



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Nefrologia

CICLO XX

STUDIO DELLE BASI GENETICHE DEL RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA, UNA RARA NEFROPATIA MALFORMATIVA

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Silvano Todesco

Supervisore : Dr.ssa Franca Anglani

Dottoranda : Dr.ssa Rossella Torregrossa

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO	1
SUMMARY	5
1. INTRODUZIONE	9
1.1 IL RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA	9
1.2 EMBRIOGENESI RENALE	11
1.2.1 RUOLO DEL SEGNALE GDNF/RET NELLO SVILUPPO RENALE	14
1.2.2 EVIDENZE IN VIVO DELL'IMPORTANZA DEL SEGNALE GDNF/RET NELLO SVILUPPO RENALE	16
1.2.3 ALTRE MOLECOLE COINVOLTE NELLO SVILUPPO RENALE	17
1.3 COME IDENTIFICARE "GENI MALATTIA"	19
1.4 PATOGENESI MOLECOLARE: IPOTESI	20
1.5 GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF): STRUTTURA DEL GENE	21
1.6 PROTO-ONCOGENE RET (REARRANGED DURING TRANSFECTION): STRUTTURA DEL GENE	26
1.7 MUTAZIONI DEI GENI GDNF E/O RET E FENOTIPI MALATTIA	28
2. SCOPO	33
3.MATERIALI E METODI	37
3.1 PAZIENTI	37
3.2 POPOLAZIONI DI CONTROLLO	37
3.3 ANALISI DI MUTAZIONE	38

3.3.1	ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO	38
3.3.2	DISEGNO DEI PRIMERS	39
3.3.3	PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL DNA AMPLIFICATO	43
3.3.4	ANALISI RFLP	45
3.3.5	VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI DIGESTIONE ENZIMATICA	47
3.3.6	DOPPIA DIGESTIONE ENZIMATICA	48
3.4	STUDIO DI ESPRESSIONE	48
3.4.1	ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA TOTALE	48
3.4.2	AMPLIFICAZIONE DEL cDNA E ANALISI QUANTITATIVA	50
3.5	ANALISI STATISTICA DEI DATI	53
4.	RISULTATI	55
4.1	ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE GDNF	55
4.2	STUDIO DI ESPRESSIONE DEL GENE GDNF	62
4.3	ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE RET	63
4.3.1	SNP-5 DEL PROMOTORE DEL GENE RET	64
4.3.2	SNP-5 E SNP-1 DEL PROMOTORE DEL GENE RET	64
4.3.3	SNPs DEGLI ESONI 11 E 15 DEL GENE RET	66
4.3.4	SNP-5 E SNP-1 DEL PROMOTORE E SNP DELL'ESONE 13 DEL GENE RET	68
4.3.5	SNP-5 E SNP-1 DEL PROMOTORE E SNPs DEGLI ESONI 11 E 15 DEL GENE RET	69
5.	DISCUSSIONE	73

5.1 VARIANTI DI SEQUENZA NEL GENE GDNF:	
POLIMORFICHE O CAUSA DI MALATTIA?	74
5.2 SPECIFICI ALOTIPI DI VARIANTI POLIMORFICHE NEL GENE RET:	
ALLELI DI SUSCETTIBILITÀ ALLA MALATTIA?	78
5.3 VARIANTI ALLELICHE NEI GENI GDNF E RET:	
SINERGIA CHE PUÒ CAUSARE IL FENOTIPO MALATTIA?	81
6. CONCLUSIONI	85
7. BIBLIOGRAFIA	89

RIASSUNTO

Il rene con midollare a spugna (MSK) è una rara malformazione renale caratterizzata da anomalie cistiche dei dotti precaliceali, nefrocalcinosi, calcoli renali e disfunzioni del nefrone tubulare. Pur non essendo stata ancora chiarita la sua patogenesi, la frequente associazione con diverse condizioni malformative renali ed extra-renali e il coinvolgimento in casi familiari suggeriscono che si tratti di una patologia disembrionogenetica e che fattori genetici possano essere alla base dello sviluppo della malattia. Fino ad ora non è stato condotto nessuno studio genetico di MSK. L'ipotesi che si avanza è che i geni che regolano l'embriogenesi renale possano essere dei buoni candidati da proporre per spiegare un'alterazione dello sviluppo del tipo osservato in MSK e, in particolare, che possano essere in gioco mutazioni dei geni GDNF e RET, geni indispensabili per uno sviluppo corretto del sistema nefro-urologico e finemente regolati nel tempo e nello spazio durante l'embriogenesi. Questo studio ha quindi voluto indagare se tali geni possano effettivamente considerarsi la base genetica di MSK o in qualità di geni causa della malattia o come geni di suscettibilità alla malattia che agirebbero, in quest'ultimo caso, modificando l'espressione di geni chiave del processo nefrogenetico.

A tale scopo è stata raccolta una casistica veneta ben selezionata di 50 pazienti, tutti non imparentati, nefrolitiasici e affetti da MSK sporadico diagnosticato sulla base di stretti criteri urografici. Mediante sequenziamento diretto e test RFLP, si è condotta un'analisi mutazionale degli esoni e delle regioni di confine esone-introne di entrambi i geni GDNF e RET. Sono stati inoltre eseguiti studi di associazione e di espressione per definire al meglio il ruolo delle varianti geniche che sono state identificate.

In sette pazienti sono state trovate varianti in eterozigosi del gene GDNF rappresentate da: un allele complesso costituito dalle due sostituzioni nucleotidiche -45G>C e IVS3+18G>A, mai precedentemente descritte, nella regione non codificante 5' UTR, un allele costituito dalla sola sostituzione intronica IVS3+18G>A – entrambi gli alleli sono stati rilevati nella popolazione generale di appartenenza dei pazienti con una frequenza inferiore a 1% e non sono stati identificati in una popolazione di controllo opportuna, costituita da individui adulti con nefrolitiasi calcica idiopatica non affetti da MSK – e la mutazione R93W nella regione codificante, già descritta come allele di suscettibilità in

pazienti affetti da diverse patologie, quali la malattia di Hirschsprung, la sindrome da ipoventilazione centrale congenita e il feocromocitoma, e spesso trovata in associazione a mutazioni di altri geni, per lo più del gene RET. In tre dei sette casi è stato possibile estendere l'analisi molecolare e clinico-strumentale anche ai familiari e si è osservato che le varianti di sequenza venivano ereditate e nella famiglia segregavano in associazione con MSK, ad eccezione della mutazione R93W. In quest'ultimo caso, si è ipotizzato che GDNF potesse agire in sinergia con il gene RET per determinare il fenotipo malattia. È stato possibile valutare l'espressione genica di GDNF a livello di tessuto renale solo in una paziente che portava la variante intronica, ma essa non differiva significativamente da quella relativa ad un campione utilizzato come controllo e non ha quindi delucidato gli effetti dovuti alla presenza della mutazione.

