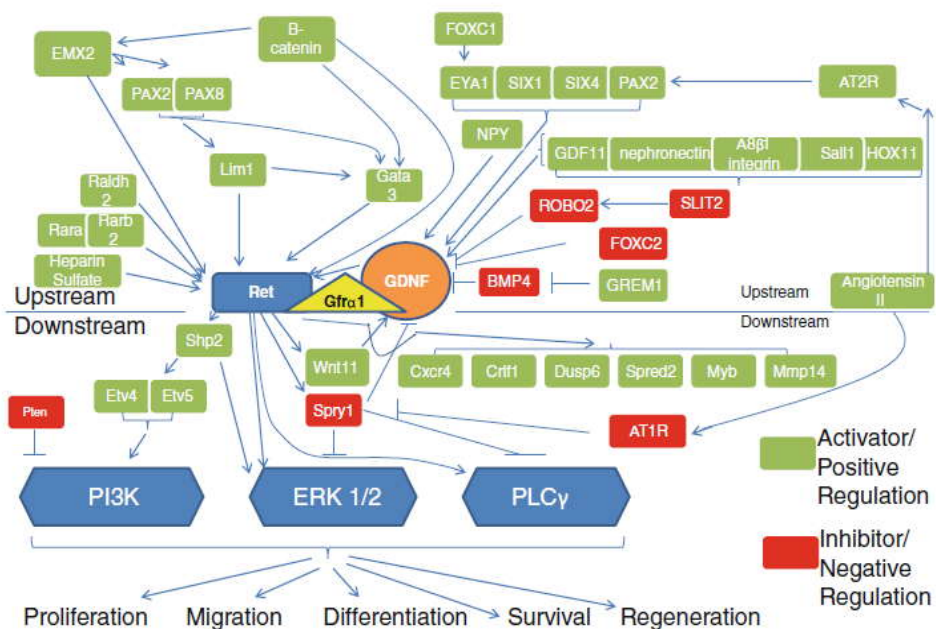
Il ruolo di Ret è critico anche per lo sviluppo del basso tratto urinario, regolando la formazione e la maturazione dell'uretere, il posizionamento e la connessione con la vescica nella giunzione



vescico-ureterale e la separazione dell'uretere dal dotto di Wolff. Una disregolazione di questi processi potrebbe portare allo spettro di anomalie del tratto urinario come l'idronefrosi, l'ostruzione della giunzione uretero-vescicale, il megauretere, l'ureterocele e il reflusso vescico-ureterale

Topi Ret-null esibiscono numerosi difetti ureterali, che includono assenza dell'uretere, ureteri piccoli, giunzioni anomale, inserzioni errate nella vescica [11].

Il pathway RET-GDNF è finemente regolato spazio-temporalmente da numerosi fattori trascrizionali e da inibitori della cascata tirosin chinasi (fig11); questa modulazione rende possibile la formazione di un'unica gemma ureterale e la giusta quantità di branching per poter dare origine alle strutture collettrici e al numero sufficiente di glomeruli che renderà funzionale il rene nascente. In posizione distale, invece, la giusta regolazione di RET rende possibile la corretta migrazione, maturazione e la giunzione dell'uretere alla vescica.



**fig.11** Rappresentazione schematica delle maggiori interazioni di geni e pathway associati al complesso signaling di RET. Sono segnate nella parte alta le interazioni upstream e in basso quelle che intervengono downstream alla via attivata da GDNF-RET [tratto da Davis et al. 2013 ref 8]

Tra i principali fattori che regolano upstream il pathway Ret-Gdnf vi sono anche geni le cui mutazioni nell'uomo si associano a CAKUT sindromiche e non. La variabilità fenotipica osservata in queste anomalie conferma l'estrema complessità del programma genetico che regola lo sviluppo del rene e delle vie urinarie, già suggerita dai modelli animali.

Tra i fattori trascrizionali che attivano la via dell'induzione vi sono i geni SIX1 ed EYA1 che sono associati alla sindrome Brachio-Oto-Renale (OMIM#608389) caratterizzata da ipodisplasia renale; PAX2 che è associato alla sindrome papillo-renale (OMIM #120330), caratterizzata da ipoplasia renale e reflusso vescico-ureterale; GATA3 che è associato alla sindrome ipoparatiroidismo, sordità neurosensoriale e displasia renale (OMIM#146255) e SALL1 che è associato alla sindrome di Townes-Brocks (OMIM #107480) con fenotipo renale di ipodisplasia o agenesia.

Il fattore di crescita trasformante BMP4, inibitore della via di Ret del topo, nell'uomo è associato alla micro-oftalmia sindromica di tipo 6° (OMIM #607932) con fenotipi renali di ipodisplasia.

Infine anche i geni del sistema Renina-Angiotensina (REN, AGT, ACE, AGTR1), di cui è ben noto il fine meccanismo di regolazione ormonale che controlla la pressione sanguigna, la volemia ed il tono della muscolatura arteriosa, sono implicati nei processi embrionali di induzione della bozza ureterale, nel branching, nella morfogenesi dei dotti collettori e nella differenziazione dei segmenti del nefrone. Mutazioni di questi geni si associano nell'uomo a disgenesia renale tubulare (OMIM #267430) [12].

Attualmente sono stati identificati quasi 30 geni causativi di CAKUT, (tabelle 1 e 2). Per alcuni di questi geni la recente candidatura è stata resa possibile grazie all'avvento delle tecniche di Next Generation Sequencing .

GENE	HUMAN Chr	human disease (OMIM #)	Human Renal Phenotype	Mouse kidney phenotype in GUDMAP (direct annotations)
BMP4	14q22-q23	Microphthalmia syndromic 6 (#607932), Orofacial cleft 11 (#600625)	RHD	hydronephrosis, abnormal renal/urinary system morphology
EYA1	8q13.3	Branchio-oto-Renal (#113650)	MCDK, renal aplasia	absent kidney, absent ureter,
GATA3	10p14	Hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia (#146255)	Renal dysplasia, VUR	absent ureteric bud
HNF1B	17q12	Renal cysts and diabetes syndrome (#137920), Maturity onset diabetes of the young 5 (#137920)	RHD frequently with cysts, single kidney, horseshoe kidney,	hydronephrosis, abnormal renal/urinary system morphology, renal glomerulus cysts
KAL1	Xp22.31	Kallmann syndrome 1 (#308700)	Renal agenesis	
PAX2	10q24.31	Papillorenal syndrome (#120330)	Renal Hypoplasia, VUR	hydronephrosis, absent kidney, abnormal kidney development, abnormal ureter morphology
RET	10q11.2	Hirschsprung disease(#142623), renal agenesis(#191830)	RA, RHD,	hydronephrosis, absent kidney, abnormal kidney development, abnormal ureter morphology
ROBO2	3p12.3	Vesicoureteral reflux 2 (#610878)	VUR, UVJ defect	abnormal renal/urinary system morphology, hydronephrosis, kidney cysts, ureterovesical junction obstruction
SALL1	16q12.1	Townes-Brocks syndrome (# 107480)	RHD, RA, VUR, Duplex collecting system	absent kidney, absent ureter, abnormal kidney development, abnormal renal tubule morphology, renal hypoplasia
SIX1	14q23	Branchio-oto-Renal (#113650)	RHD,VUR	absent kidney, abnormal kidney development, short ureter, renal hypoplasia, mpaired branching involved in ureteric bud morphogenesis

SIX2	2p21	Branchio-oto-Renal (#113650)	RHD	abnormal kidney cortex morphology, decreased renal tubule number, renal hypoplasia, kidney cysts, abnormal nephron morphology
SIX5	19q13.3	Branchio-oto-Renal (#113650)	RHD,VUR	-
SOX17	8q11.23	Vesicoureteral reflux 3 (#613674)	VUR, UVJO	-
TNXB	6p21.33	Vesicoureteral reflux 8 (# 615963), Ehlers-Danlos syndrome, autosomal dominant, hypermobility type (#130020)	VUR	-
UPK3A	22q13.31	Renal hypodysplasia, nonsyndromic, 1 (#610805)	Renal adysplasia, RHD	hydronephrosis, VUR, abnormal urothelium morphology
WNT4	1p36.12	Mullerian aplasia and hyperandrogenism(#158330),	RHD	hydronephrosis, absent kidney, abnormal kidney development, abnormal renal tubule morphology
CHD1L	1q21.1	-	RHD, VUR, UPJO, MCKD	-
DSTYK	1q32.1	Renal hypodysplasia, nonsyndromic (#610805)	RHD, UPJO	-
MUC1	1q22	Medullary cystic kidney disease 1 (#174000)	MCKD	-
UMOD	16p12.3	Hyperuricemic nephropathy, familial juvenile 1 (#162000), Medullary cystic kidney disease 2 (#603860)	MCKD	hydronephrosis, urolithiasis, abnormal kidney papilla morphology, abnormal juxtaglomerular apparatus morphology
ITGA3	17q21.33	Interstitial lung disease, nephrotic syndrome, and epidermolysis bullosa, congenital (#614748)	RHD	increased urine protein level, small kidney, urethra atresia, kidney cysts, absent ureter, abnormal kidney collecting duct morphology

**Tabella 1:** Geni associati a CAKUT sindromiche e non, ad eredità dominante. I fenotipi murini riportati possono riferirsi sia a mutazioni nulle, che missenso. Abbreviazioni: RA: renal agenesis, RHD: renal hypodysplasia, VUR: vesicoureteral reflux, MCKD: medullary cystic kidney disease, UPJO: ureteropelvic junction obstruction, UVJO: ureterovesical junction obstruction.

GENE	HUMAN Chr	human disease (OMIM #)	Human Renal Phenotype	Mouse kidney phenotype in GUDMAP (Genito Urinary Development Molecular Anatomy Project)
ACE	17q23	Renal tubular dysgenesis (#267430)	RTD	hydronephrosis, abnormal kidney morphology, abnormal renal glomerulus morphology, kidney cysts
AGT	1q42.2	Renal tubular dysgenesis (#267430)	RTD	hydronephrosis, abnormal kidney morphology, abnormal renal/urinary system physiology, kidney atrophy
AGTR1	3q24	Renal tubular dysgenesis (#267430), Hypertension, essential (#145500)	RTD	*abnormal renal/urinary systems (in MGI database)
REN	1q32	Renal tubular dysgenesis (#267430), Hyperuricemic nephropathy, familial juvenile 2 (#613092)	RTD	*abnormal renal/urinary systems (in MGI database)
FGF20	8p22	Renal hypodysplasia/aplasia-2 (# 615721)	bilateral RA	smaller, dysplastic kidneys
TRAP1	16p13.3	-	VUR, RA	-
FRAS1	4q21.21	Fraser Syndrome (#219000)	RA, RHD	absent kidney, kidney cortex cysts, abnormal kidney development, abnormal ureteric bud morphology
FREM2	13q13.3	Fraser Syndrome (#219000)	RA, RHD, UPJO	absent kidney, kidney cortex cysts
ITGA8	10p13	Renal hypodysplasia/aplasia 1	RA, RHD, VUR, Duplex collecting system	absent kidney, abnormal kidney development, abnormal ureter morphology, absent ureter
GREM1	15q13.3		RA	absent kidney, renal hypoplasia, single kidney, absent ureter
GRIP1	12q14.3	Fraser syndrome (#219000)	Duplex collecting system	absent kidney, abnormal kidney development, small kidney, single kidney, kidney cists
GFRa1	10q25.3		complex CAKUT phenotype	absent kidney, abnormal kidney development, abnormal ureter morphology, small kidney, single kidney

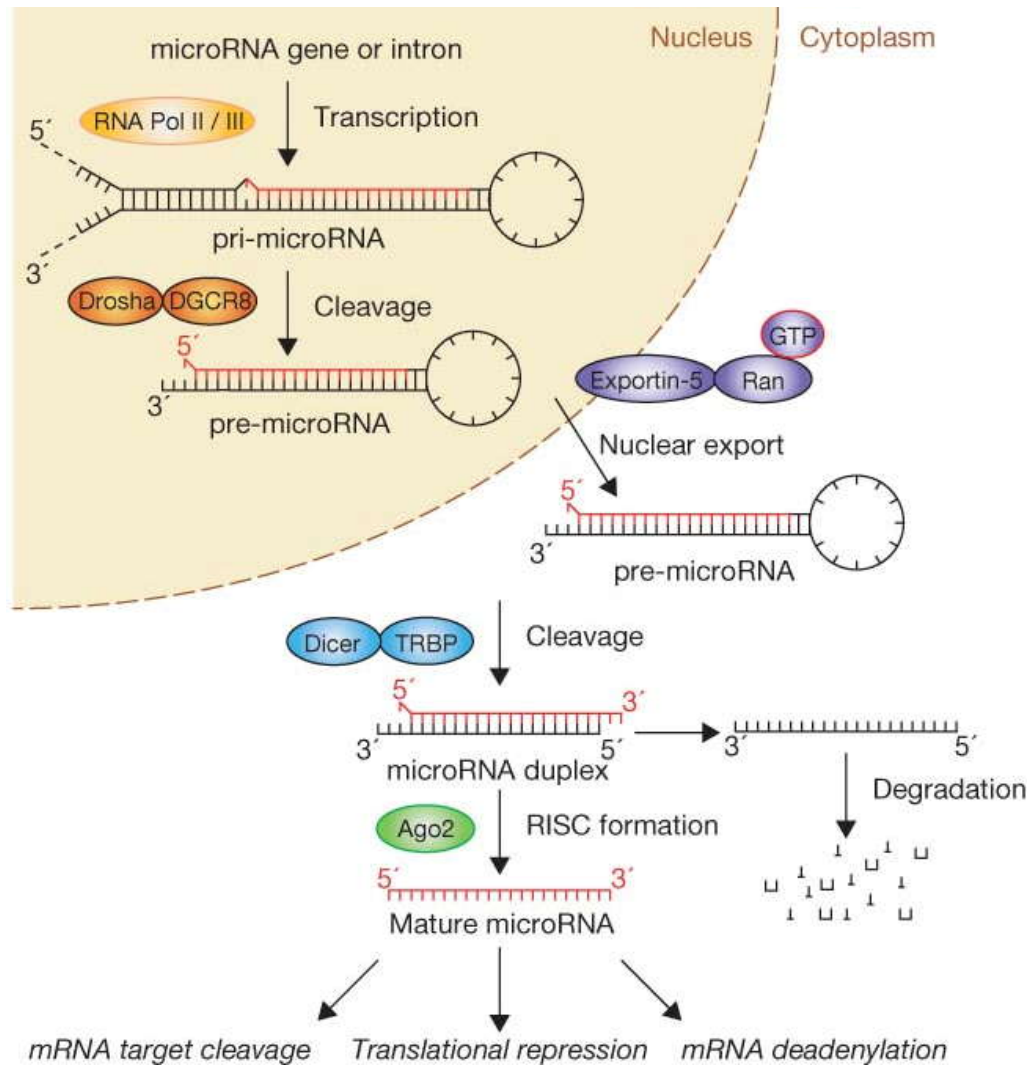
**Tabella 2:** Geni associati a CAKUT sindromiche e non, ad eredita recessiva. I fenotipi murini riportati possono riferirsi sia a mutazioni nulle, che missenso. Abbreviazioni: RTD: renal tubular dysgenesis, RA: renal agenesia, RHD: renal hypodysplasia, UPJO: ureteropelvic junction ostruccion, VUR: vesicoureteral reflux.

Tuttavia sebbene le conoscenze relative ai meccanismi molecolari che determinano le anomalie del rene e delle vie urinarie siano in continuo aumento, la maggior parte dei pazienti rimane priva di diagnosi genetica.

## **MicroRNA e sviluppo renale**

Negli ultimi 10 anni, lo studio della regolazione dell'espressione genica ha messo in evidenza un processo di regolazione post-trascrizionale, che sembra avere un ruolo anche durante lo sviluppo renale. Tale regolazione è dovuta a corte molecole di RNA non codificanti, chiamate microRNA, che legandosi a sequenze target complementari presenti nelle regioni 3'UTR dei trascritti genici, riescono a sottrarli alla traduzione sequestrandoli nel citosol o portandoli a degradazione con conseguente silenziamento genico [13].

I microRNA (miRNA) sono codificati da geni spesso localizzati in regioni introniche del DNA o intrageniche in reverse strand. Sono trascritti dall'RNA *polimerasi II* come pri-microRNA lunghi anche 1000 nt, e vengono processati nel nucleo da un complesso enzimatico chiamato *Drosha/DGCR8* a pre-microRNA di circa 70 nt con una forma stem-loop, che viene traslocata nel citosol e lì processata nuovamente per diventare miRNA maturo. Quest'ultimo taglio enzimatico del pre-miRNA avviene grazie all'RNase di tipo III chiamata *Dicer* ed è indispensabile per la sua attivazione funzionale. Il miRNA maturo è lungo circa 20-22 nt e viene incorporato in un complesso enzimatico chiamato *RISC* (RNA-induced silencing complex) diventando così in grado di reclutare le sequenze di RNA messaggeri con target complementari attraverso l'accoppiamento delle 8 basi nucleotidiche della sua seed-region (fig12) [14].



**fig 12** Patway di sintesi dei miRNA [Winter j, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature Cell Biology 11, 228-234;2009]

E' stato dimostrato che i miRNA sono implicati nella regolazione di importanti processi fisiologici quali: la proliferazione e differenziazione cellulare, lo sviluppo tissutale e l'apoptosi [15, 16].

I topi con knock-out dell'enzima *Dicer* muoiono allo stadio embrionale di 7 giorni, non completando neppure la gastrulazione [17]. Per poter comprendere la funzionalità dei miRNA ci si serve di sistemi di knock-out differenziale dell'enzima di maturazione dei miRNA, solo in alcuni lineage cellulari. *Bartram M et al.* hanno messo a punto un elegante esperimento di silenziamento condizionato del *Dicer* nei tubuli renali e nelle gemme ureterali di topo durante lo sviluppo,

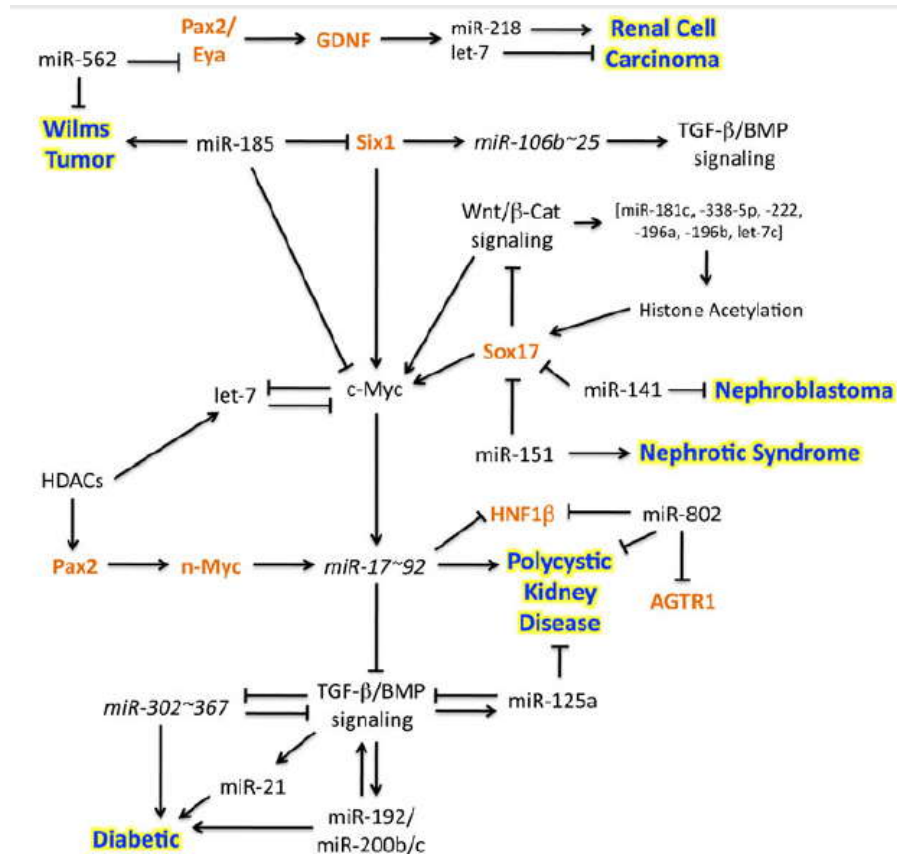


dimostrando che i reni murini deficienti di miRNA sono ipoplasici e presentano idronefrosi dovuta ad ostruzione ureterico-pelvica [18]. I fenotipi murini ottenuti sono del tutto sovrapponibili a quelli delle CAKUT nell'uomo. Questo esperimento mette in evidenza che i miRNA hanno un ruolo essenziale nella regolazione genica durante la nefrourogenesi, suggerendo che una loro disregolazione possa quindi portare a fenotipi CAKUT.

È già stata dimostrata la correlazione tra livelli di espressione di alcuni miRNA e numerosi stati patologici [19] e sono state identificate mutazioni di miRNA causa-malattia in alcune malattie monogeniche e multifattoriali [20].

Sebbene le conoscenze relative all'espressione dei miRNA nel rene siano in aumento, il ruolo di ciascun miRNA identificato rimane oscuro, e le informazioni a disposizione sulla funzione dei miRNA nello sviluppo renale umano sono limitate. Studi su miRNA sono stati condotti in pazienti con patologie renali quali il rene policistico, la nefropatia diabetica, la nefropatia da depositi di IgA, la nefrite lupica, l'ipertensione e il carcinoma renale, ma pochi sono i dati relativi alle CAKUT [21-27].

In una recentissima review *Marrone AK. e Ho J.* ricostruiscono un ipotetico pathway di regolazione reciproca tra i geni dello sviluppo del rene Pax2, nMyc, cMyc, Six1, TGF $\beta$ , Eya, Sox17 e alcuni cluster di miRNA (fig13), estrapolando dati spesso ottenuti da studi di espressione ed interazione su tumori [28].



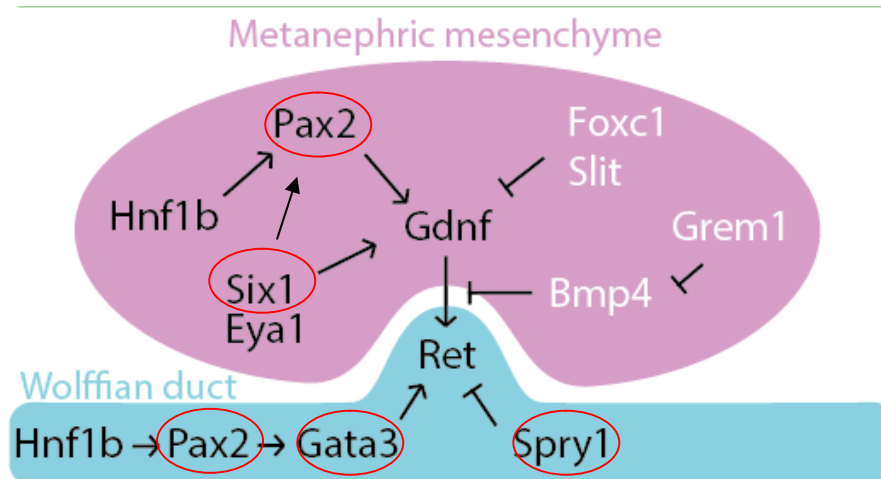
**fig 13** Ipotetico pathway regolatorio nel quale alcuni cluster di miRNA hanno una potenziale interazione con i geni associati alle CAKUT [tratto da Marrone et al, review 2014, ref 28].

Ad esempio: N-Myc è un gene implicato nello sviluppo renale murino, ed è nota una sua relazione con l'espressione di Pax2. Il cluster di miR-17~92 (omologo dall'umano MIR17HG), noto per essere coinvolto nei processi di proliferazione cellulare, sarebbe regolato a sua volta da n-Myc nei precursori dei neuroni, e la sua espressione appare up-regolata in diverse forme tumorali, anche renali oltre che nel modello murino di rene policistico dominante. Raccogliendo questi dati, *Marrone AK. e Ho J.* ipotizzano un ruolo regolatorio nello sviluppo renale, dovuto alla potenziale interazione tra Pax2/n-Myc/miR17~92.

Gli autori speculano infine che i miRNA possano essere responsabili della variabilità fenotipica osservata nelle CAKUT.

## Geni analizzati

Secondo la “budding hypothesis” il momento genico cruciale per il normale sviluppo di rene e vie urinarie è l’origine e il posizionamento della gemma ureterale. All’interno di questo pathway (fig 14), sono stati presi in considerazione, in questo studio, i geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1, di cui si discute in seguito. I primi tre geni sono già noti per associazione con quadri sindromici con coinvolgimento renale, mentre per SPRY1, non sono ancora riportate mutazioni nell’uomo associate ad un fenotipo renale. Tali geni sembrano avere una forte implicazione nella regolazione dell’induzione di un’unica gemma ureterale, ma anche nella regolazione dell’ allungamento e del branching, meccanismi che sottendono alla corretta formazione del metanefrone.



**fig.14** Rappresentazione schematica di alcuni geni coinvolti nella formazione della gemma ureterale e nella sua corretta inibizione, espresso nel WD e MM nelle fasi precoci dello sviluppo renale. Cerchiati in rosso i 4 geni analizzati in questo studio. Le frecce indicano le relazioni epistatiche o dirette di induzione o inibizione (modificata da David Grote Thesis “The role of pax2/8 and gata3 transcription factors during mouse urogenital system development” Department of Biochemistry McGill University Montreal, Quebec, Canada, June 2009)

## SIX1

Il gene umano SIX1 (SIX homeobox 1) localizzato sul cromosoma 14q23.1, è l'omologo del gene *sine oculis* (*so*) che in *Drosophila melanogaster* è responsabile della formazione del sistema visivo.

SIX1 codifica per un fattore trascrizionale importante per il normale sviluppo di diversi organi durante l'embriogenesi umana. Risulta fortemente espresso anche durante le prime fasi della nefrogenesi con un ruolo chiave sui processi di proliferazione, migrazione cellulare. Over-espressione di questo gene sono riportate nel cancro al seno, tumore di Wilms e nel rhabdomyosarcoma.

È riportata una sola sequenza di riferimento (RefSeq) per SIX1 nell'uomo anche se, in base allo studio dei trascritti, vengono riportate alcune isoforme alternative non ancora convalidate. Il trascritto di riferimento è composto da due esoni di 853 bp e 567 bp, rispettivamente, separati da un singolo lungo introne di più di 2Mb (fig.15).



**fig. 15:** rappresentazione schematica del gene SIX1.

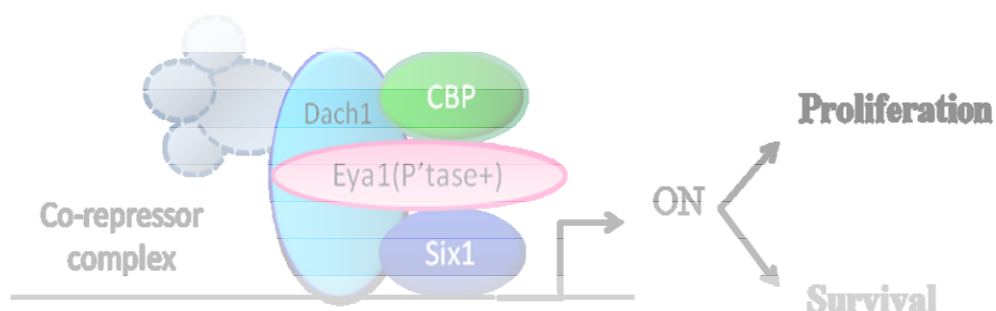
L'esone 1 codifica per i due domini funzionali del gene. L'esone 2 codifica per l'estremità C-terminale della proteina e trascrive per una lunga regione 3'UTR. È noto che le sequenze 3'UTR contengono segnali di regolazione della traduzione e localizzazione citoplasmatica e possono anche conferire una maggiore stabilità alle ribonucleasi.

Il fattore trascrizionale SIX1 è una proteina nucleare di 284 aminoacidi, appartiene alla categoria delle fosfoproteine e contiene due domini conservati tipici dei membri Six:

- un dominio Six-specifico (SD), che permette l'interazione proteina-proteina con i cofattori di SIX1
- un omeodominio (HD) che lega specificatamente il DNA, attivando la trascrizione dei geni target.

Durante lo sviluppo embrionale SIX1 interagisce con altre proteine per formare complessi trascrizionali la cui funzione può essere duplice: attivare la trascrizione di geni target (fig. 16), oppure silenziarli. La proteina SIX1 può quindi agire da attivatore o da repressore della trascrizione genica, ma solo dopo il reclutamento di cofattori opposti [29].

Nell'uomo la proteina SIX1 può avere un effetto sinergico con i co-attivatori della famiglia di proteine EYA, nell'attivare i propri geni bersaglio. In particolare durante la nefrogenesi, il complesso SIX1-EYA1, funge da effettore positivo attivando la trascrizione di geni target. Il complesso SIX1-DACH1, invece, promuove un effetto inibitorio per la trascrizione dei target. DACH1 è anch'esso un fattore di trascrizione fortemente espresso durante la nefrogenesi umana. Se al complesso Six1-Dach1 si lega anche Eya1, ancora una volta il complesso formato sarà attivatore della trascrizione [30].



**fig. 16:** rappresentazione del complesso di interazione Six-Eya-Dach (Modificato da Li et al., 2003).

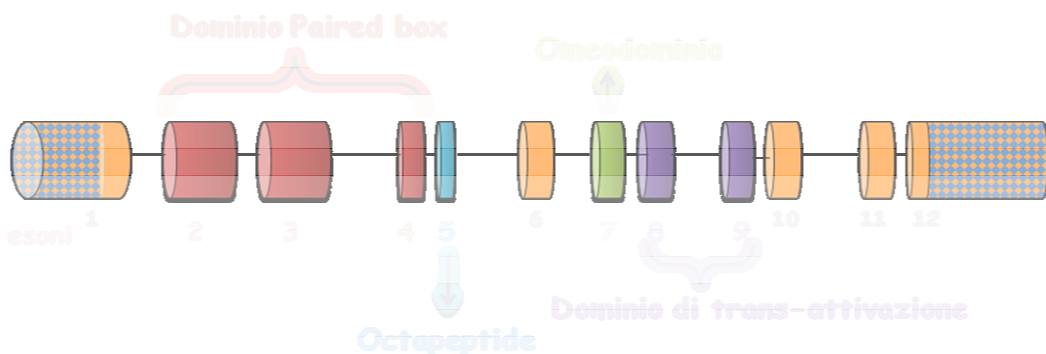
Le mutazioni di SIX1 si associano alla Sindrome Branchio-Oto-Renale (BOR) una malattia autosomica dominante rara, con penetranza incompleta ed ampia variabilità fenotipica. La BOR è caratterizzata da malformazioni dell'orecchio sia interno che medio o esterno, spesso associate a perdita dell'udito di tipo conduttivo, neurosensoriale e fistole branchiali laterocervicali. Il fenotipo renale può anche non essere presente (BOS). Le malformazioni renali riportate spaziano dall'ipoplasia renale lieve all'agenesia bilaterale e possono essere associate a duplicazione ureterale, idronefrosi e megauretere [31, 32]. Mutazioni di SIX1 si associano a questa sindrome solo nel 4% dei casi. Il principale gene-malattia della BOR è EYA1 con una frequenza di mutazione del 40%. Mutazioni in eterozigosi del gene Six1 nel topo, si associano ad un fenotipo sovrapponibile a quello osservato nella BOR [33]. Nel topo è sempre presente il fenotipo renale.