L'analisi del gene RET non ha invece evidenziato nessuna mutazione causativa, ma sono stati rilevati nei pazienti con MSK numerosi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), già descritti in letteratura. L'attenzione è stata focalizzata su alcuni SNPs funzionalmente rilevanti del promotore, come pure della regione codificante. Uno di questi, l'allele G dello SNP c2307 T>G localizzato nell'esone 13, è risultato essere sovrarappresentato nei pazienti ($p=0.006$). È stato anche osservato in un paziente il particolare aplotipo AA, mai rilevato nei controlli, relativo ai due polimorfismi della regione promotore localizzati a -5 e -1 pb dal sito di inizio della trascrizione genica. Una valutazione delle frequenze genotipiche del promotore ha messo in evidenza che il genotipo A/A relativo allo SNP-5 non è mai presente nei pazienti affetti da MSK, mentre è rappresentato nei controlli, e che il genotipo G/A è invece sovrarappresentato in modo significativo nei pazienti con MSK rispetto alla popolazione di controllo ($p=0.040$). Nessun genotipo AC/AC relativo al promotore di RET è stato inoltre identificato nei pazienti.

L'analisi della regione codificante del gene RET ha rilevato anche due polimorfismi (c2071 G>A nell'esone 11 e c2712 C>G nell'esone 15) che cosegregavano assieme come aplotipo AG. L'analisi degli aplotipi ha evidenziato la presenza di questa combinazione aplotipica in omozigosi in tre pazienti ($p=0.024$), trovato solo in eterozigosi nei controlli, e dell'inusuale aplotipo GG, mai rilevato nei controlli, in omozigosi in due pazienti.

Ricostruendo poi gli aplotipi relativi ai polimorfismi più significativi del gene RET nei pedigrees dei probandi che portavano variazioni di sequenza del gene GDNF, è stato possibile identificarne uno che ricorreva frequentemente e che spesso era associato alla

malattia e a varianti di GDNF e che poteva addurre spiegazioni al caso familiare in cui non si verificava la co-segregazione mutazione R93W/MSK.

I risultati complessivi dello studio hanno suggerito che varianti del gene GDNF e specifici aplotipi del gene RET sono fortemente associati al fenotipo MSK e che agendo da soli o assieme possono avere una potenziale patogenicità, perlomeno in sottogruppi di pazienti affetti, additando per la prima volta un ruolo determinante alla componente genetica nel determinismo della malattia.

SUMMARY

Medullary sponge kidney (MSK) is a rare renal disorder characterized by cystic anomalies of precalyceal ducts, nephrocalcinosis, renal stones and nephronic tubule dysfunctions. Its pathogenesis has yet to be elucidated, but its association with different renal and extra-renal malformative conditions supports the idea of a developmental disorder and its involvement in familial cases shows the role of genetic factors. To date, no genetic study has been conducted. The working hypothesis is that genes regulating renal embryogenesis are good candidates to play a role in the pathogenesis of the disease. Particularly, GDNF and RET genes are necessary for the developing nephro-urological system and their expression is finely regulated during embryogenesis, so mutations of these genes may be important. This study investigated whether they may be really considered disease-causing genes or disease-susceptibility genes, which should modify the expression of key genes of the nephrogenetic process, in MSK patients.

A well characterized population of 50 Venetian nephrolithiasic unrelated patients, all of them affected with MSK diagnosed by intravenous urography, was collected. All cases were sporadic. A mutation analysis of all exons and exon-intron boundaries of both GDNF and RET genes was performed using direct DNA sequencing and RFLP approaches. Association and expression studies were also conducted to define the role of the identified mutations.

Seven patients had GDNF variants in heterozygosity: a complex allele, constituted by the novel -45G>C and IVS3+18G>A nucleotide substitutions in the 5' UTR, an allele with the intronic mutation IVS3+18G>A alone and the R93W mutation in the coding region, previously described as a disease-susceptibility allele in Hirschsprung disease, congenital central hypoventilation syndrome and pheocromocytoma and often identified in association with mutations in other genes, including RET. Both the first two alleles showed a frequency below 1% in a Venetian general population and they were never found in a specific control population constituted by individuals who had recurrent calcium nephrolithiasis but not MSK. Investigating the family history, three of these cases were discovered to be indeed familial cases of MSK and the sequence variants were found to co-segregate with the disease in the pedigrees, except for the R93W mutation. An involvement of the RET gene also was hypothesized to be responsible for

MSK phenotype in the last case. GDNF gene expression was evaluated in the renal tissue of one MSK patient with the intronic variant resulting, however, not significantly different from control samples. Therefore, it was impossible to characterize further the effects of the identified mutation.

No mutations but several single nucleotide polymorphisms (SNPs), already described, were found in the RET gene in MSK patients. Functionally important polymorphisms of the promoter as well as the coding region were focused. The G allele of SNP c2307 T>G in exon 13 showed a frequency different from the control sample ($p=0.006$). The particular haplotype AA at the -5 and -1 RET promoter SNP loci, never found in controls, also was observed in one patient. The analysis of the genotype frequencies of the promoter revealed that the A/A genotype of SNP-5 was represented in controls but not in MSK patients, while the G/A genotype showed a statistically significant overrepresentation in MSK patients ($p=0.040$). No AC/AC genotype at the RET promoter SNP loci was identified in MSK patients.

Moreover, the AG haplotype composed by alleles at two SNPs in the coding region (c2071 G>A in exon 11 and c2712 C>G in exon 15) was found in homozygosity in three patients and only in heterozygosity in controls ($p=0.024$). These SNPs were observed to co-segregate as AG and GC haplotypes, but the anomalous GG haplotype was identified in homozygosity in two patients.

Reconstructing RET haplotypes using the most significant SNPs in the pedigrees of the probands with GDNF mutations, one was identified recurrent and often associated with MSK and GDNF mutations. This also could explain the familial case without R93W/MSK co-segregation.

These data suggest that GDNF gene variants and specific RET haplotypes may be highly associated with MSK phenotype and may have, alone or in association, a potential pathogenicity at least in a subset of MSK patients, demonstrating for the first time that genetic determinants are involved in the pathogenesis of the disease.