Sono note in letteratura 9 diverse mutazioni puntiformi del gene SIX1 nell'uomo, tutte localizzate nei domini funzionali. Le mutazioni p.delE133 e p.R110W, dovute ad alterazioni nell'esone 1 di SIX1, si associano ad un fenotipo renale alterato. Nel primo caso si tratta di una delezione di un acido glutammico nell'omeodominio HD della proteina, identificata in un unico paziente con ipodisplasia e reflusso vescico-ureterale (VUR). Nel secondo caso si tratta di una mutazione missenso nel dominio Six-specifico SD, identificata in una famiglia di cui solo il probando presentava insufficienza renale [34, 35].

## PAX2

Nell'uomo il gene PAX2 è localizzato sul cromosoma 10q24-25 e codifica per l'omonimo fattore di trascrizione, appartenente alla famiglia di geni omeotici paired-box.

E' costituito da 12 esoni che, conseguentemente a splicing alternativo, danno luogo a diverse isoforme di trascritti.



**fig.17** Struttura del gene PAX2: le regioni UTR sono rappresentate con colori a scacchi.

Gli esoni 2, 3 e 4 codificano per il dominio *paired box* altamente conservato, l'esone 5 codifica per il dominio *octapeptide* altamente conservato, l'esone 7 per l'*omeodominio* ed infine gli esoni 8 e 9 per un dominio di *trans-attivazione* (fig.17).

Nei database sono riportate almeno 5 isoforme di PAX2 identificate come: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*. L'isoforma *e* identifica il trascritto più lungo, infatti contiene tutti gli esoni dall'1-9. In generale, sia nell'uomo che nel topo, sono gli esoni 6 e 10 i più coinvolti nello splicing alternativo. Anche l'esone 12 presenta un sito di splicing variabile.

L'esatta funzione dei trascritti alternativi di PAX2 non è chiara [36].

Geni omologhi a PAX2 sono stati identificati anche in *Xenopus*, *Zebrafish*, *C. elegans*, nel riccio di mare e in *Drosophila*. In *Zebrafish*

Pax2 è espresso durante lo sviluppo delle strutture secretorie, dell'occhio e di alcune zone del cervello.

PAX2 nell'uomo è abbondantemente espresso durante lo sviluppo embrionale nell'occhio, orecchio, sistema nervoso centrale e tratto urogenitale. E' inoltre coinvolto nella regolazione di diversi geni come WT1, N-myc e p53, che sono up o down regolati in diverse forme tumorali quali linfomi, tumore al seno, alle ovaie, al polmone, al colon. E' inoltre indicato come un marker per la neoplasia renale [37].

Il ruolo critico di PAX2 nello sviluppo embrionale è stato scoperto attraverso lo studio di topi knock-out. Tali studi hanno evidenziato che delezioni in omozigosi di Pax2 portano a morte post-natale, per assenza di reni, ureteri e occhi [38].

Per quanto riguarda lo sviluppo renale, Pax2 gioca un ruolo fondamentale sia nei primi stadi di sviluppo del rene, con una forte espressione nei dotti Wolffiani e Mulleriani, sia nel branching della bozza ureterale e nell'induzione del mesenchima nefrogenico.

Nello sviluppo del metanefro l'espressione di Pax2 si attenua durante lo stadio S-shaped, prima che i nefroni siano completamente formati. Nei reni adulti l'espressione di PAX2 è di molto inferiore a quella dei reni fetali [36].

Mutazioni in eterozigosi del gene PAX2 nell'uomo sono associate alla Sindrome Papillo Renale (PAPRS), nota anche come sindrome rene e coloboma. Questa sindrome, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da coloboma del nervo ottico e ipoplasia renale che predispone all'insufficienza renale. La PAPRS è spesso associata anche ad anomalie congenite quali il reflusso vescico ureterale, l'ipoacusia, le malformazioni del sistema nervoso centrale, le anomalie articolari e cutanee. Viene riportata un'ampia variabilità



fenotipica con differenti gradi di penetranza, anche tra membri affetti della stessa famiglia.

Recentemente mutazioni di PAX2 sono state associate alla glomerulosclerosi focale segmentale ad esordio nell'adulto (OMIM: FSGS7#616002), un'alterazione istologica che può manifestarsi con proteinuria massiva tipicamente non selettiva, ipertensione sistemica, insufficienza renale, resistenza agli steroidi (Sindrome Nefrosica) [39].

Le mutazioni di PAX2 associate alla Sindrome Rene e Coloboma comprendono sia sostituzioni nucleotidiche, sia delezioni e inserzioni. Gli esoni più frequentemente mutati sono il 2 e il 3. La maggior parte di queste mutazioni causa frameshift con la formazione quindi di una proteina tronca, non più in grado di legare il DNA. Poche sono le mutazioni a carico degli esoni 5, 7, 8 e 9, che codificano per i domini *octapeptide* e *omeodominio*.

In letteratura, sono descritte mutazioni di PAX2 in pazienti con anomalie renali, ma non anomalie oculari [40, 41,42, 43]. Sono stati riportati anche casi di delezione totale del gene, dovuta ad una delezione cromosomica, in pazienti con solo ipoplasia renale o con il quadro completo della sindrome [44 45].

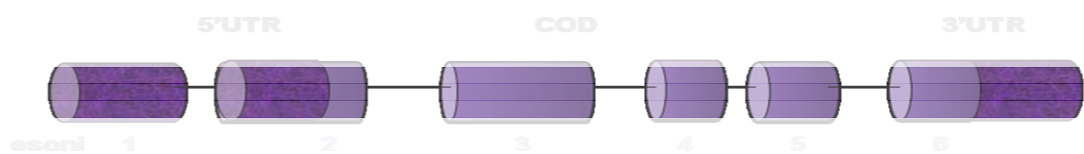
## **GATA3**

Nel genoma umano, il gene GATA3 (Gata binding protein 3) è localizzato sul cromosoma 10p15 e codifica per un fattore trascrizionale della famiglia dei dual zinc finger, coinvolto nello sviluppo embrionale dei vertebrati.

GATA3 è costituito da 6 esoni. L'esone 1 e parte dell'esone 2 sono regioni 5'UTR, parte dell'esone 2 e l'esone 3 codificano per i domini TA1 e TA2, mentre gli esoni 4 e 5 codificano rispettivamente per i

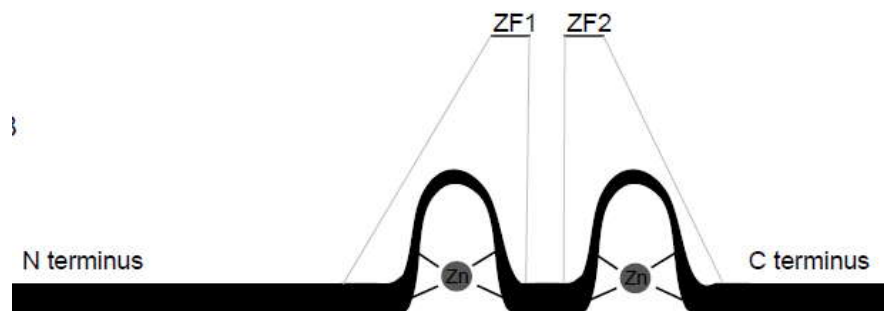
domini Zinc finger (ZF1 e ZF2, tipici del fattore trascrizionale). Infine l'esone 6 contiene una lunga regione 3'UTR (fig.18).

I due trascritti noti variano nella porzione 5' UTR e 3' UTR, avendo due splice alternativi rispettivamente nell'esone 1 e nell'esone 6, ma condividendo gli esoni 2-5. I trascritti codificano per due proteine che differiscono per la presenza di un acido glutammico in posizione 259. Una delle due proteine ha un aminoacido in più (da 443 a 444 AA). Il significato funzionale delle due isoforme non è chiaro.



**fig18:** Rappresentazione schematica della struttura del gene GATA3

Le proteine GATA nei mammiferi sono 6 (GATA1-6), contengono tutte 2 domini ZF: il primo ZF1, in posizione N-terminale, serve a stabilizzare il legame con altre proteine, il secondo ZF2 C-terminale lega direttamente le sequenze di DNA da trascrivere (fig19).



**fig.19:** Rappresentazione schematizzata della proteina GATA3, con i due domini ZF1 e ZF2

Gata3 è espresso durante lo sviluppo murino nel sistema nervoso centrale embrionale, nel sistema nervoso periferico, nella paratiroide, nell'orecchio interno, nell'occhio, nella cute, nel rene embrionale e

nelle ghiandole mammarie [46]. Studi su topo confermano che Gata3 è un gene regolatore dello sviluppo del rene embrionale, infatti la sua inattivazione risulta in un aumento della proliferazione cellulare con un'aberrante allungamento del dotto nefritico e fallimento dell'induzione del metanefrone [47].

L'aploinsufficienza di GATA3, dovuta a delezione completa del gene o a mutazioni puntiformi, si associa nell'uomo alla sindrome ipoparatiroidismo-sordità-malattia renale (HDR), malattia rara ad ereditarietà autosomica dominante. L'HDR è caratterizzata dalla triade ipoparatiroidismo, sordità neurosensoriale e insufficienza renale. L'ipoparatiroidismo può associarsi a ipocaliemia sintomatica con scarsi valori di ormone paratiroideo nel siero. La perdita dell'udito è di solito bilaterale e può variare da deficit lieve a profondo [48]. I sintomi della malattia renale comprendono la sindrome nefrosica, il rene cistico, la displasia, l'ipoplasia o l'aplasia renale, le deformità pelvico-caliceali, il reflusso vescico-ureterale, l'insufficienza renale cronica, l'ematuria e la proteinuria. In alcuni casi il fenotipo renale non è presente [49]. La prognosi dipende dalla natura e dalla gravità della malattia renale.

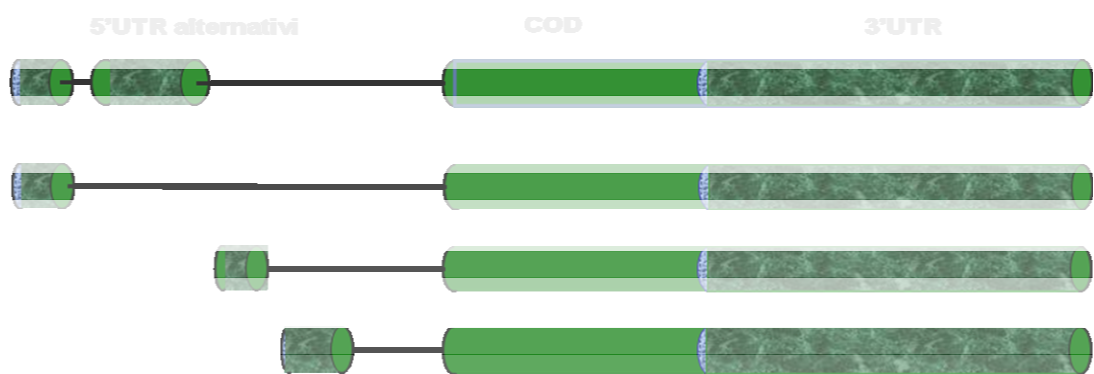
Mutazioni somatiche di GATA3 nell'uomo sono state osservate in pazienti con tumore al seno [50].

## **SPRY1**

Il gene umano SPRY1 (sprouty homolog 1) mappa sul cromosoma 4q27-q28 ed è l'omologo di sprouty1 antagonista del signaling FGF di *Drosophila*. Nel moscerino le mutazioni di Spry1 portano ad anomalie del branching della trachea.

SPRY1 codifica per una proteina di 319 aminoacidi che appartiene alla famiglia Spry (1-4) di regolatori inducibili del signaling dei recettori tirosin chinasi (RTK), indotti dai fattori FGF, EGF e GDNF.

Il gene SPRY1 è costituito da cinque esoni, gli esoni 1-4 sono regioni 5'UTR alternativamente trascritte, mentre l'esone 5 è l'unico codificante per la sequenza aminoacidica. Il gene quindi trascrive per quattro isoforme di mRNA con differenti 5'UTR, ma codificanti per una sola proteina di 319 aminoacidi (fig20). Poche sono a tutt'oggi le conoscenze relative all'espressione dei trascritti nei diversi tessuti e ai sistemi regolatori che li coinvolgono.



**fig.20** Rappresentazione dei 4 trascritti di SPRY1 [modificatodal database Gene di NCBI Gene ID: 10252, updated on 4-Jan-2015]

Le proteine Sprouty dei mammiferi contengono una regione C-terminale ricca in cisteine ed altamente conservata (circa 110 residui). Grazie a questo dominio, denominato “Sprouty Translocation Domain” (SpryTD o SPR), le proteine Spry possono traslocare dal citosol alla membrana plasmatica, rispondendo più prontamente all’attivazione degli RTK [51].

La regione N-terminale delle proteine Sprouty contiene un motivo conservato in grado di legare, in seguito a fosforilazione, il dominio SH2 di proteine bersaglio. Tale motivo è presente in un contesto N-terminale altamente variabile. Probabilmente è proprio la variabilità che permette alla sprouty protein di agire sia da inibitore che da regolatore positivo del signalling ERK/MAPK [51].

Nel topo, Sprouty1 è espresso durante la nefrogenesi e funge da regolatore dei segnali di trasduzione di GDNF, durante la formazione della bozza ureterale. Topi mutati *Sprouty1*<sup>-/-</sup> producono gemme ureterali soprannumerarie ed eccessivamente diramate, reni multipli ed idroureteri [52].

Il gene umano SPRY1 è espresso nel rene fetale, ma attualmente non sono note mutazioni di questo gene associate ad anomalie del rene e delle vie urinarie.

Le proteine Spry sono coinvolte nello sviluppo di numerosi organi nei vertebrati [53]. Nell'uomo SPRY1 è noto essere un tumor suppressor gene. Sono riportate mutazioni somatiche loss-of function del gene (nonsense e missense) in diversi tipi di cellule tumorali. Recenti studi dimostrano che SPRY1 è a sua volta target molecolare di geni tumor suppressor quali WT1 e del MIR-21 [54].

## SCOPO

Lo scopo di questo studio era aumentare le conoscenze dei meccanismi molecolari coinvolti nella determinazione delle anomalie congenite del rene e del tratto urinario, prima causa di insufficienza renale terminale nel paziente pediatrico. Questa ricerca si prefiggeva di implementare lo spettro delle correlazioni genotipo-fenotipo, anche attraverso la caratterizzazione fenotipica di nuove mutazioni causa-malattia, nonché di identificare i meccanismi di regolazione post-trascrizionale di alcuni geni coinvolti nella nefrogenesi, al fine di favorire una più precisa classificazione clinico-molecolare di questo gruppo eterogeneo di malattie da alterato sviluppo del rene e delle vie urinarie. Le CAKUT presentano un ampio spettro di variabilità fenotipica, ma anche una relativa omogeneità delle manifestazioni cliniche che può generare confusione e limitare la possibilità di giungere alla diagnosi, avvalendosi soltanto di criteri clinici. Inoltre nella maggior parte di queste malattie non sono stati ancora identificati geni-causativi e non è nota la modalità di trasmissione. Una diagnosi precoce e precisa delle CAKUT permetterebbe una prognosi ben definita anche a lungo termine, predicendo la possibilità di progressione ad insufficienza renale, la probabilità di recidiva sul trapianto e quindi la necessità di terapie mirate post-trapianto, nonché l'opportunità di proporre un trapianto da donatore vivente.