1. INTRODUZIONE

1.1 IL RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA

Il rene con midollare a spugna (MSK) è una condizione malformativa renale che si associa ad un elevato rischio di sviluppare nefrocalcosi e calcoli renali e alla presenza di anomalie funzionali del nefrone tubulare (acidificazione e concentrazione urinaria) e dilatazioni cistiche dei dotti collettori precaliceali (che danno origine ad un aspetto simile ad una spugna della midollare renale, da cui il nome della malattia), nonché ad un moderato rischio di infezioni urinarie ed insufficienza renale (1, 2). La diagnosi è radiografica e l'urografia è l'indagine di riferimento. I quadri tipici sono caratterizzati da piccole raccolte di mezzo di contrasto che ristagna nei tubuli precaliceali ectasici con aspetti di spruzzi (blush) nei casi più lievi, o di striature lineari o, quando le dilatazioni sono quasi vere e proprie cisti, di bouquet di fiori. I casi classici coinvolgono tutte le papille renali bilateralmente, ma possono essere interessate solo le papille di un rene o alcune di esse. La maggior parte degli autori concorda sul fatto che si tratti di una patologia congenita ma con espressione ritardata, le cui manifestazioni più classiche sono la calcolosi calcica recidivante e la nefrocalcosi che si associano ad ipercalciuria, acidosi tubulare distale e ipocitraturia e meno frequentemente ad ematuria micro- e macroscopica (3, 4, 5). Una acidificazione urinaria difettiva potrebbe giocare un ruolo importante nel meccanismo di sviluppo di ipercalciuria e ipocitraturia (3) ed è possibile che basse escrezioni urinarie di citrato e magnesio (inibitori della formazione di calcoli) ed anomalie anatomiche (dotti collettori ectasici che possono causare stasi urinaria) siano responsabili della patogenesi della nefrolitiasi nei pazienti con MSK (5). Proteinuria, altre anomalie del sedimento urinario e ipertensione non sono presenti in assenza di complicanze. La malattia si riscontra in particolar modo in femmine adulte, anche se sono stati riportati in letteratura alcuni casi di manifestazioni cliniche di MSK in età pediatrica (1, 6, 7, 8). Sebbene possa essere sintomatico, in gran parte dei casi MSK può decorrere in maniera silenziosa. MSK si verifica generalmente in forma sporadica, sebbene siano stati descritti casi familiari (9, 10, 11), talvolta associati ad agenesia renale o ad altre malformazioni renali o delle vie urinarie, nei quali la malattia sembra essere ereditata in forma autosomica dominante (11, 12).

La sua prevalenza nella popolazione generale non è esattamente nota, ma si stima sia compresa tra 5 su 10.000 e 5 su 100.000. La tendenza crescente a ridurre l'impiego dell'urografia a seguito dell'introduzione di indagini che non richiedono mezzo di contrasto (ecografia, TAC spirale, risonanza magnetica) inevitabilmente fa sì che sempre meno casi di MSK vengano diagnosticati e che la familiarità possa non emergere. Pur essendo rara (MSK è presente nell'elenco delle malattie rare del D.M. n. 279/2001), la malattia è decisamente frequente nei pazienti con nefrolitiasi calcica recidivante (3-5%) (13).

MSK può associarsi a diverse condizioni congenite e malformative renali ed extra-renali, che includono la sindrome di Beckwith-Wiedemann, il tumore di Wilms e l'emi-ipertrofia congenita (14, 15, 16). Alcuni autori hanno proposto che quest'ultima e MSK costituiscano una forma parziale di sindrome di Beckwith-Wiedemann (16). Poiché l'associazione tra tumore di Wilms e MSK avviene sempre in presenza di una emi-ipertrofia congenita o di una sindrome di Beckwith-Wiedemann, si può postulare l'esistenza di una triangolazione tra queste malattie. È anche ipotizzabile che la sovrapposizione tra i tre diversi fenotipi clinici sia una sorta di 'sindrome da geni contigui', dal momento che sia l'emi-ipertrofia/sindrome di Beckwith-Wiedemann sia il tumore di Wilms sono causati da mutazioni a carico dell'area 11p del cromosoma 11 (17). Un secondo gruppo di patologie associate a MSK comprende le dilatazioni congenite intraepatiche dei dotti biliari e la fibrosi epatica (18), nonché il rene policistico nella sua forma autosomica dominante (19). La coesistenza di MSK con altre condizioni (alcune sono forme di ipertrofia tissutale locale), quali anodontia, sindrome di Ehlers-Danlos, sindrome di Marfan, sindrome di Young, stenosi congenita del piloro, displasia fibromuscolare dell'arteria renale, è meno frequente (20). Il fenotipo MSK è stato descritto in pazienti con vari disordini dello sviluppo renale, come rene a ferro di cavallo e rene piccolo congenito controlaterale (21, 22) e occasionalmente in associazione con anomalie ureterali, inclusa pelvi renale bifida (12).

L'iperparatiroidismo è di frequente riscontro (23). Tuttavia si ritiene sia secondario, assieme alla calcolosi, ad un difetto comune a MSK e ad alcune patologie ipertrofizzanti. In un caso MSK è stato trovato anche in associazione a neoplasia endocrina multipla di tipo 2A (carcinoma midollare della tiroide e concomitante iperparatiroidismo) (24). La paziente era portatrice di una mutazione del gene proto-oncogenetico RET, riscontro che

si verifica nell'80% dei casi di carcinoma midollare della tiroide, ma che potrebbe far intendere l'esistenza di un meccanismo patogenetico comune alle due malattie.

Nonostante la sua non infrequente associazione con disturbi malformativi, la patologia di MSK non è però ancora contemplata nell'elenco delle malattie renali da disturbi dello sviluppo embrionale (25).

La patogenesi di MSK non è ancora chiarita, ma dovrebbe giustificare la coesistenza di alterazioni di distretti anatomici di origine embriologica diversa, i dotti collettori e papillari di derivazione epiteliale e il nefrone di derivazione mesenchimale, come pure la sua frequente associazione con l'iperparatiroidismo e la sua associazione con diverse patologie malformative. L'esistenza di casi familiari, sebbene pochi, di MSK sembra comunque dare evidenza del ruolo di fattori genetici nello sviluppo della malattia e la scoperta del gene/i responsabile/i ne aiuterebbe la comprensione.

1.2 EMBRIOGENESI RENALE

Nei mammiferi, il rene si sviluppa in tre stadi: pronefro, mesonefro e metanefro, organi escretori tutti di derivazione mesodermica. Di questi, il metanefro differenzia nel rene permanente (26). L'organogenesi renale dipende da una serie di reciproche interazioni induttive tra l'abbozzo ureterale epiteliale e il mesenchima metanefrico (27, 28, 29). Dapprima, dal mesoderma intermedio si forma il dotto di Wolff, che cresce dal lato caudale inducendo gli apparati tubulari del pronefro e i reni mesonefrici che sono organi transienti nei vertebrati superiori. In seguito, alcuni segnali che originano da un cluster di cellule del mesoderma intermedio, noto come mesenchima metanefrico, iniziano lo sviluppo renale vero e proprio inducendo una evaginazione dall'estremità caudale del dotto mesonefrico di Wolff chiamata abbozzo ureterale. La gemma ureterale in crescita si allunga fino ad invadere il mesenchima metanefrico, inizia a ramificare in risposta a segnali mesenchimali e a sua volta secerne segnali che inducono le cellule mesenchimali a condensare e generare aggregati pre-tubulari alle estremità dei rami dell'abbozzo ureterale. Gli aggregati vanno incontro a diversi stadi morfologici, che includono i corpi comma- e S-shaped, formando i tubuli metanefrici, che maturano e diventano i tubuli prossimali e distali responsabili della regolazione del trasporto di ioni e molecole organiche (tubulogenesi), e la componente epiteliale glomerulare, addetta alla filtrazione.

Questo processo di epitelizzazione è noto come trasformazione mesenchimale-epiteliale (MET). Le strutture tubulari fonderanno alla fine per formare il nefrone, l'unità funzionale del rene. I nefroni in formazione attraggono anche le cellule endoteliali per rendere funzionali i glomeruli. In più, vascolarizzazione e innervazione sono essenziali per la funzione renale (26, 27, 28, 29) (figura 1).

La ramificazione dell'abbozzo ureterale avviene circa 15 volte durante lo sviluppo nell'uomo, generando normalmente tra 300.000 a 1 milione di nefroni per rene (30). La formazione dei rami laterali, sviluppatasi da un unico tronco principale, è seguita dalla loro biforcazione in due rami fratelli (sequenziali divisioni dicotome) (figura 2).

La formazione di pelvi e calici renali, che costituiscono la parte del sistema collettore urinario che conduce all'uretere, avviene attraverso la crescita e la dilatazione dei primi segmenti della ramificazione.

La nefrogenesi può dunque essere divisa arbitrariamente in quattro processi interdipendenti: 1) induzione dell'abbozzo ureterale; 2) sviluppo del sistema collettore (uretere, calici e dotti collettori midollari e corticali); 3) conversione del mesenchima metanefrico in epitelio, seguita dalla formazione dei tubuli; e 4) glomerulogenesi.

Ogni step è complesso e richiede una varietà di geni che codificano per fattori di crescita, recettori, molecole di adesione cellula-cellula e cellula-matrice e fattori di trascrizione e che sono stati scoperti grazie ad esperimenti funzionali in modelli murini o a suggestivi fenotipi umani (31, 32, 33). Sia la transizione delle cellule mesenchimali del metanefro a cellule del nefrone sia la corretta polarizzazione delle cellule tubulari sia la specializzazione dei diversi segmenti tubulari del nefrone richiedono messaggi differenziativi che originano dall'interfaccia 'abbozzo ureterale - mesenchima metanefrico' (28).

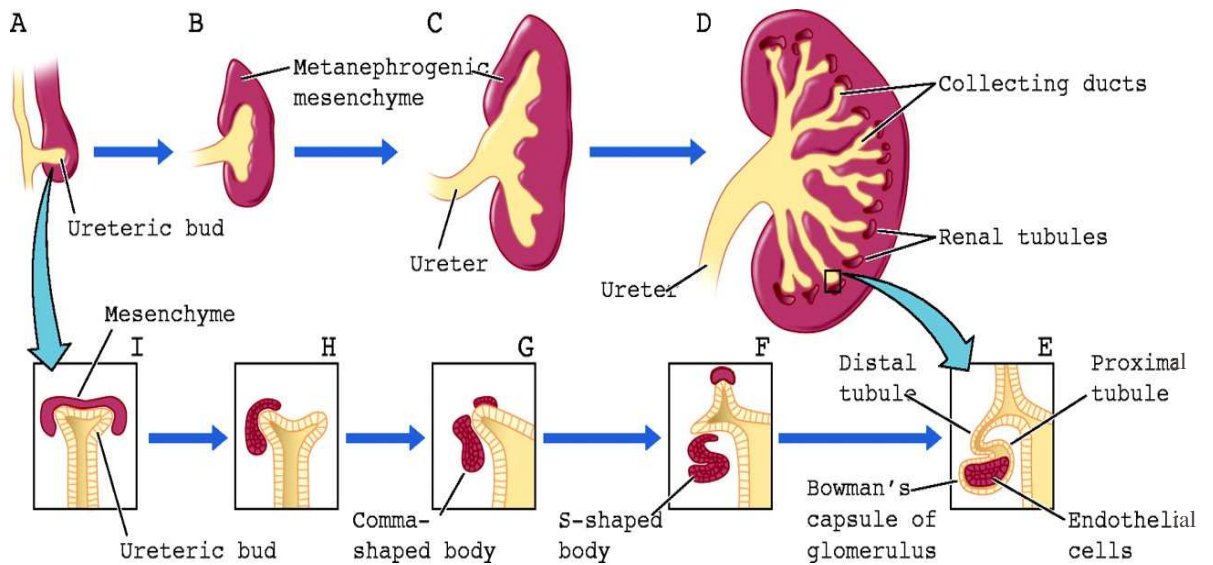


Figura 1. Morfogenesi della ramificazione dell'abbozzo ureterale e formazione del nefrone.

A, B: crescita dell'abbozzo indotta da segnali che originano dal mesenchima metanefrico; C,D: allungamento e ramificazione dell'abbozzo; E, F, G, H: MET via corpi comma- e S-shaped alle estremità dei rami dell'abbozzo e formazione dei diversi componenti del nefrone. Immagine tratta da: Sampogna RV, Nigam SK. *Physiology* (Bethesda). 2004; 19:339-47.