La ricerca è stata condotta su un'ampia popolazione pediatrica con malattie da alterato sviluppo renale e sono stati utilizzati tre differenti approcci:

- 1) valutazione della frequenza di mutazioni dei geni PAX2, GATA3, SIX1 e SPRY1,
- 2) ricerca di variazioni di sequenza delle regioni 3'UTR target per miRNA di questi geni,
- 3) ricerca di variazioni di sequenza dei geni codificanti per i MIRNA.

## MATERIALI E METODI



## CASISTICA

Sono stati arruolati in totale 53 soggetti, bambini e giovani adulti, con accertata anomalia congenita del rene e/o del tratto urinario (CAKUT) afferenti all'U.O.S.D di Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova. In questa casistica è stata inserita anche una collezione di 21 campioni biologici di pazienti con CAKUT raccolta per studi precedenti presso il Laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del Rene.

Tutti i pazienti arruolati sono stati ben caratterizzati dal punto di vista anamnestico (personale e familiare), clinico e strumentale per patologia renale ed extrarenale associata. Previo consenso informato per ogni paziente è stato effettuato un prelievo ematico per l'estrazione del DNA e lo studio genetico.

Lo spettro di anomalie presenti nei pazienti arruolati è rappresentativo di ipo/displasia renale uni/bilaterale associata o meno ad anomalie del tratto urinario, agenesia unilaterale, oligomeganefronia, cisti renali, doppio distretto pieloureterale, idronefrosi e megauretere.

## POPOLAZIONE di CONTROLLO

Sono disponibili, presso il Laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del Rene, 200 DNA (ottenuti in forma anonima) ottenuti da sangue di cordone ombelicale di partorienti donatrici a Padova. Tale coorte è rappresentativa di una popolazione non selezionata, e costituisce per noi una popolazione di controllo, su cui stimare le frequenze delle varianti identificate.

## DISEGNO DELLO STUDIO

Il DNA è stato estratto da 200  $\mu$ l di sangue periferico in EDTA mediante il kit cromatografico “QIAamp Blood Mini Kit” (QIAGEN), secondo i protocolli. La concentrazione e il grado di purezza del DNA sono stati determinati con Nanovue®, uno spettrofotometro a lettura capillare computerizzato, che permette di misurare l'assorbanza di soluzioni a 260 nm. Questo strumento determina la concentrazione di DNA in ng/ $\mu$ l e i rapporti 260/280, 260/230 utilizzando solo 1  $\mu$ l di soluzione.

Tutti i campioni di DNA ottenuti sono stati analizzati secondo il seguente schema:

- screening mutazionale delle regioni codificanti di alcuni geni implicati nello sviluppo renale (SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1) mediante HRMA e sequenziamento diretto
- analisi mutazionale di miRNA coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dei geni analizzati, selezionati mediante predizione bioinformatica, e dei loro predetti target 3'UTR, attraverso HRMA e sequenziamento diretto
- analisi bioinformatica predittiva delle variazioni di sequenza individuate e stima della frequenza in una popolazione di controllo.

### **SCREENING MUTAZIONALE DEI GENI DELLO SVILUPPO RENALE**

Lo screening mutazionale per i geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1 è stato eseguito con la tecnica di analisi delle curve di melting ad alta risoluzione con lo strumento Rotor Gene™ 6000.

Le regioni codificanti sono state suddivise in ampliconi con ampiezza variabile da 190bp a 401bp. Per tutti gli ampliconi che non permettevano una buona amplificazione e visualizzazione delle curve

di melt, si è provveduto a sostituire i primer. Nel caso in cui le condizioni di analisi del melt non fossero comunque ottimali, si è provveduto a eseguire il sequenziamento Sanger diretto.

Per il gene GATA3 sono stati disegnati i primer nelle regioni intron-esone fiancheggianti (di almeno 100 bp) per tutti gli esoni codificanti, utilizzando il programma *Primer3*, mentre per i geni SIX1, PAX2 e SPRY1 sono stati utilizzati i primer a disposizione presso il laboratorio di Immunopatologia e Biologia molecolare del Rene, disegnati con gli stessi criteri per precedenti studi.

Tutti i primer utilizzati sono riportati nelle tabelle sottostanti che seguono a pag. 50 e 51.

|

**TABELLE DEI PRIMER** (didascalia in fondo):

SIX1	Primer forward	Primer revers	bps
Es1.1	TTTGCAAAGCCTAAGGAGGA	CTCTCGTTCTTGTGCAGGTG	197
Es1.2	GCCGTCGTTTGGCTTTAC	CTTCTCGGCCTCCACGTAAT	199
Es1.3	GAGGAGAAAGGACGGCTTC	GTACCACTCCCGCAGGACAC	209
Es1.4	GGAGACCAGCTACTGCTTCAA	GCCTTGCTGCAGAACCTC	242
Es2.1	CCCAAAGTCCAGACCAGAAC	AGCCCGGGAGAGAATAGTTT	194
Es2.2	GGAATTCTCACCTCCCCAAA	CACTTAGGACCCCAAGTCCA	205
Es2.3	ACCAGCATCAGCTCCAAGAC	CGCAAACAACCTCCAGAAACA	186

PAX2	Primer forward	Primer revers	bps
Es1	CACCGTCCCTCCCTTTTCT	CGAGGGAGAGAAAAGAACGAAA	286
Es2	ACCCTGACTAATGGCCGGT	ACTTTTAGCCACGTCCTCCA	321
Es3	TCAGCAGCTCTGGAACCTG	CTGGAGTCCAGCCCTGAA	315
Es4	AGTGGGCATTTGATGTGTG	TTTCTGCCTTTCTCTAGGT	185
Es5	TTGGCCTACGATCACAACCTG	TCCAAGGACAAAGCATGTGA	236
Es6	TCTTCTGCCTGCCTGTCTTT	CCCCAAGCTATTTCCCTTGA	181
Es7	ACTGTTCCCTGTGCCTCTGCT	TGGCTATGCATGTGGTGTTT	330
Es8	TGCGTGGCATCAATAGAGAGC	CAGGAAGCACCTGGTTTTA	316
Es9	TTTCTCTCCGTGCAGTACC	AGACCATTCAGCAGCTCACC	259
Es10	CCCTGCAAACCACTGCTATT	AGGCTCTTCCAAGCAGTGTC	244
Es11	CTTGCAGGCGTCTGATCC	CTGCACTAACAAGCCTGTCC	252
Es12	AACTATTCTCCGGGGCAACT	CGGTAAGTAGTGGCGGGTTCAT	246

GATA3	Primer forward	Primer revers	bps
Es2.1	CACCGAAAGCAAATCATTCA	TCGGAGGGTACCTCTGCAC	364
Es2.2	CCTCAGCCACTCCTACATGG	CCTTCCTCGCCCATTCC	316

Es3.1	ATTCCCCAGGTGTCCCTGA	GCGGGAAGGTGAAGAGGT	303
Es3.2	CTTCTCCAAGACGTCCATCC	GAGCTGTACTCGGGCACGTA	345
Es3.3	AGCATGAAGCTGGAGTCGTC	ATGGGAAGAATGGCATCTCA	334
Es4	CCCAAAAGAGGAGGGAGAAG	TCCTGCAGAAAGCTGTCCTT	355
Es5.1	TGTGGACCACTTGCTAGTTTTG	TCCTCCAGAGTGTGGTTGTG	204
Es5.2	GTCCTGTGCGAACTGTCAGA	CATGGTGAGCGATTCACTTG	200
Es6.1	TGGAAACAGATCCCTGATCC	GTCAGCATGTGGCTGGAGT	321
Es6.2	CCTCAGCCACTCCTACATGG	TCGGAGGGTACCTCTGCAC	143
Es6.3	CCGCCCTACTACGGAAACTC	GGCTTCATGATACTGCTCCTG	225

SPRY1	Primer forward	Primer revers	bps
Es1	CGGAGGCGTGTCTT	CTTAGCTGGAAAGCAAGTTC	300
Es2	CCACAGAGAGAGGGAGAAAGAAC	GCGCTCGGCACACTG	401
Es3.1	GAGGTCATTACTAGGCGGT	GATCTGGTCTAAGGACAAAATA	301
Es3.2	TTGTGATCCAGCAGCC	GATCTGCTCAAAATG	301
Es3.3	ATAATAACTACGAGCACAGACACA	TTCCCACACTGTTCACAAA	301
Es3.4	TGATTGTGGATGACTTGAA	AGGTATCTAGAGCAGCAGTG	292
Es3.5	GCTCCAATGACGACGAAGG	AGGAGGTACAACCCACCTCC	288
Es3.6	GCAGATGTAAGAACTCCAACACT	GTGCAGCTTCCCAGTCC	274

TABELLE DEI PRIMER: Sequenze dei primer utilizzati per lo screening di SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1 suddivisione degli ampliconi e lunghezza in bp degli stessi. Tutte le sequenze sono annotate nella direzione 5'-3'. Per il gene SIX1 i primer sono stati disegnati per la Refseq NM\_005982.3. Gli ampliconi Es1.1 e Es2.3, sono stati analizzati direttamente con sequenziamento Sanger. Per il gene PAX2 i primer sono stati disegnati per le Refseq NM\_003987.3 e NM\_3988.3. Gli ampliconi relativi agli esoni 1,3,8,9,10,11,12 sono stati analizzati direttamente con sequenziamento Sanger. Per il gene GATA3 i primer sono stati disegnati per la Refseq NM\_0010022. Gli ampliconi relativi agli esoni 2 e 3 sono stati analizzati direttamente con sequenziamento Sanger. Per il gene SPRY1 i primer sono stati disegnati per le Refseq NM\_005841.2 e NM\_199327.2; la revisione di GENE-NCBI del 4 gennaio 2015 evidenzia la presenza di 2 nuove isoforme di trascritto NM\_001258039.1 e NM\_001258038.1 che in questo studio vengono coperte solo nell'esone codificante. L'amplicone es1 è stato analizzato direttamente con sequenziamento Sanger

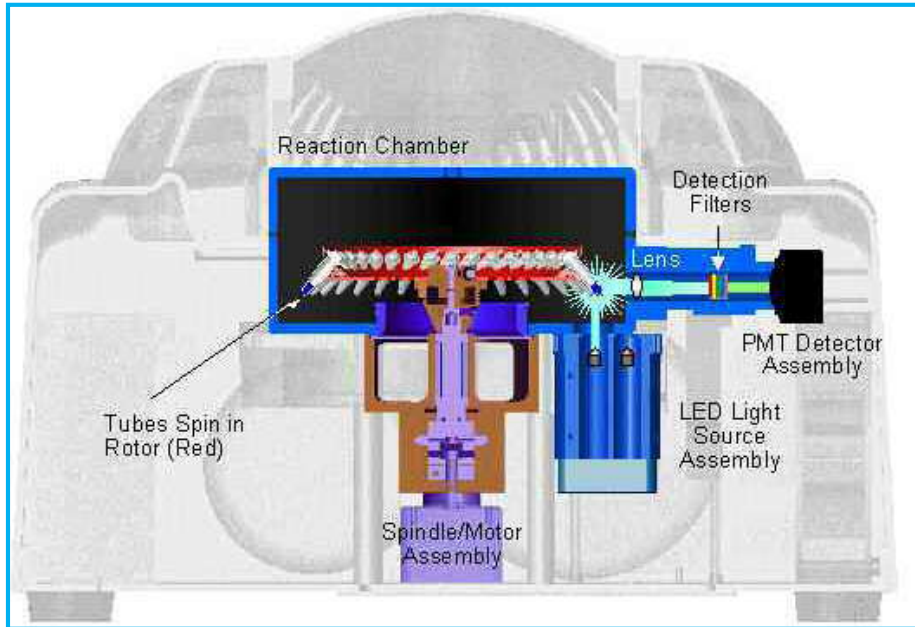
### HRMA

L'analisi delle curve di melting in alta risoluzione (High Resolution Melt Analysis o HRMA) si ottiene dalla misurazione e comparazione delle curve di melting di frammenti di DNA intercalati da specifici dyes saturanti. Tale analisi è possibile grazie a strumenti in grado di rilevare la diminuzione di fluorescenza dei DNA dyes liberati dalla denaturazione del DNA doppio strand all'aumentare della temperatura. La tecnica permette di condurre analisi mutazionale pre-sequenziamento, essendo in grado di processare più campioni contemporaneamente e di evidenziare variazioni di sequenza del DNA come sostituzioni, inserzioni, delezioni anche di una singola base. La sensibilità e la velocità della metodica consentono di snellire il lavoro di screening mutazionale, riducendo le spese legate al sequenziamento genico.

Rotor-Gene™ 6000® è un particolare termociclatore dotato di un sistema rotante nel quale vengono depositi i tubini da PCR, una camera termostata che garantisce un veloce riscaldamento e raffreddamento tramite l'immissione di aria attraverso delle resistenze, un sistema di eccitazione luminoso a LED e un sistema di detenzione del segnale emesso, il tutto collegato ad un computer ed interpretato da un apposito software.

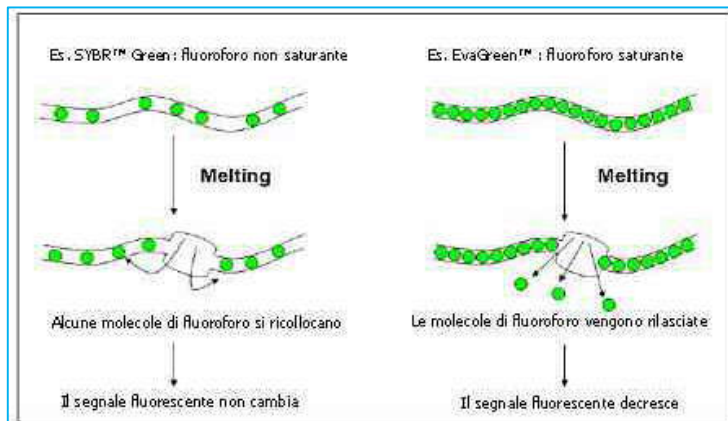
I campioni vengono amplificati in un volume finale di 20-25 µl in tubini da 0,1 ml, addizionando alla mix di reazione un Dye intercalante il DNA. Ad ogni ciclo di amplificazione i campioni vengono eccitati da un LED posizionato sul fondo della camera; l'energia viene trasmessa grazie alla base trasparente delle provette, la fluorescenza emessa passa attraverso i filtri di emissione posizionati ai lati della camera e viene catturata da un fotomoltiplicatore. Il percorso ottico fisso assicura l'uniforme eccitazione di ogni singolo campione durante la rotazione nella

camera (fig.21). Il Software di analisi permette di seguire l'andamento della reazione di PCR, e gli step di melt e HRM nel monitor del PC in tempo reale.



**fig.21:** Illustrazione dello schema ottico del Rotor-Gene™ 6000

E' stato utilizzato come Dye intercalante il "green" di nuova generazione EvaGreen™ Dye® che permette la saturazione totale del DNA senza inibire la reazione di PCR. La saturazione del DNA è importante perché impedisce fenomeni di ricollocazione del fluoroforo durante il melting. Questo è un inconveniente tipico degli intercalanti non saturanti, che non possono essere quindi utilizzati per i sistemi ad alta risoluzione del segnale di melt (fig. 22).



**fig.22** Modificato da: National Genetics Reference Laboratory (Wessex). Mutation scanning by high resolution melt analysis. June 2006.