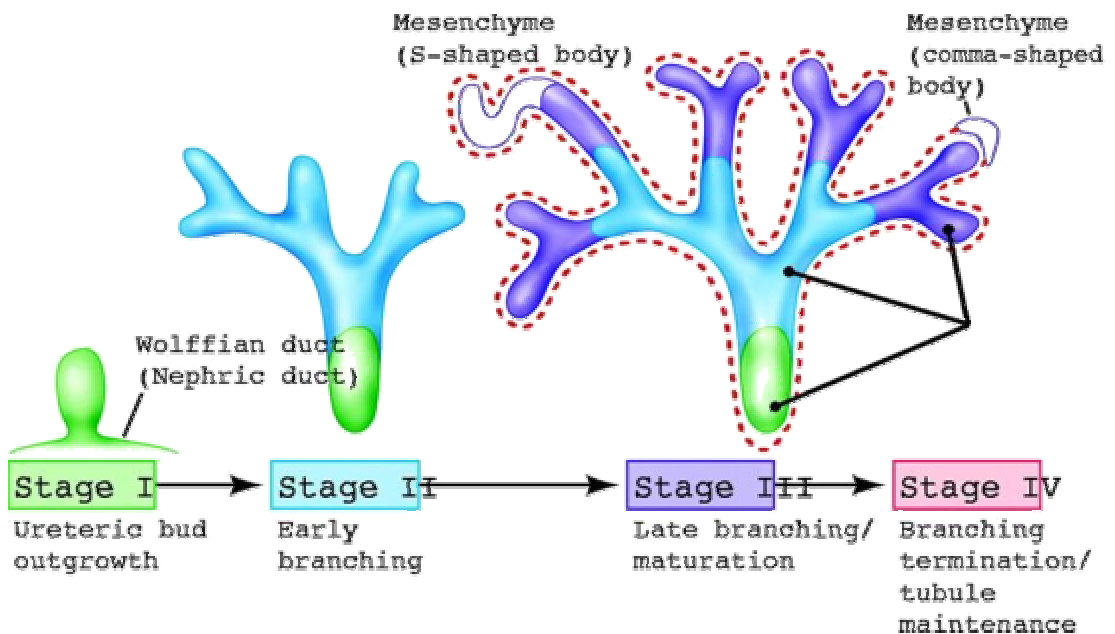


Figura 2. Stadi della ramificazione dell'abbozzo ureterale.

Immagine tratta da: Sampogna RV, Nigam SK. *Physiology* (Bethesda). 2004; 19:339-47.

1.2.1 RUOLO DEL SEGNALE GDNF/RET NELLO SVILUPPO RENALE

Una molecola induttiva che è prodotta dal mesenchima metanefrico e che ha un ruolo particolarmente critico nel processo di crescita e ramificazione dell'abbozzo ureterale è il fattore neurotrofico GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (28, 34, 35). A differenza degli altri membri della famiglia TGF- β a cui appartiene, GDNF richiede per il suo pathway segnale un recettore tirosina-chinasi (RET) associato ad un co-recettore (Gfr α 1) (36, 37). Nelle fasi iniziali dello sviluppo renale, RET e Gfr α 1 sono espressi entrambi lungo il dotto di Wolff. GDNF invece è espresso solo nel mesenchima metanefrico adiacente alla parte caudale del dotto mesonefrico da cui evaginerà l'abbozzo ureterale. Con l'inizio della diramazione dell'abbozzo, l'espressione di RET e Gfr α 1 viene sottoregolata nel dotto e si concentra alle estremità distali delle biforcazioni, mentre GDNF si esprime nel mesenchima periferico indifferenziato che circonda tali estremità (38, 39).

Per assicurare un'espressione così localizzata, sono necessari fini meccanismi di regolazione. È stato identificato un network di fattori di trascrizione che promuove l'espressione di GDNF nel mesenchima metanefrico (figura 3), e che include WT1 (codificato dal gene soppressore del tumore di Wilms), Pax2, Eya1, Sall1 e paraloghi di Hox11 (40). In aggiunta, sembra essere importante anche il membro GDF-11 della famiglia TGF- β , che agisce a monte dei geni Hox (41). Sono stati individuati anche alcuni regolatori negativi che limitano il dominio di espressione di GDNF: il fattore di trascrizione Foxc1, normalmente espresso nel mesenchima metanefrico, e il fattore secreto Slit2, assieme al suo recettore Robo2, espressi rispettivamente nel dotto di Wolff e nel mesenchima durante le fasi iniziali dello sviluppo renale (42, 43). Anche per regolare la risposta al segnale indotto da GDNF è richiesta la cooperazione di più pathways. Un meccanismo che agisce a valle del recettore RET coinvolge Sprouty1, un regolatore negativo del segnale Ras/Erk MAPK (uno dei pathways segnale attivati da GDNF/RET) che è espresso abbondantemente nel dotto di Wolff (44, 45). Un'altra fonte di regolazione negativa viene dal fattore di crescita BMP4, espresso nel mesenchima che circonda il dotto di Wolff, e da Gremlina, un antagonista di BMP2 e BMP4 (e debolmente di BMP7), la cui funzione si ritiene sia bloccare l'effetto inibitorio di una molecola BMP durante l'evaginazione dell'abbozzo ureterale (46, 47). Il target di

Gremlina in questo stadio è BMP4, poiché BMP2 è espresso solo tardivamente nella fase di formazione del nefrone e BMP7 non è coinvolto in questo processo (47). Il ruolo di BMP7 è invece promuovere la sopravvivenza del mesenchima metanefrico, che in sua assenza va incontro ad apoptosi impedendo la nefrogenesi (48). Studi knockout per ciascuno di questi geni dimostrano che la loro assenza causa bozze ureterali multiple e ureteri ectopici (35, 45, 46). La mancanza di Gremlina in più causa agenesia renale (47). Anche l'intervento di un altro membro della famiglia TGF- β , Activina A, che è prodotto dal dotto di Wolff e dal mesonefro circostante, può aiutare a sopprimere la formazione di un abbozzo ectopico (49).

L'insieme di tutti questi meccanismi fa sì che avvenga la formazione di un unico abbozzo ureterale e nella corretta posizione.

È stato condotto uno studio molto dettagliato sul segnale GDNF/RET nell'embriogenesi renale. Tutti concordano sull'importanza del segnale indotto da GDNF non solo nel primo stadio di evaginazione dell'abbozzo ureterale, ma anche negli step successivi di continua formazione di diramazioni dell'abbozzo che avvengono durante tutto lo sviluppo renale. Il ruolo del segnale è triplice: 1) promuove la gemmazione del dotto di Wolff e il suo sito di sintesi ne determina la locazione esatta; 2) promuove la ramificazione di un tubulo epiteliale; 3) promuove la proliferazione delle cellule localizzate all'estremità dell'abbozzo ureterale (35). Quest'ultima affermazione è in linea con la capacità di RET di agire come un proto-oncogene nelle cellule neuroendocrine (36) e con l'attività mitogenica di GDNF nei confronti delle cellule della cresta neurale enterica (50) e delle cellule del Sertoli (51).

GDNF sembra svolgere anche un ruolo chemoattrattivo nel rene. È in grado di guidare la crescita delle cellule localizzate all'estremità dell'abbozzo, che sono sensibili al suo livello di concentrazione (34, 52), ma altri fattori possono agire allo stesso modo.

Una delle maggiori conseguenze del segnale GDNF/RET è l'attivazione trascrizionale di un set di geni target. Uno è il gene RET stesso (53). Un altro è un membro della superfamiglia Wnt, Wnt11, che è espresso nelle estremità distali delle biforcazioni e funziona in parte controllando i livelli di espressione di GDNF (53, 54). Un terzo gene target è Sprouty 1, di cui si è accennato precedentemente.

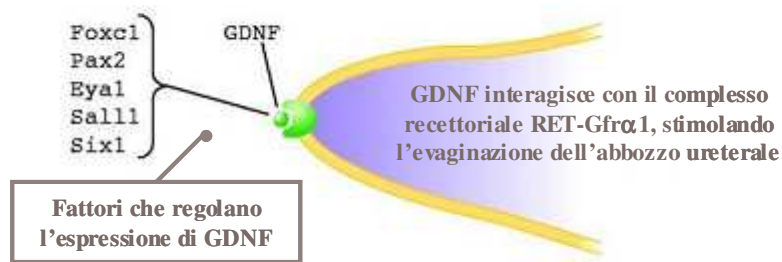


Figura 3. Fattori coinvolti nella fase iniziale di induzione dell'abbozzo ureterale.
 Immagine modificata da:
 Sampogna RV, Nigam SK. *Physiology* (Bethesda). 2004; 19:339-47.

1.2.2 EVIDENZE IN VIVO DELL'IMPORTANZA DEL SEGNALE GDNF/RET NELLO SVILUPPO RENALE

Modelli animali transgenici o knockout costituiscono un'utile fonte di studio dei meccanismi che sottostanno ad un determinato processo. Eventi mutazionali in geni indispensabili per lo sviluppo embrionale saranno deleteri e causeranno la morte dell'embrione. L'abolizione della funzione di geni che invece suppliscono lo stesso compito (nel qual caso si parla di ridondanza genetica) non avrà in linea di massima nessun effetto sul fenotipo. La letteratura riporta diversi esperimenti di inattivazione in vivo dei geni GDNF o RET (55, 56, 57, 58). In entrambi i casi il risultato è agenesia renale, dovuta ad una mancata evaginazione dell'abbozzo ureterale dal dotto di Wolff. Alcuni animali eterozigoti per un allele nullo di GDNF o RET mostrano invece agenesia renale unilaterale o ipoplasia (55, 56, 57, 58). La penetranza è però variabile: una certa percentuale di mutanti presenta reni e apparato ureterale rudimentali, indicando che esistono dei meccanismi compensatori che permettono comunque la prosecuzione dello sviluppo renale. Esperimenti di espressione ectopica di RET in topi transgenici hanno dimostrato lo sviluppo di reni piccoli e cistici (59). Ulteriore evidenza dell'importanza di GDNF è data dalla formazione di abbozzi ureterali soprannumerari ed ectopici o dalla mancanza dell'abbozzo in presenza di mutazioni dei geni che regolano nel tempo e nello spazio il livello di espressione di GDNF. Queste anomalie dello sviluppo sono quindi conseguenza di una alterata espressione di GDNF (35, 40). La conferma che il segnale

GDNF/RET è necessario anche per la continua crescita e ramificazione ureterale si è basata su osservazioni in modelli murini che portavano mutazioni in questi geni che riducevano, ma non eliminavano, il segnale. Il fenotipo risultante era un rene ipodisplastico (57, 60).

1.2.3 ALTRE MOLECOLE COINVOLTE NELLO SVILUPPO RENALE

Lo sviluppo renale ha bisogno di una precisa coordinazione spazio-temporale di numerose interazioni biomolecolari. Ogni suo stadio è caratterizzato da un rapporto bilanciato tra fattori stimolatori e fattori inibitori che ne determina l'avanzamento o meno. Preponderanza di molecole inibitorie si trova nella fase tardiva e terminale in cui si ha un rallentamento della crescita e della ramificazione dei tubuli epiteliali fino alla cessazione di entrambe. Nonostante l'azione di GDNF, RET e dei numerosi fattori di trascrizione correlati al segnale GDNF/RET sia cruciale ed essenziale nel processo di evaginazione dell'abbozzo ureterale, le fasi successive della ramificazione dei tubuli epiteliali sono caratterizzate da ridondanza molecolare e capacità di sopperire alla perdita di attività di un fattore coinvolto (29) (figura 4). Studi di inattivazione genica di molecole target che si ritiene abbiano un ruolo in questo processo hanno infatti dimostrato che i fenotipi renali che ne conseguivano non erano aberranti. Nessun difetto apparente a livello renale era visibile ad esempio in topi knockout per Wnt-1 (61), MMP-9 (62), integrina- β_6 (63) e BMP5 (64), fattori di cui è noto il coinvolgimento nello stadio iniziale e tardivo della ramificazione ureterale. Questo vuol dire che mutazioni in tali geni sono ampiamente tollerate e non sono deleterie, perché l'azione di queste molecole viene compensata da altre in grado di svolgere la stessa funzione. Mentre numerosi membri della famiglia FGF dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGFs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9) sono espressi nello sviluppo renale ma nessun modello knockout per questi geni causa difetti di sviluppo (65), solo FGF7 e FGF10 sembrano essere implicati con una certa importanza nel processo di ramificazione ureterale. La loro funzione è di promuoverne diversi aspetti. Entrambi i fattori si legano al recettore tirosina-chinasi FGFR2b, che è espresso prevalentemente o esclusivamente nell'epitelio dell'abbozzo, e mostrano un pattern di espressione sovrapponibile (66, 67), per cui si ritiene siano intercambiabili.

I segnali destinati a dare fine all'accrescimento e alle divisioni dicotome sono invece poco conosciuti. Esperimenti in vitro comunque ne hanno individuato alcuni che potrebbero agire in questo senso. Specifiche proteine della matrice, quali endostatina, TIMP1 (inibitore tissutale delle metalloproteasi 1, nello specifico di MMP9) e TIMP2 sembrano inibire la ramificazione (68, 69, 70). Durante lo sviluppo renale è richiesto infatti un rimodellamento strutturale dell'apparato matriciale. Fattori solubili prodotti dal mesenchima metanefrico modulano l'espressione di specifici sottogruppi di MMPs e TIMPs. Nel tempo vi è un cambiamento di espressione e della matrice in cui gruppi differenti di MMPs e dei loro inibitori svolgono ruoli diversi (71). Inoltre, anche membri della superfamiglia TGF- β , quali BMP2, BMP4, activina A, TGF- β 1 e TGF- β 2, sono in grado di sopprimere fattori stimolatori della crescita, ed alcuni di essi possono quindi agire da segnali di stop (72, 73). Difetti in questo stadio dello sviluppo renale tendono a dare fenotipi cistici (31). Questo è stato dimostrato in esperimenti murini di sovraespressione di fattori che promuovono la crescita e la diramazione ureterale, e che includono HGF (fattore di crescita epatica), TGF- β (fattore di crescita trasformante- β) e EGFR (recettore del fattore di crescita epiteliale) (74), e in topi knockout eterozigoti od omozigoti per molecole inibitorie (BMP4, TGF- β 2) (31, 75, 76).