Mix di reazione:

Le reazioni di PCR sono state eseguite su 40 ng di DNA genomico con primer specifici 0.3 $\mu$ M, utilizzando una mix di reazione ready to use specifica per HRMA (5X HOT FIREPol<sup>®</sup> EvaGreen<sup>®</sup> HRM Mix) con DNA Polymerase FIREPol<sup>®</sup> di tipo hot-start, EvaGreen<sup>®</sup> Dye e buffer, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs e BSA, in un volume finale di 25 $\mu$ l.

Schema di PCR e HRM generico

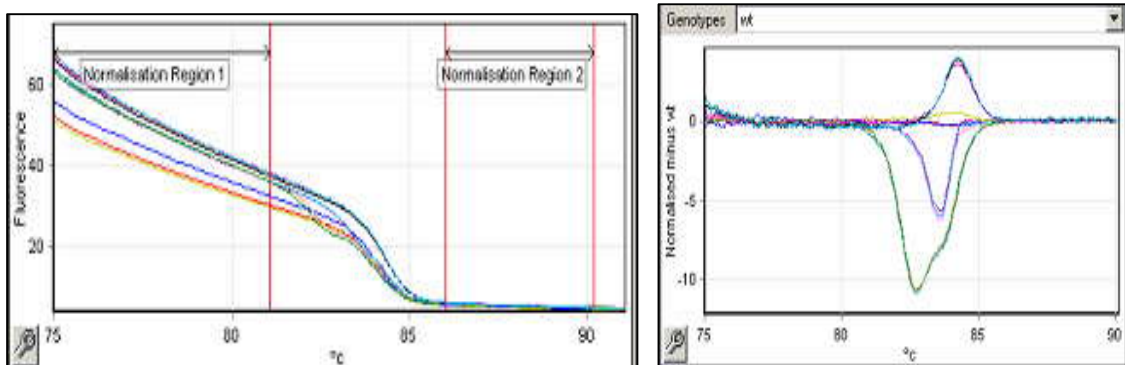
Viene prima eseguita una denaturazione iniziale a 95°C per 15minuti per attivare l'enzima. Poi seguono i seguenti cicli:

<b>Step di PCR</b>	<b>temperatura</b>	<b>tempo</b>	<b>Cicli di ripetizione</b>
<b>denaturazione</b>	95°C	15s	40
<b>annealing</b>	60-65°C	20s	
<b>allungamento</b>	72°C	20s	

Alla fine dei 40 cicli, la fluorescenza emessa dal dye incorporato nell'amplicone è massima (100%) sul grafico di output. In seguito viene eseguito uno step di stabilizzazione dell'amplicato a 53°C per 1 minuto e poi inizia la fase di HRM. E' stato impostato un innalzamento graduale della temperatura da 65°C fino a 95-98°C, a step di incremento di 0,03°C; alla fine di ciascuno step lo strumento ha rilevato la fluorescenza emessa dal fluoroforo liberato. Il picco massimo di decadenza della fluorescenza si ottiene negli step che si avvicinano all'effettiva temperatura di Melting della sequenza amplificata (temperatura di melting: T° specifica alla quale il 50% del frammento di DNA si trova allo stato di single strand).



Il software raccoglie e trasforma i dati di fluorescenza plottandoli su di un grafico con in ordinata la fluorescenza e in ascissa il tempo (fig. 23).



**fig.23:** Esempio di grafico grezzo di HRMA e grafico di differenziazione normalizzato.

Ogni amplicone generato dalla PCR si può considerare un duplex di DNA (omoduplex o eteroduplex a seconda che vi siano presenti variazioni di sequenza o meno) il quale esibisce un caratteristico percorso della curva di melting nel grafico suddetto.

Per avere le condizioni di sensibilità e specificità ottimali del metodo si sono caricati tutti i campioni in triplicato, compresi i controlli WT, noti come tali da sequenziamento Sanger. Inoltre il software del Rotor Gene™ 6000 ha permesso di normalizzare le curve, rendendo graficamente più visibili le differenze tra i campioni.

Si è ottenuta infine la genotipizzazione dei campioni incogniti in base alla similarità con i campioni di riferimento impostando la sensibilità del software di analisi al 90% di confidenza. Tutti i campioni che non sono stati riconosciuti dal software come WT, ovvero quelli con curva di melting diversa dai controlli, sono stati recuperati e sequenziati.

### Sequenziamento

Il sequenziamento è stato eseguito con metodica Sanger. Il prodotto di PCR è stato:

- sottoposto a check elettroforetico in gel di agarosio 2%, per accertarsi della dimensione della banda ottenuta e dell'assenza di prodotti di PCR aspecifici,
- purificato dai residui di primer mediante metodo enzimatico con *illustra™ ExoProStar™ 1-Step*,
- amplificato utilizzando *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*,
- purificato dall'eccesso di dideossinucleotidi marcati mediante l'utilizzo di colonnine *illustra™ Autoseq™ G-50Dye Terminator Removal kit*.

Tutte le manipolazioni sono avvenute secondo i protocolli forniti dalle ditte di produzione.

L'analisi delle sequenze ottenute è stata eseguita con sequenziatore capillare ABI PRISM® 3100. I cromatogrammi ottenuti sono stati paragonati alle sequenze di riferimento di ciascun gene, utilizzando il programma *SeqMan 2*, che permette di allineare più cromatogrammi contemporaneamente.

## **ANALISI MUTAZIONALE DEI TARGET E DEI MIRNA**

### Ricerca dei Target per miRNA

Per l'individuazione delle ipotetiche sequenze "consensus" target per miRNA nelle regioni 3'UTR geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1 si sono utilizzate le seguenti risorse bioinformatiche disponibili in rete: miRecords, miRBase.

**miRecords** è un programma di predizione che integra le informazioni ottenute da 11 tools di predizione di sequenze target consenso per miRNA (*DIANA-microT*, *MicroInspector*, *miRanda*, *MirTarget2*, *miTarget*, *NBmiRTar*, *PicTar*, *PITA*, *RNA22*, *RNAhybrid* and *TargetScan/TargetScanS*). Ciascun programma presente in *miRecords* fornisce una predizione indipendente di target molecolari per miRNA, in base a regole e principi appresi dalle interazioni note sperimentalmente, quali:

- la quasi totale complementarietà di 6-8 nucleotidi nella seed-region (regione di interazione tra il 5' dei miRNA e il 3' UTR del gene target),
- la conservazione inter-specie delle sequenze target,
- la forte stabilità termodinamica del duplex miRNA-mRNA.

**miRBase** è un database per la consultazione delle informazioni relative ai miRNA. E' stato utilizzato per ricercare informazioni sui miRNA individuati nella predizione di *miRecords*. Le informazioni presenti su questo database sono relative alla posizione nel genoma dei geni codificanti i MIR, alla sequenza dei pre-MIR e dei MIR attivi, alla loro struttura e alla loro espressione tissutale, quando disponibile.

Tramite *miRecords* si è ottenuta una lista di miR che ipoteticamente potrebbero avere target molecolari nel gene analizzato dai diversi programmi predittivi contenuti nel tool (fig. 24).

Sono stati selezionati i miRNA che hanno ricevuto il maggior numero di predizioni, dando la precedenza a quelli segnalati in almeno una pubblicazione su Pubmed. Gli studi riportati potevano riguardare la loro espressione su rene, o il gene per cui si ipotizzava l'interazione.

Per questi miRNA scelti sono state valutate le informazioni su localizzazione e sequenza disponibili su miRBase.

miRNA	Target Gene		Predictions										
			Interaction predicted (blue dot) / Interaction not predicted (grey dot)   Sort according to predictions made by this program										
Mature ID	Symbol	RefSeq	DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/TargetScanS
<a href="#">hsa-miR-571</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-639</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-20b</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-17</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-508-5p</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-22</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-493</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-185</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-769-3p</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-19a</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-296-3p</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-665</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-30b</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-130a</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-140-5p</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											
<a href="#">hsa-miR-450b-5p</a>	SIX1	<a href="#">NM_005982</a>											

**Fig. 24** Esempio di output della predizione di target: la prima colonna riporta il nome dei miR che ipoteticamente hanno target nelle regioni 3'UTR del gene di cui è riportato il nome nella seconda colonna e la RefSeq nella terza. Le restanti colonne danno il responso dei diversi tools di predizione interrogati. Le interazioni predette tra miR e target sono segnalate con il pallino azzurro.

L'analisi bioinformatica ha portato alla selezione di 8 miR, riportati in tabella 3, ipoteticamente coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dei geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1.

I dati relativi alla localizzazione genomica dei MIR selezionati, alla direzione di trascrizione, alla sequenza di riferimento e alla lunghezza del trascritto, sono stati identificati su MIRBase e sono riportati in tabella 4.

<b>GENE TARGET</b>	<b>MicroRNA</b>	<b>Numero di predizioni in MiRecords</b>	<b>Funzione nota</b>	<b>letteratura</b>
SIX1	hsa-miR-185	3/11	Un'alterata espressione del miR-185 potrebbe essere uno degli eventi centrali che porta alla disregolazione di SIX1 nel tumore umano	Imam JS. Et al. Oncogene 2010
	hsa-miR-571	4/11	miR-571 è doppiamente espresso nel tessuto tumorale renale, rispetto al tessuto renale normale	Yi Z. et al J Cancer Res Clin Oncol .2010
	hsa-miR-508-5p	3/11	Non nota	
PAX2	hsa-miR-218-1	4/11	miR-218 reprime in modo diretto l'espressione di Robo1, Robo2 e GLCE influenzando l'organizzazione dei vasi sanguigni durante lo sviluppo	Small E.M. et al. Circ. Res., 2010
	hsa-miR-185	4/11	Nell'uomo, miR-185 è significativamente più espresso nel carcinoma renale e nel tumore alla vescica in confronto ai due organi normali	Gottardo F. et al. Urologic Oncology, 2007
GATA3	hsa-miR-144	6/11	la meta-analisi su 28 studi sull'espressione tumorale di miRNA mediante microarray rivela che l'espressione di hsa-miR-144 è relata ad alcune nuove forme di cancro	Wang W. et al. Int J Cancer. 2011
	hsa-miR-135b	5/11	miR-135b silenzia i geni master regulators stat6 e GATA3 dei Th2	Matsuyama H. Blood October 31 2011
SPRY1	hsa-miR-29-c	6/11	Nel Topo miR-29-c si lega direttamente al 5'UTR di Spry1 e la sua over-espressione ne fa diminuire i livelli proteici	Long J. et al. The Am. Soc. for Biochemistry and Molecular Biology, 2011
	hsa-miR-21	6/11	miR-21 nel carcinoma renale gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'apoptosi, agendo su numerosi geni. Nel tumore alla prostata è stato confermato che SPRY1 sia un target molecolare del miR-21	Zhang A. et al. Urology, 2011 Darimipourain M. et al. Prostate Cancer and Prostatic Diseases (2011)

**Tabella 3:** miRNA selezionati. Sono indicati il nome del gene target, il nome del miRNA, il numero di programmi in miRecords che predicono un target relativo al miRNA in oggetto, la sua funzione e la relativa bibliografia.

<b>MIRNA</b>	<b>Chr</b>	<b>strand</b>	<b>refSeq</b>	<b>lunghezza</b>
MIR 571	4p16.3	forward strand intronic	NR_030297.1	96 bps
MIR 185	22q11.21	forward strand intronic	NR_029706.1	82 bps
MIR 508-5P	Xq27.3	reverse strand overlapping transcript intragenic	NR_030235.1	115 bps
MIR 218-1	4p15.31	forward strand intragenic intronic	NR_029631.1	110 bps
MIR 144	17q11.2	reverse strand, overlapping transcript	NR_029685.1	86 bps
MIR 135B	1q32.1		NR_029893.1	113bps
MIR 29C	1q32.2	intragenic intronic	NR_029832.1	112bps
MIR 21	17q23.1	forward strand overlapping transcript intragenic	Nr_29493.1	72bps

**Tabella 4:** Informazioni sui geni MIR selezionati

I miRNA scelti agirebbero rispettivamente miR571, miR185 e miR508-5p su 2 target per SIX1 raggruppabili in un unico amplicone; miR185 e miR218-1 su 2 regioni target per PAX2; miR 144 e miR135b su 1 regione target per GATA3, miR29C e miR21 su 2 regioni target per SPRY1.

Per i target 3'UTR individuati e per i geni codificanti i MIRNA predetti, sono stati disegnati i primer di amplificazione genica, secondo i criteri standard con il programma *Primer3* (tabella dei primer MIR e target ).

Amplicone	Primer forward	Primer revers	bp
MIR 571	ATGGCTGGGTGTGTATCTCC	GAAACCTCAGTGGAGCCAGA	233
MIR 508-5p	AGAGAATGGGAATGGAGTGG	GCCTATGGGAGTCCATTGAG	297
MIR 185	AGACCTGCTGGCTAGAGCTG	CAAGGGAAGGCCATAAACAG	231
TARGET unico per SIX1	ACTGCAGCGACTAGGGACAC	TGGGAAGGAAAATGCAAAAG	188
MIR 185	Vedi sopra	Vedi sopra	231
MIR 218-1	TTCCTCCTTCCCTCCATTT	CTCGGAGATGCCTAAAAAGC	259
Target di miR185 su PAX2	GGATCGTGACGACTCGAAAT	CGGGTTCCTTAAACGATTC	169
Target di miR218-1 su PAX2	TGTGGAAAGACGGTGTGTGT	CCATGTTCGTCATTTTGCAT	287
MIR 144	AGCTGTAGAGCAGGGAGCAG	CAGAGAGCTTCTTGGGCTTG	251
MIR 135b	GTGCTGAGAAGGGGAGTGAG	AAGCAAAGCCTCCTTCTGGT	254
Target unico per GATA3	TGAATCTGGACCCCATCTGT	CTTCTTGGCATCCTTCATGC	177
MIR 29C	CTGGAGTATTCGGCGTTGAT	TCCATCTTCCAGGAAACCAC	246
MIR 21	TGTTTTGCCTACCATCGTGA	AAGTGCCACCAGACAGAAGG	221
Target del miR 29C per SPRY1	CTTTTGGCCCCTTGGATAGT	CGTGTCACCTTATTTTCCGTTA	284
Target del miR 21 per SPRY1	TGGGCTTTTGTGTAGCCTTT	GGGGCCTATGCTAGGAAGAT	216

**TABELLA DEI PRIMER dei MIR e dei loro TARGET:** Sequenze dei primer utilizzati e lunghezza in bp degli stessi. Tutte le sequenze sono annotate nella direzione 5'-3'.

Si è quindi condotto per tali regioni genomiche l'analisi mutazionale con tecnica HRMA e sequenziamento Sanger (per i dettagli vedere i

paragrafi precedenti: *Mix di reazione, Schema di PCR e HRM, Sequenziamento*)

## **ANALISI BIOINFORMATICA PREDITTIVA DELLE VARIAZIONI DI SEQUENZA INDIVIDUATE E STIMA DELLA FREQUENZA**

La visualizzazione dei cromatogrammi ottenuti dal sequenziamento e il confronto con le rispettive sequenze di riferimento è stata eseguita con il programma *SeqMan 2*.

La caratterizzazione delle variazioni di sequenza non note, è stata eseguita previo allineamento multiplo dei geni omologhi per verificarne la conservazione evolutiva con *Ensembl Genome Browser* e *ClustalW*.