Alcuni dei prodotti genici che intervengono in questi stadi possono partecipare anche alla transizione mesenchimale-epiteliale, che avviene approssimativamente nello stesso tempo. Un fattore, Wnt4, sembra invece sia importante solo per lo sviluppo del mesenchima ma non per la formazione dei tubuli epiteliali (77), come pure il fattore inibente la leucemia, LIF, che favorisce la MET (78). Il fattore di trascrizione Pod1 è al contrario coinvolto in entrambi i processi (79).

La glomerulogenesi infine è un evento coordinato di sviluppo epiteliale, vascolare e mesangiale. Prodotti genici che includono componenti della membrana basale glomerulare e podocitari, quali LMX1b, nefrina, WT1, laminina α_5 , Pod1 e α -actinina 4, sono necessari perché avvenga (25).

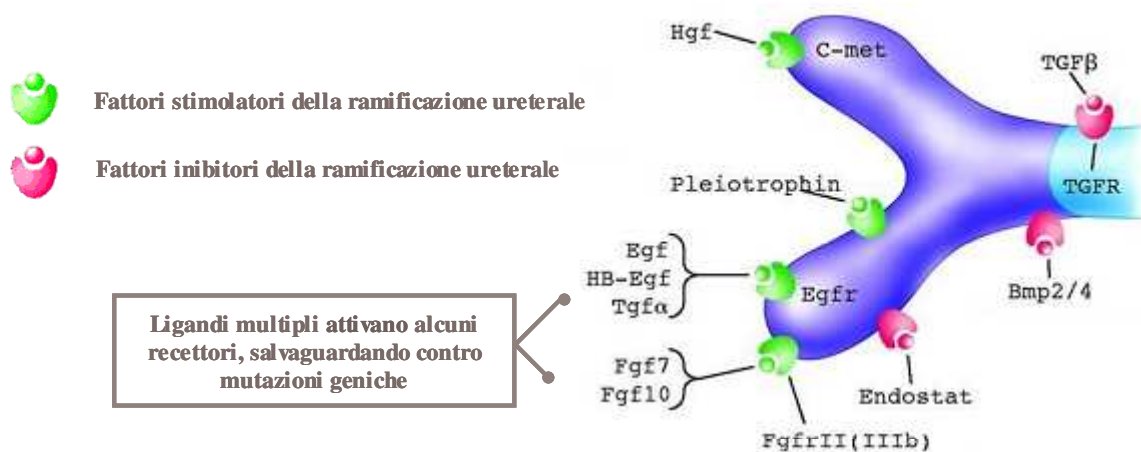


Figura 4. Fattori coinvolti negli stadi II e III del processo di ramificazione dell'abbozzo ureterale.
 Immagine modificata da:
 Sampogna RV, Nigam SK. *Physiology* (Bethesda). 2004; 19:339-47.

1.3 COME IDENTIFICARE “GENI MALATTIA”

Quando si suppone che una patologia possa avere una base genetica, esistono due possibili approcci per identificare i cosiddetti “geni malattia”.

Il primo è chiamato genome wide-search o genome scan. Si tratta di una strategia di ricerca per individuare nel genoma il mappaggio di un gene (locus) implicato nella determinazione di una patologia che si eredita come carattere mendeliano. È un esempio di analisi di linkage in famiglie con ricorrenza di individui affetti estesa a tutto il genoma. L'analisi di linkage si basa sulla co-ereditarietà di loci che si trovano vicini l'uno all'altro sullo stesso cromosoma. Si vuole quindi cercare una serie di marcatori ereditati insieme e comuni a tutti i soggetti affetti. Diversi marcatori possono avere lod score significativi anche se in posizioni diverse del genoma. Di questi, bisogna stabilire qual è la localizzazione cromosomica, quindi estendere l'indagine con marcatori fiancheggianti il marcatore significativo. Il passaggio successivo è l'identificazione del “gene malattia”. Si definisce una regione candidata più piccola possibile (mediante candidate positional cloning), si analizzano i geni in essa contenuti con le banche dati e si stabiliscono dei criteri per selezionare il gene candidato: la modalità di espressione (deve essere espresso

nel tessuto in cui si manifesta il fenotipo clinico), la funzione, e l'omologia con un gene paralogo od ortologo (se mutazioni in un omologo causano fenotipi simili, allora si tratta di un buon gene candidato). Il gene candidato va poi confermato. Si fa quindi uno screening mutazionale, si produce un modello animale della malattia e si fanno studi in vitro. Un limite però è rappresentato dalla difficoltà di reperire grosse famiglie per l'analisi e a volte dalla rarità della forma familiare.

La seconda strategia è l'approccio del gene candidato, che si basa sull'ipotesi che alcuni geni, in base alla loro funzione fisiologica e biochimica, possano influenzare direttamente o indirettamente un carattere fenotipico. L'utilizzo di geni candidati può portare velocemente all'identificazione del "gene malattia", in quanto si fa uno screening di mutazioni dei geni prescelti e si studiano direttamente associazioni tra polimorfismi/mutazioni in questi geni e i caratteri fenotipici (studi di associazione), il tutto senza analizzare completamente il genoma, come nel caso del genome scan. Il passaggio successivo è l'analisi quantitativa di espressione del gene candidato.

Se il gene candidato è responsabile solo di una piccola porzione di casi, molti campioni non mostreranno mutazioni in quel gene. Le mutazioni trovate possono rappresentare alterazioni di un gene modificatore e risulta quindi difficile ipotizzare un semplice modello mendeliano di ereditarietà monogenica. Un modello di tipo oligogenico può spiegare l'esistenza di più loci che, interagendo geneticamente tra loro, hanno un ruolo causale e/o modificatore del fenotipo nella stessa o in diverse famiglie.

Il problema principale tuttavia risiede, in certi casi, nel notevole numero di possibili geni candidati. Il genome scan e l'approccio del gene candidato possono essere complementari.