Per le sostituzioni nucleotidiche localizzate in regioni codificanti, si è condotta l'analisi bioinformatica predittiva dell'effetto della variante sulla proteina, mediante l'utilizzo dei programmi *SIFT*, *Polyphen2 translate tool*. Per le sostituzioni missense, si sono utilizzati inoltre, i programmi di predizione strutturale basati su homology modeling, *ESyPred3D* e *SWISS-MODEL*. Per la visualizzazione grafica 3D delle strutture si è utilizzato il software *PyMOL*.

Per sostituzioni nucleotidiche localizzate in regioni conservate non codificanti, si è effettuata la ricerca di elementi regolatori dello splicing (sito accettore, sito donatore e sito di biforcazione) e la ricerca di putativi consensus, enhancer o silencer (ESE, ESS) per i fattori dello splicing con il programma *Human Splice Finder* ed *SpliceAid*.

Tutte le risorse bioinformatiche che sono state utilizzate, sono disponibili liberamente in rete.

Le variazioni di sequenza osservate nella popolazione con CAKUT, sono state ricercate nel DNA dei genitori dei probandi quando



possibile. È stata inoltre stimata la frequenza delle variazioni di sequenza non note sulla popolazione di controllo, con tecnica HRMA e sequenziamento Sanger.

## RISULTATI

Nel corso dei tre anni dello studio sono stati reclutati in totale 53 pazienti con CAKUT di tipo sindromico e non; 20 pazienti erano stati oggetto di uno studio precedente ed erano perciò inseriti nella collezione di campioni biologici presente presso il laboratorio di immunopatologia e biologia molecolare del rene, del Dipartimento SDB.

Lo spettro di anomalie presenti nei pazienti arruolati è rappresentativo di ipo/displasia renale uni/bilaterale associata o meno ad anomalie del tratto urinario, agenesia bilaterale e unilaterale, oligomeganefronia, doppio distretto pieloureterale, idronefrosi, megauretere e VUR isolato, secondo la distribuzione riportata in tabella 5. Il range di età dei pazienti reclutati va da 6 a 22 anni, distribuiti in 35 maschi e 18 femmine.

Fenotipo CAKUT	Numero pz tot	Bilaterale	Associato a VUR	Associato ad altre anomalie delle vie urinarie	Associato a quadri sindromici
Ipo/displasia	33	29/33	16/33	2/33	15/33
Agenesia	9	1/9	3/9	-	1
Oligomeganefronia	1	1/1	-	-	1/1
Doppio distretto	3	-	-	3/3	-
Idronefrosi	2	2/2	1/2	1/2	-
Megauretere	2	-	-	2/2	1/2
Solo VUR	3	3/3	-	-	-

**Tabella 5:** Distribuzione dei fenotipi CAKUT. NB: alcuni pazienti presentavano più anomalie, diversamente associate.

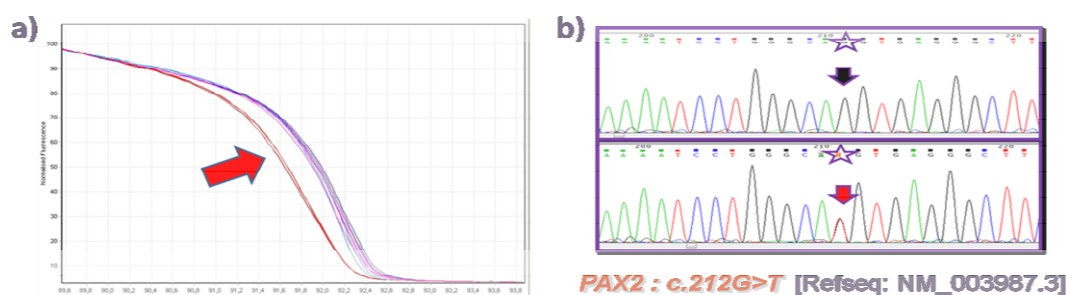
Lo screening mutazionale per SIX1 non ha evidenziato alcuna mutazione causativa in nessuno dei pazienti. Non sono stati osservati inoltre polimorfismi noti o non noti.

Per 20 pazienti di questa coorte, lo screening di PAX2 era già stato eseguito in uno studio precedente ed erano state evidenziate due 2 mutazioni causative. Nei 33 pazienti aggiunti in questo triennio, sono state identificate 4 variazioni di sequenza di seguito descritte:

- c.69delC già nota in letteratura
- c.212G>T, c.418C>T non nota
- c.153\_155delCTinsTT non nota.

La mutazione nota c.69delC è localizzata nell'esone 2, che è un hot-spot mutazionale di PAX2, e determina la produzione di una proteina tronca. Questa mutazione, insorta *de novo*, è stata identificata in una paziente con ipodisplasia renale bilaterale, VUR e ipoacusia.

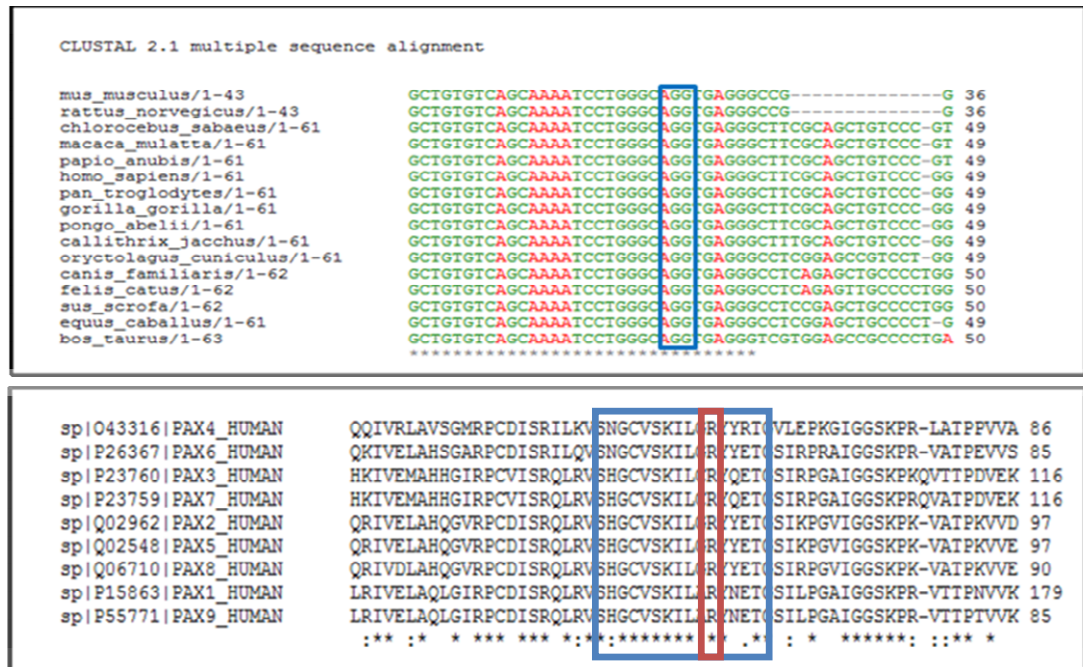
La sostituzione missense c.212G>T è stata osservata in un soggetto con un quadro fenotipo riconducibile alla sindrome Rene-Coloboma. Il paziente, al momento del reclutamento, presentava insufficienza renale cronica secondaria ad ipodisplasia renale bilaterale, VUR bilaterale, lieve ipertrofia del collo vescicale, coloboma all'occhio destro e una fossetta colobomatosa all'occhio sinistro. La sostituzione nucleotidica, localizzata nell'esone 2 del gene (fig.24), risulta essere *de novo* e determina la variazione aminoacidica p.Arg71Met nel dominio paired-box della proteina.



**fig.24** a) Output di analisi HRM ottenuto per la variante c.212G>T nel paziente (in rosso) e nei controlli; b) relativi cromatogramma di sequenza (WT in alto, mutato in basso)

La caratterizzazione della variante c.212G>T (p.Arg71Met) è stata eseguita secondo le linee guida internazionali: verifica della sua

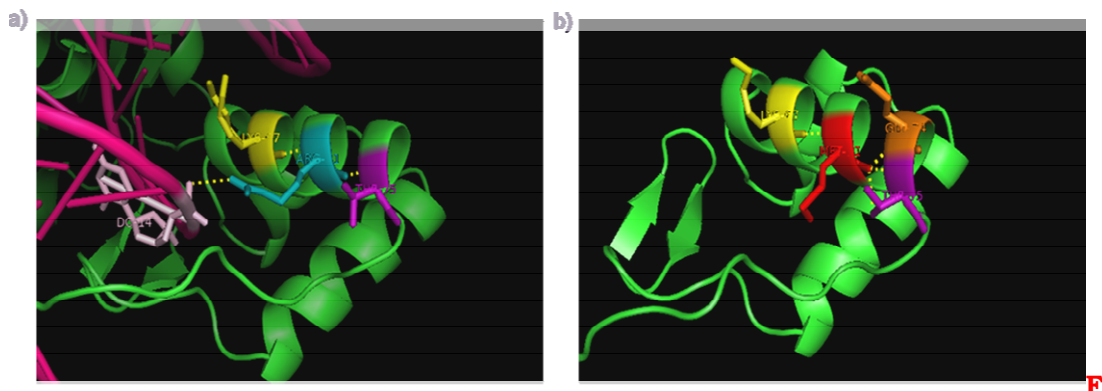
assenza in 200 DNA di controllo, studio della conservazione filogenetica (*ClustalW*, fig.25 in alto), analisi bioinformatica predittiva (*Polyphen2*: probably damaging, *SIFT*: deleterious).



**fig.25:** In alto Output di ClustalW per l'allineamento della sequenza del gene PAX2 in 17 specie di mammiferi euteri. In basso l'allineamento delle sequenze aminoacidiche, relative al dominio paired, delle nove proteine della famiglia PAX.

I programmi *Esypred3D* e *SWISS-MODEL*, hanno permesso di ricostruire un modello tridimensionale del dominio paired mutato, grazie all'omologia di sequenza con la proteina PAX5, di cui esistono 2 strutture ottenute sperimentalmente e depositate nella banca dati proteica PDB (*PDB:1K78*, *PDB:1MDM*). Nell'uomo il dominio paired è conservato in tutta la famiglia di fattori trascrizionali PAX1-9 (fig. 25 in basso). Con il programma di visualizzazione *PyMol* sono stati evidenziati i legami ionici esistenti per arginina 71(Arg71) sulla proteina wild-type, e quelli predetti dai modelli di omologia per la proteina mutata metionina 71(Met71). L'amminoacido WT Arg71 risulta effettivamente implicato nel legame con il DNA ed ha un importante ruolo strutturale in quanto si lega agli aminoacidi lisina 67, treonina 75 dell'alfa elica (fig. 26a). La variante Met71 perderebbe

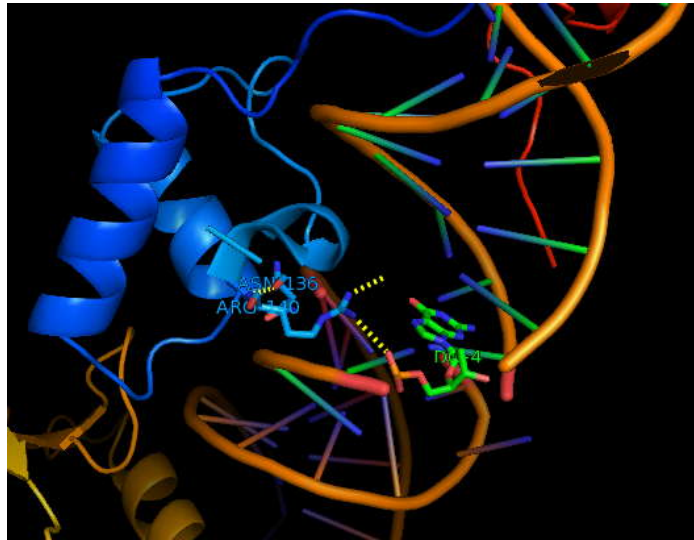
il legame al DNA e acquisirebbe, secondo la predizione, un nuovo contatto nell'alfa elica, in Glu74 (fig. 26b).



**fig. 26** a) Dettaglio della struttura 3D della proteina PDB:1K78, visualizzata con PyMol. b) Struttura 3D elaborata dal programma di predizione SWISS-MODEL e visualizzata con PyMol.(legenda: struttura del DNA fucsia, dominio PAIRED verde, Arg71 blu, Met71 rosso, Lys67 giallo, Thr75 viola, Glu74 arancio)

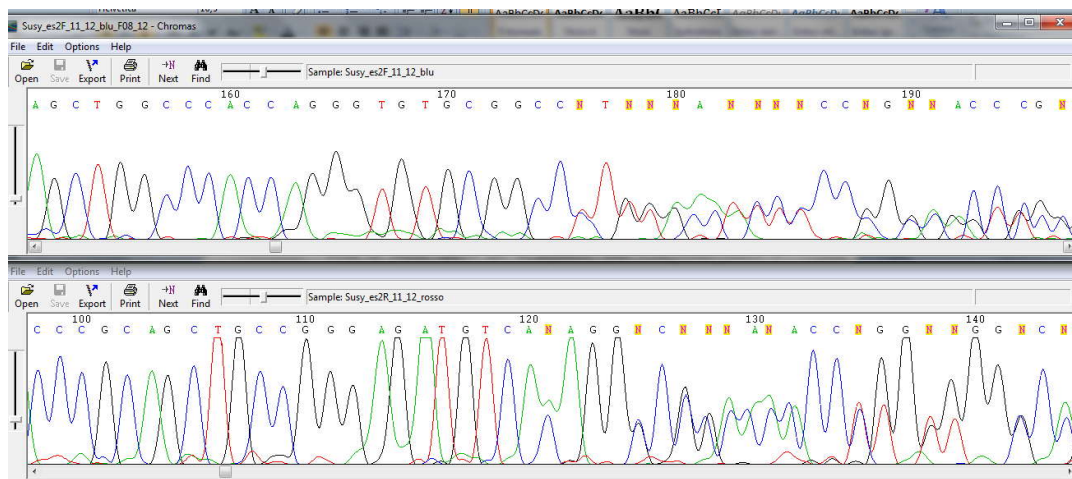
La sostituzione missense c.418C>T è localizzata nell'esone 4 del gene PAX2, l'ultimo esone codificante per il dominio paired box della proteina. La variazione nucleotidica comporta il cambio aminoacidico p.Arg140Trp, che secondo le predizioni dei programmi PolyPhen2 e SIFT, risulterebbe deleterio. Tale variante non è stata osservata nei nostri 200 DNA di controllo. Lo studio della conservazione filogenetica eseguito con *ClustalW* e lo studio della localizzazione tridimensionale della variante, eseguita con *EsyPred3D*, confermerebbero la sua patogenicità. Infatti il cambio aminoacidico da arginina a triptofano, localizzato nel dominio di interazione con il DNA della proteina PAX2, per le caratteristiche intrinseche dei due aminoacidi, non risulterebbe conservativo. L'arginina, aminoacido polare positivo appare direttamente legata al nucleotide con guanidina ed essere inoltre implicata in legami strutturali con l'asparagina 136 della stessa alfa elica (fig.27). Il cambio con l'aminoacido triptofano, che è invece di tipo idrofobico, potrebbe alterare il folding della proteina e farle perdere il legame diretto con il DNA.

**fig. 27:** Visualizzazione 3D ottenuta con *PyMol* dei legami stabiliti dall' AA ARG140 con l'AA ASN136 della stessa alfa-elica (in azzurro) e con il nucleotide DG (in verde) nella parte di elica di DNA. Struttura tridimensionale di PAX5 complessato al DNA (PDB 1K78A), in una regione altamente omologa a PAX2.



Questa variante è stata identificata in una paziente con la sindrome Nail Patella, aveva infatti un ritardo dell'accrescimento staturponderale con importanti dimorfismi quali, coxa valga bilateralmente, ipotrofia muscolare scapolo-omerale, displasia ungueale con clinodattilia bilaterale ed insufficienza renale dall'epoca neonatale. Il soggetto presentava inoltre ipoplasia renale bilaterale e VUR bilaterale. L'analisi mutazionale del gene *LMX1b*, associato alla sindrome Nail-Patella, ancora in corso al momento del reclutamento, ha rivelato la presenza di una variante intronica *de novo* c.672-2A>G, verosimilmente associata ad alterazioni dello splicing. La variante identificata nel gene *PAX2*, risultava invece ereditata dalla madre, la quale presentava un'insufficienza renale moderata all'età di 40 anni ed ipodisplasia renale bilaterale.

Infine la variante indel c.153\_155delCTGinsTT del gene *PAX2* (fig.28), è stata osservata in due gemelli monozigoti con un quadro di ipodisplasia renale cistica, scarsa crescita e ritardo dello sviluppo. Solo uno dei gemelli presentava anche cisti colobomatose e cataratta congenita all'occhio destro.



**fig.28:** Cromatogrammi relativi alla variazione di sequenza indel c.153\_155delCTGinsTT, in alto il particolare nella sequenza forward dell'esone2, in basso il dettaglio visto nel filamento reverse.

Questo indel non era presente nei genitori né in 100 DNA di controllo. Secondo la predizione di *translate tool*, questa variante comporta un frame-shift di lettura con conseguente anticipazione del codone di stop (fig.29). Si ottiene pertanto la produzione di una proteina PAX2 tronca p.Cys52Lfs31X (dopo soli 83 aminoacidi dall'inizio della traduzione), che risulta causativa del fenotipo dei pazienti.



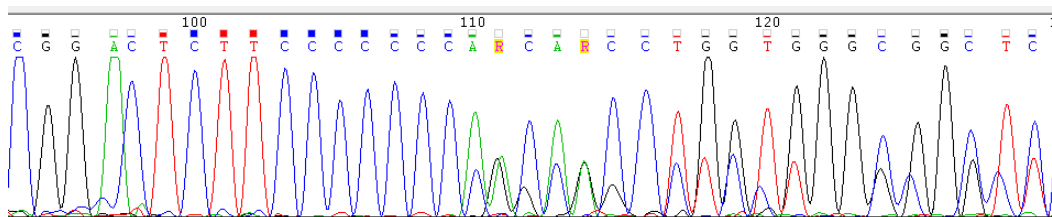
**fig.29:** Frame di lettura corretto per la sequenza codificante l'esone 2 (riga verde) e frame di lettura slittato per la mutazione indel c.153\_155delCTGinsTT o p.C52Lfs31X, (predizione del programma Translate Tool del sito Expsy).

La messa a punto metodologica per l'analisi mutazionale del gene GATA3 ha richiesto molto tempo per le difficoltà riscontrate nell'applicazione della tecnica di screening HRMA. Dalle prove condotte si è potuto osservare che la presenza dell'intercalante



Evagreen®, sebbene sia conosciuto non influenzare l'andamento della PCR, è in questo caso un fattore limitante. Per gli esoni 2 e 3 non si è riusciti ad ottimizzare la reazione di PCR che dava numerosi aspecifici, influenzando i tempi di amplificazione ma soprattutto le curve di melt. Gli ampliconi ottenuti con le stesse condizioni di amplificazione, ma senza la presenza del dye intercalante, davano prodotti di PCR migliori senza aspecifici. Si è preferito perciò eseguire direttamente, per questi esoni, la reazione di sequenza per tutti i campioni.

Proprio a carico dell'esone 3, codificante per un dominio di transattivazione del fattore trascrizionale GATA3, è stata identificata la mutazione c.709insC (fig.30), annotata nei database di mutazioni umane, in un paziente con ipoplasia renale, VUR bilaterale di IV grado e macroencefalia.



**fig.30** Cromatogramma relativo alla mutazione c.709insC del gene GATA3.

L'analisi predittiva della proteina prodotta dall'allele mutato, ottenuta mediante *Translate tool* (fig 31), dimostra che questa mutazione comporta un frame-shift di lettura di 67 codoni, a partire dalla posizione S237Q fino all'inserimento di un codone di stop con conseguente produzione di una proteina trunca di 304 aminoacidi (p.S237Qfs67X).

```

Met EVTADQPRWVSHHHPAVLNGQHPDTHHPGLSHSYMet DAAQYPLPE
EVDVLFNIDGQGNHVPPYYGNSVRATVQRYPPTHHGSQVCRPPLLHGS
EVDVLFNIDGQGNHVPPYYGNSVRATVQRYPPTHHGSQVCRPPLLHGS
LPWLDGGKALGSHHTASPWNLSPFKTSIHHGSPGPLSVYPPASSSSL
LPWLDGGKALGSHHTASPWNLSPFKTSIHHGSPGPLSVYPPASSSSL
SGGHASPHLFTFPPTPPKDVSPDPSLSTPGSAGSARQDEKECKLYQVP
SGGHASPHLFTFPPTPPKDVSPDPSLSTPGSAGSARQDEKECKLYQVP
LPDSMetKLESSHSRGSMetTALGGASSSTHHPITTYPPYVPEYSSGLFPP
LPDSMetKLESSHSRGSMetTALGGASSSTHHPITTYPPYVPEYSSGLFPP
SLLGGSP TGF GCKSRPKARSSTEGRECVNCGATSTPLWRRDGTGHY
*
QQPAGRLPHRLRMetQVQAQGPVQHRRQGVCELWGNLDPTVAARWHG
LCNACGLYHKMetNGQNRPLIKKRRLSAARRAGTSCANCQTTTTTLWR
TLPVQRLRALSQNERTEPAPH Stop
RNANGDPVCNACGLYYKLHNINRPLTMetKKEGIQTRNRKMetSSKSKKC
KKVHDSLEDFPKNSSFNPAALSRHMetSSLSHISPFSSHSSHMetLTTPTP
MetHPPSSLSFGPHHPSSMetVTA MetG Stop

```

**fig. 31** Frame di lettura corretto per la sequenza codificante di GATA3 (riga verde) e frame di lettura slittato per la mutazione c.709insC o p.S237Qfs67X, (predizione del programma Translate Tool del sito Expaty).

Lo screening mutazionale per il gene SPRY1 per tutti i 53 pazienti inclusi nello studio, non ha evidenziato alcuna mutazione causativa nel gene.

E' stata inclusa nella nostra coorte anche una paziente con ipodisplasia renale bilaterale, piccole cisti corticali, iperuricemia e lieve ritardo dello sviluppo psicomotorio. La bambina era stata precedentemente indagata per mutazioni dei geni UMOD e HNF1b, risultando però negativa. Anche lo screening mutazionale dei geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1 non ha evidenziato mutazioni causative. Sulla base della presenza di una elevata omozigotità per numerosi marcatori polimorfici e nel sospetto di una delezione completa del

gene HNF1b è stata eseguita la ricerca di riarrangiamenti genomici mediante array-CGH. Questa tecnica ha evidenziato una delezione di circa 1,4Mb a carico del braccio lungo del cromosoma 17 (arr17q12(34,817,481x2,34,832,402-36,243,028x1,36,407,774x2) ereditata dalla madre. La regione deleta contiene 19 geni, tra cui HNF1b e LHX1 già noti come attori del network dello sviluppo renale. La madre presentava reni cistici con funzionalità renale nella norma e diabete mellito non insulino dipendente insorto in gravidanza. Delezioni del 17q12 sono già state associate alla sindrome RCAD (MODY5) che si associa a cisti renali e diabete giovanile di tipo V°.

Nei 45 pazienti risultati negativi allo screening mutazionale dei geni dello sviluppo SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1, è stata eseguita la ricerca di variazioni di sequenza nelle regioni target 3'UTR e dei geni MIR predetti dal programma miRecords. L'analisi condotta con metodologia PCR-HRMA per i geni MIR571, MIR185, 508-5p e relativi target in 3'UTR di SIX1, per i geni MIR218-1, MIR185 e relativi target in 3'UTR di PAX2, per i geni MIR144, MIR 135b e relativi target in 3'UTR di GATA3 e per i geni MIR29c, MIR21 e relativi target in 3'UTR di SPRY1 non ha evidenziato alcuna variante nota o non nota.

## DISCUSSIONE

Le anomalie congenite del rene e delle vie urinarie (CAKUT) sono la principale causa di insufficienza renale cronica nella popolazione pediatrica. Si tratta di malformazioni caratterizzate da un'ampia variabilità fenotipica la cui rilevanza clinica varia da forme meno severe, con lievi alterazioni funzionali renali, a forme gravi quali l'agenesia e l'ipodisplasia renale. Studi su modelli animali suggeriscono che queste anomalie siano dovute ad una disregolazione del complesso programma nefrogenetico. Sebbene siano state identificate nell'uomo mutazioni causative in diversi geni coinvolti nello sviluppo del rene e del tratto urinario, nella maggior parte dei casi l'eziopatogenesi resta ancora da chiarire. Altri fattori genetici, fattori epigenetici ed ambientali possono quindi concorrere alla determinazione delle CAKUT. Recenti studi sul topo portano ad ipotizzare che i processi di regolazione post-trascrizionale mediati dai miRNA (corte sequenze di RNA non coding) possano avere un ruolo chiave nello sviluppo renale umano.

In questo studio si è condotto uno screening mutazionale dei geni SIX1, PAX2, GATA3 e SPRY1, geni fortemente implicati nelle prime fasi dello sviluppo nefrourinario. Sono state inoltre analizzate le regioni 3'UTR degli stessi geni, mediante l'utilizzo di tools bioinformatici, al fine di identificare dei target della regolazione post-trascrizionale ad opera dei miRNA. Mediante PCR-HRM sono state anche analizzate le sequenze dei target molecolari predetti e dei geni per miRNA identificati.

L'analisi mutazionale dei geni del network dello sviluppo nefrourinario ha messo in evidenza 4 mutazioni causative per PAX2 ed 1 per GATA3.

Lo screening per il gene PAX2 ha evidenziato la presenza di cinque polimorfismi noti e quattro variazioni di sequenza del gene.

La delezione c.69delC, osservata in una paziente con ipodisplasia renale bilaterale, VUR e ipoacusia, causa la produzione di una proteina tronca di soli 29 aminoacidi. La stessa mutazione, osservata in un soggetto con lo stesso quadro malformativo, era stata descritta per la prima volta in un nostro precedente studio [43]. Entrambi i pazienti non presentavano le anomalie oculari tipiche della sindrome Papillo-Renale (PAPRS), confermando così l'associazione tra mutazioni del gene PAX2 e quadri non sindromici di ipodisplasia e VUR.

La sostituzione missense c.212G>T localizzata nell'esone 2 del gene PAX2 è stata osservata in un paziente con fenotipo sindromico di PAPRS. La variante, non nota in letteratura, determina la sostituzione missense p.Arg71Met nel dominio paired-box della proteina, che dall'analisi bioinformatica risulta essere causativa del fenotipo del paziente. In letteratura è riportata, nello stesso codone, una mutazione missenso con cambio aminoacidico p.Arg71Thr, associata ad un quadro sindromico di PAPRS (insufficienza renale, nistagmo, coloboma e polidattilia) [55]. L'identificazione di questa nuova mutazione conferma la patogenicità delle sostituzioni missenso, in questa posizione del dominio paired box.

In una paziente con ipodisplasia renale e VUR, è stata identificata la mutazione c.418C>T nel gene PAX2, ereditata dalla madre. La stessa paziente era risultata affetta dalla sindrome Nail-Patella e l'analisi molecolare del gene LMX1B (condotta presso il laboratorio di Genetica di San Giovanni Rotondo) aveva identificato la mutazione causativa. La bambina, che presentava insufficienza renale già in epoca neonatale, aveva ricevuto il trapianto di rene all'età di 7 anni. La madre, portatrice della stessa mutazione del gene PAX2, era in insufficienza renale moderata dall'età di 43 anni. In letteratura è stata riportata un'interazione proteica sperimentale tra i fattori trascrizionali PAX2 e LMX1b [56]. Gli autori ipotizzano che PAX2

possa avere un effetto modulatore su LMX1b, contribuendo ad aggravare il fenotipo renale nella sindrome Nail Patella. Il nostro caso rappresenta la prima segnalazione di compresenza di mutazioni di questi due geni, in associazione ad un fenotipo renale più severo nella paziente rispetto a quello della madre.

E' stata inoltre identificata una nuova variante indel, c.153\_155delCTGinsTT, del gene PAX2, in due gemelli monozigoti con ipodisplasia renale cistica, scarsa crescita, ritardo dello sviluppo. In uno solo dei gemelli era inoltre presente cataratta congenita e coloboma all'occhio destro. Il frameshift che si crea in conseguenza della variante, porta alla sostituzione dell'amminoacido cisteina con l'amminoacido leucina in posizione 52 (p.C52Lfs31X) ed alla codifica di 31 aminoacidi diversi dalla sequenza wild-type, prima della terminazione prematura della proteina.

In letteratura è riportato un solo altro caso di mutazione del gene PAX2 (c.155G>A, p.C52Y) in due gemelle monozigoti, con fenotipo discordante [57]. Una gemella, giunta a trapianto di rene per insufficienza renale cronica, presentava rene multicistico displasico monolaterale e joint laxity. L'altra gemella aveva una funzionalità renale nella norma, nessuna anomalia renale, ma presentava joint laxity e coloboma all'occhio sinistro. Gli autori concludono che il differente quadro clinico delle gemelle monozigoti confermi ulteriormente l'estrema variabilità fenotipica della sindrome PAPRS. Essi ipotizzano che a questa variabilità concorrano fattori ambientali, geni modificatori e fattori epigenetici.

Lo screening mutazionale condotto su GATA3 ha messo in evidenza 3 polimorfismi noti ed 1 mutazione nota.

La variante c.709insC, identificata in un paziente con ipoplasia renale, VUR bilaterale di IV grado e macroencefalia, comporta una riduzione a 302 aminoacidi del fattore trascrizionale GATA3, con

perdita di entrambi i domini funzionali zinc finger. La stessa mutazione è stata osservata in associazione alla sindrome “ipoparatiroidismo, sordità e malattia renale” (HDR OMIM #146255), in uno studio giapponese (madre e figlia portatrici della stessa mutazione)[58]. La madre presentava ipoparatiroidismo, agenesia renale monolaterale, VUR e sordità; mentre nella figlia la mutazione si associava a VUR, sordità e gozzo diffuso, ma la funzione tiroidea era nella norma. E’ noto che l’aploinsufficienza di GATA3 si correla a gradi diversi di severità della triade fenotipica caratteristica della sindrome HDR.

Un recentissimo lavoro di *Hwang et al.* 2014, riporta due mutazioni missense di GATA3 (c.766C>G e c.889C>A) in associazione a VUR bilaterale in due pazienti europei, osservati durante uno screening mutazionale condotto su una popolazione di 650 famiglie con CAKUT non sindromiche [59]. Tuttavia mutazioni di GATA3 in associazione ad ipoplasia renale non sono state mai riportate.

L’analisi mutazionale del gene SIX1 non ha evidenziato alcuna variazione di sequenza. Non si può escludere altresì che vi sia una bassa frequenza di mutazione per il gene SIX1 in associazione alle anomalie da sviluppo nefrouriinario. Recentemente uno studio, condotto mediante next generation sequencing, analizza 17 CAKUT-gene dominanti (BMP4, BMP7, CDC5L, CHD1L, EYA1, GATA3, HNF1B, PAX2, RET, ROBO2, SALL1, SIX1, SIX2, SIX4, SOX17, UMOD and UPK3A) in 749 individui di 650 famiglie [59]. Gli autori non identificano alcuna mutazione di SIX1, in accordo con quanto osservato nella nostra popolazione.

Lo screening mutazionale per il gene SPRY1 ha messo in evidenza 6 polimorfismi noti, ma nessuna mutazione causativa. A tutt’oggi non sono mai state riportate mutazioni causative di questo gene nell’uomo e rimane ancora poco chiaro il suo ruolo nella nefrourogenesi murina.



Il nostro risultato concorda con quanto riportato in un recente lavoro di *Chatterjee et al.* Gli autori analizzano il gene *SPRY1* in una coorte di 122 pazienti con *CAKUT* sindromiche e non identificano mutazioni causative [60]

Il caso familiare di microdelezione 17q12 identificato conferma la variabilità fenotipica descritta in letteratura in associazione a questo riarrangiamento genomico. Evidenzia inoltre come i meccanismi molecolari associati alla delezione 17q12 rimangano ancora da chiarire, in particolare per quanto riguarda la correlazione tra aploinsufficienza dei geni *HNF1b* e *LHX1* e le manifestazioni fenotipiche nefrologiche e neuropsichiatriche.

L'analisi bioinformatica e lo studio della letteratura ci hanno permesso di identificare 8 miRNA e i loro ipotetici target molecolari sulle regioni 3'UTR dei geni *SIX1*, *PAX2*, *GATA3* e *SPRY1*, ma la ricerca di variazioni di sequenza in 45 pazienti con *CAKUT*, non ha evidenziato alcuna variante nota o non nota. E' possibile ipotizzare che questo risultato sia dovuto ad una frequenza molto bassa di tali variazioni di sequenza e che la numerosità della nostra popolazione non abbia consentito di evidenziarle. Tuttavia bisogna considerare che i miRNA analizzati sono stati identificati mediante analisi bioinformatica predittiva e la conferma di interazione sarebbe stata indiretta. Non è possibile identificare i miRNA coinvolti analizzando quantitativamente la loro espressione su tessuto renale, poiché la diagnosi di *CAKUT* viene eseguita, salvo rari casi, esclusivamente mediante screening ecografico. Non vi è infatti indicazione alla biopsia renale, indagine strumentale invasiva e rischiosa. Bisogna tuttavia considerare che l'interazione molecolare tra alcuni dei miR identificati e i target predetti potrebbe essere validata mediante studi funzionali.

E' altresì ipotizzabile che i miRNA analizzati non siano realmente coinvolti nella regolazione genica responsabile delle anomalie del rene e delle vie urinarie, oggetto di questo studio.

## CONCLUSIONI

Lo screening mutazionale condotto durante i tre anni dello studio ha permesso di stimare la frequenza di mutazioni del gene PAX2 che, nella nostra coorte di pazienti CAKUT, è risultata pari al 11.5 % (considerando anche 2 mutazioni già riportate in un precedente studio). Il gene PAX2 si conferma quindi un importante attore nella determinazione delle CAKUT. Inoltre l'assenza di mutazioni causative a carico dei geni SIX1 e SPRY1 conferma i dati della letteratura e porta ad ipotizzare un loro ruolo limitato nella determinazione di queste anomalie di sviluppo.

In questa coorte di pazienti CAKUT sindromici e non, la frequenza di mutazioni di GATA3 è risultata pari all'1.8%. L'identificazione di una mutazione di GATA3 in un paziente non affetto dalla sindrome HDR, ci porta ad ipotizzare che la frequenza di mutazioni di questo gene nei pazienti CAKUT sia sottostimata.

Nessuna variazione di sequenza è stata identificata nelle regioni target per miRNA e nei geni miRNA analizzati in questo studio. E' ipotizzabile che il ruolo regolatorio dei miRNA selezionati, mediante la predizione bioinformatica e solo in alcuni casi supportato da studi funzionali, non influenzi il normale processo nefrogenetico.

I risultati di questo studio, aumentando le conoscenze relative ai geni causativi delle CAKUT, permettono di implementare lo spettro delle correlazioni genotipo-fenotipo e di contribuire ad identificare i geni candidati per un pannello di screening mutazionale. Una diagnosi precoce e mirata può portare ad una migliore classificazione clinica – molecolare della malattia e ad una prognosi ben definita per il bambino con CAKUT.

La prosecuzione di questo studio mediante analisi dell'intero esoma di questi pazienti, incluse le regioni codificanti per MIR e quelle target

3' UTR, permetterà l'identificazione di nuovi geni e la definizione di un pannello di miR-profiling, coinvolti nella determinazione delle CAKUT.

**Publicazioni relative al triennio di dottorato:**

1. Negrisolò S, Centi S, Benetti E, Ghirardo G, Della Vella M, Murer L, Artifoni L. SIX1 gene: absence of mutations in children with isolated congenital anomalies of kidney and urinary tract. *J Nephrol.* 2014 Jun 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24899122.
2. S. Negrisolò, E. Benetti, G. Caridi, L. Cardarelli, E. Nalesso, I. Mammi, L. Murer, L. Artifoni. Maternal Transmission of 17q12 Microdeletion: a New Case Associated to Intrafamilial Phenotypic Variability. *Submitted to European Journal of Pediatrics.*

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Schena, P.F. and F.P. Selvaggi, *Malattie dei Reni e delle Vie Urinarie*. 3° edizione ed, ed. M.G. Hill. 2003. cap.4.
- 2 Weber S., Novel genetic aspects of congenital anomalies of kidney and urinary tract. *Curr Opin Pediatric* 2012. 24(2): p.212-218.)
- 3 Lama, G. and M.E. Salsano, Ruolo della genetica nelle malformazioni renali. *Prospettive in Pediatria*, 2003. 33: p. 315-325.
- 4 Schedl, A., Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet*, 2007. 8(10): p. 791-802.
- 5 Mackie GG, Stephens FD. Duplex kidneys: a correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice. *J Urol*. 1975 Aug;114(2):274-80]
- 6 Vivante A, et al. Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. *Pediatr Nephrol*. 2014 Apr;29(4):695-704.
- 7 Marcotte M, et al. Gene regulatory network of renal primordium development. *Pediatr Nephrol*. 2014 Apr;29(4):637-44
- 8 T.Keefe Davis et al “To bud or not bud: the RET perspective in CAKUT” *Pediatric Nephrol* 2014)
- 9 Chatterjee R, et al. Traditional and targeted exome resequencing reveals common, rare and novel functional deleterious variants in RET-signaling complex in a cohort of living US patients with urinary tract malformations. *Hum Genet*. 2012 Nov;131(11):1725-38.]
- 10 Jeanpierre C, et al. RET and GDNF mutations are rare in fetuses with renal agenesis or other severe kidney development defects. *J Med Genet*. 2011. Jul;48(7):497-504.].
- 11 Chia I, et al. Nephric duct insertion is a crucial step in urinary tract maturation that is regulated by a Gata3-Raldh2-Ret molecular network in mice. *Development*. 2011 May;138(10):2089-97.]
- 12 Yosypiv IV. Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: implications for kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2014 Apr;29(4)

- 13 Bhatt K, Mi QS, Dong Z. microRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Mar;300(3):F602-10. Epub 2011 Jan 12. Review.
- 14 Winter j, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 11, 228 - 234 (2009]
- 15 Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):219-30. Review.
- 16 Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005 Mar 1;33(4):1290-7.).
- 17 Bernstein E,et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003 Nov;35(3):215-7.]
- 18 Bartram MP, et al. Conditional loss of kidney microRNAs results in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *J Mol Med (Berl)*. 2013 Jun;91(6):739-48.]
- 19 Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol*. 2010 Jan;220(2):126-39. Review.).
- 20 Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011 Nov 18;12(12):861-74. doi: 10.1038/nrg3074. Review. ).
- 21 Sun H, Li QW, Lv XY, Ai JZ, Yang QT, Duan JJ, Bian GH, Xiao Y, Wang YD, Zhang Z, Liu YH, Tan RZ, Yang Y, Wei YQ, Zhou Q. MicroRNA-17 post-transcriptionally regulates polycystic kidney disease-2 gene and promotes cell proliferation. *Mol Biol Rep*. 2010 Jul;37(6):2951-8. Epub 2009 Oct 10.
- 22 Natarajan R, Putta S, Kato M. MicroRNAs and Diabetic Complications. *J Cardiovasc Transl Res*. 2012 May 3. [Epub ahead of print]

- 23 Wang G, Kwan BC, Lai FM, Choi PC, Chow KM, Li PK, Szeto CC. Intrarenal expression of microRNAs in patients with IgA nephropathy. *Lab Invest.* 2010 Jan;90(1):98-103. Epub 2009 Nov 9.
- 24 Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int.* 2009 May;29(7):749-54. Epub 2008 Nov 8.
- 25 Wang G, Kwan BC, Lai FM, Choi PC, Chow KM, Li PK, Szeto CC. Intrarenal expression of miRNAs in patients with hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens.* 2010 Jan;23(1):78-84. Epub 2009 Nov 12.
- 26 Wu X, Weng L, Li X, Guo C, Pal SK, Jin JM, Li Y, Nelson RA, Mu B, Onami SH, Wu JJ, Ruel NH, Wilczynski SP, Gao H, Covarrubias M, Figlin RA, Weiss LM, Wu H. Identification of a 4-microRNA Signature for Clear Cell Renal Cell Carcinoma Metastasis and Prognosis. *PLoS One.* 2012;7(5):e35661. Epub 2012 May 18.
- 27 Ho J, Kreidberg JA. MicroRNAs in renal development. *Pediatr Nephrol.* 2012 Jun
- 28 Marrone AK, Ho J. MicroRNAs: potential regulators of renal development genes that contribute to CAKUT. *Pediatr Nephrol.* 2014 Apr;29(4):565-74.
- 29 Ikeda K, et al. Molecular Interaction and Synergistic Activation of a Promoter by Six, Eya, and Dach Proteins Mediated through CREB Binding Protein, *Molecular Cellular Biology*, 2002, 22(19): 6759-6766;
- 30 Li X., et al, Eya protein phosphatase activity regulates Six1–Dach–Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis, *Nature*, 2003, 426: 247-254;
- 31 Kochhar A, et al. SIX1 mutation screening in 247 branchio-otorenal syndrome families: a recurrent missense mutation associated with BOR. *Hum Mutat.* 2008 Apr;29(4):565



- 32 Nie X, Sun J, Gordon RE, Cai CL, Xu PX. SIX1 acts synergistically with TBX18 in mediating ureteral smooth muscle formation. *Development*. 2010 Mar;137(5):755-65.
- 33 Bosman et al., 2009 tesi six1 Bosman E.A., Quint E., Fuchs H., Hrabè de Angelis M., Steel k.P., Catweasel mice: A novel role for Six1 in sensory patch development and a model for branchio-oto-renal syndrome, *Developmental Biology*, 2009, 328(2): 285-296;
- 34 Patrick A.N., Schiemann B.J., Yang K., Zhao R., Ford H.L., Biochemical and Functional Characterization of Six SIX1 Branchio-oto-renal Syndrome Mutations, *Journal of biological Chemistry*, 2009, 284(31): 20781-20789;
- 35 Kochhar A., Orten D.J., Sorensen J.L., Fischer S.M., Cremers W.R.J., Kimberling W.J., Smith R.J.H., SIX1 Mutation Screening in 247 Branchio-Oto-Renal Syndrome Families: A Recurrent Missense Mutation Associated With BOR; *Human Mutation, Mutation in Brief* , 2008, pp. 1-12;
- 36 Eccles, M.R., et al., PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol*, 2002. 46(4): p. 535-44.
- 37 Busse, A., et al., An intron 9 containing splice variant of PAX2. *J Transl Med*, 2009. 7: p. 36.
- 38 Torres, M., et al., Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*, 1995. 121(12): p. 4057-65.
- 39 Barua M,et al . Mutations in PAX2 associate with adult-onset FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Sep;25(9):1942-53.
- 40 Nishimoto, K., et al., PAX2 gene mutation in a family with isolated renal hypoplasia. *J Am Soc Nephrol*, 2001. 12(8): p. 1769-72.
- 41 Weber, S., et al., Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(10): p. 2864-70.

- 42 Taranta, A., et al., Renal-coloboma syndrome: a single nucleotide deletion in the PAX2 gene at Exon 8 is associated with a highly variable phenotype. *Clin Nephrol*, 2007. 67(1): p. 1-4.
- 43 Negrisolo S, et al. PAX2 gene mutations in pediatric and young adult transplant recipients: kidney and urinary tract malformations without ocular anomalies. *Clin Genet*. 2011 Dec;80(6):581-5.
- 44 Benetti, E., et al., Renal hypoplasia without optic coloboma associated with PAX2 gene deletion. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. 22(7): p. 2076-8.
- 45 Karger AB, et al. Detection of PAX2 deletions and duplications using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013 Oct;17(10):786-8.
- 46 Labastie MC, et al. The GATA-3 gene is expressed during human kidney embryogenesis. *Kidney Int*. 1995 Jun;47(6):1597-603.
- 47 Grote D, et al. Pax 2/8-regulated Gata 3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. *Development*. 2006 Jan;133(1):53-61.
- 48 Upadhyay J, et al. The syndrome of hypoparathyroidism, deafness, and renal anomalies. *Endocr Pract*. 2013 Nov-Dec;19(6):1035-42.
- 49 Nanba K, et al. A novel GATA3 nonsense mutation in a newly diagnosed adult patient of hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome. *Endocr Pract*. 2013 Jan-Feb;19(1):
- 50 Eeckhoute J, et al. Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2007 Jul 1;67(13):6477-83
- 51 Lim J, et al. The cysteine-rich sprouty translocation domain targets mitogen-activated protein kinase inhibitory proteins to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in plasma membranes. *Mol Cell Biol*. 2002 Nov;22 (22):7953-66

- 52 Willecke R, et al. The tyrosine phosphatase Shp2 acts downstream of GDNF/Ret in branching morphogenesis of the developing mouse kidney. *Dev Biol.* 2011 Dec 15;360(2):310-7.
- 53 Ching ST, et al. Coordinated activity of Spry1 and Spry2 is required for normal development of the external genitalia. *Dev Biol.* 2014 Feb 1;386(1):1-11.
- 54 Liu X, et al. SPRY1 promotes the degradation of uPAR and inhibits uPAR-mediated cell adhesion and proliferation. *Am J Cancer Res.* 2014 Nov 19;4(6):683-97.]
- 55 Higashide T. et al. Macular abnormalities and optic disk anomaly associated with a new PAX2 missense mutation. *Am J Ophthalmol.* 2005 Jan;139(1):203-5
- 56 Marini M, et al. Interaction of the LMX1B and PAX2 gene products suggests possible molecular basis of differential phenotypes in Nail-Patella syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005 Jun;13(6):789-92
- 57 Iatropoulos P, et al. Discordant phenotype in monozygotic twins with renal coloboma syndrome and a PAX2 mutation. *Pediatr Nephrol.* 2012 Oct;27(10):1989-93.
- 58 Mino Y, Kuwahara T, Mannami T, Shioji K, Ono K, Iwai N. Identification of a novel insertion mutation in GATA3 with HDR syndrome. *Clin Exp Nephrol.* 2005 Mar;9(1):58-61]
- 59 Hwang DY, et al. Mutations in 12 known dominant disease-causing genes clarify many congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Kidney Int.* 2014 Jun;85(6):1429-33
- 60 Chatterjee R, Traditional and targeted exome sequencing reveals common, rare and novel functional deleterious variants in RET-signaling complex in a cohort of living US patients with urinary tract malformations. *Hum Genet.* 2012 Nov;131(11):1725-38.