1.4 PATOGENESI MOLECOLARE: IPOTESI

Alla luce di tutte queste informazioni, in questo studio si è ipotizzato che MSK sia una patologia disembrionica, ossia un disordine dello sviluppo, vista la sua frequente associazione con varie condizioni malformative renali ed extra-renali.

Fino ad ora non è stato condotto nessuno studio genetico di MSK. La strategia con cui si è voluto procedere per indagarne le basi genetiche alla ricerca di mutazioni disease-causing, nell'ipotesi di una malattia monogenica, o di gene/i di suscettibilità, nell'ipotesi

di una malattia multifattoriale, è l'approccio del gene candidato. Alterazioni della nefrogenesi possono portare ad alterazioni funzionali del nefrone. Sia la transizione delle cellule mesenchimali del metanefro a cellule del nefrone sia la corretta polarizzazione delle cellule tubulari sia la specializzazione dei diversi segmenti tubulari del nefrone richiedono messaggi differenziativi che originano dall'interfaccia 'abbozzo ureterale - mesenchima metanefrico' (28). L'ipotesi che si avanza è che MSK possa essere la conseguenza di una disregolazione che avviene a livello di questa interfaccia, ossia di un danneggiamento dei processi molecolari coinvolti nella crescita e ramificazione dell'abbozzo ureterale e del cross-talk con il mesenchima metanefrico, probabilmente dovuto a mutazioni o polimorfismi funzionalmente rilevanti dei geni che vi sono implicati. I geni che regolano l'embriogenesi renale sono quindi divenuti i possibili candidati per la spiegazione di un'alterazione fenotipica del tipo osservato in MSK. La concomitanza di alterazioni dei dotti precaliceali e collettori (cisti e nefrocalinosi) e di difetti funzionali multipli del tubulo nefronico (iperparatiroidismo, ipocalciuria, acidificazione) nel rene MSK ha suggerito in particolar modo il coinvolgimento di fattori morfogenetici implicati non soltanto nell'induzione ureterale, nello specifico GDNF e RET. Il segnale GDNF/RET è infatti indispensabile non solo per lo sviluppo corretto dell'uretere e dei dotti collettori, entrambi di origine wolffiana, ma anche per la nefrogenesi (28). Se alterazioni geniche di GDNF e RET fossero implicate, si spiegherebbero anche l'associazione di MSK con altre anomalie di sviluppo del rene, che si verifica con una prevalenza maggiore rispetto alla popolazione generale (22), e la sua frequente associazione con l'iperparatiroidismo, che è anche una delle manifestazioni della neoplasia MEN2A che si sa essere causata da mutazioni del gene RET (80).

1.5 GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF): STRUTTURA DEL GENE

Il gene umano GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) codifica per un fattore neurotrofico altamente conservato. Caratterizzato nel 1993 come fattore proteico secreto dalla linea cellulare gliale B49 di ratto (81), GDNF è inizialmente sintetizzato come un lungo precursore inattivo denominato pre-proGDNF. Il proGDNF secreto va poi incontro ad un taglio proteolitico ad opera di una proteasi ancora sconosciuta, probabilmente

correlata a regolatori apoptotici, formando così la proteina matura GDNF di 134 aminoacidi. Questa forma matura, che esiste sottoforma di omodimero legato da ponti disolfuro, è la sola biologicamente attiva (81, 82). La proteina GDNF è ligando del prodotto del proto-oncogene RET (rearranged during transfection) e differisce dalle altre neurotrofine, in primo luogo perché è N-glicosilata in due residui aminoacidici e in secondo luogo perché presenta sette residui cisteina conservati, come i membri della superfamiglia TGF- β (81, 83, 84).

Il gene GDNF è stato mappato sul cromosoma umano 5 nell'area 13.2p (82). Tre trascritti che originano da splicing alternativo codificano per il peptide segnale, per la pro-regione di lunghezza variabile a seconda del tipo di splicing e per il dominio della proteina matura, e producono diversi prepropeptidi che in ultimo generano omodimeri identici della forma matura di GDNF di 134 aminoacidi (85, 86). Il confronto proteico tra GDNF umano e di ratto evidenzia una notevole conservazione di sequenza aminoacidica nella isoforma lunga, con il 100% di identità nella sequenza segnale di 19 aa, il 90% nel pro-segmento di 58 aa e il 93% nella sequenza di 134 aa della proteina matura (81).

Non ci sono dati molto aggiornati in letteratura che riguardano l'organizzazione strutturale del gene e le informazioni a disposizione sono state recuperate dal sito web di Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). La documentazione scientifica parla infatti di una struttura relativamente semplice che consiste di tre esoni (87, 88, 89), mentre continui updates del database genomico hanno modificato il numero degli esoni portandolo attualmente a cinque (figura 5). Essi sono intervallati da introni molto grandi. È proprio la grandezza di questi ultimi che fa sì che il gene copra una regione cromosomica di 27 kb. L'esone 3 è il più piccolo dei cinque esoni, essendo costituito da 97 pb. Gli esoni 1, 2 e 3 e 26 pb dell'esone 4 rappresentano la regione non tradotta 5' UTR del gene. Il codone di start traduzionale è quindi localizzato nell'esone 4. La sequenza codificante di questo esone codifica dei residui aminoacidici che appartengono alla regione prepro della proteina GDNF (81). L'estremità 3' dell'esone 4 è sito di splicing alternativo. L'utilizzo di un sito criptico di splicing nell'estremità 5' dell'introne 4 determina una delezione interna di 78 pb nel messaggero (85, 86). A livello proteico, questa delezione si traduce nella perdita di 26 aminoacidi e in una sostituzione da glicina ad alanina (90). Dato che questi cambiamenti avvengono nella regione prepro della proteina, che va dall'N-terminale al sito di taglio proteolitico, i prodotti finali di

entrambe le isoforme di mRNA sono identici. Studi di espressione che non hanno trovato differenze biologiche tra i peptidi codificati dal trascritto alternativo più corto e dal messaggero lungo di GDNF lo hanno dimostrato (91).

L'esone 5 è il più grande degli esoni del gene e contiene la maggioranza della sequenza codificante. La parte rimanente della regione prepro e tutti i residui aminoacidici che fanno parte del polipeptide maturo GDNF sono quindi codificati da questo esone. 129 pb a valle del codone di stop, quindi nella regione non tradotta 3' UTR del gene, è presente una ripetizione polimorfica AGG, che non è stata rilevata nel corrispondente messaggero murino (87). Parecchie malattie neurodegenerative sono causate da un significativo allungamento delle ripetizioni di questa tripletta (92).

È stato identificato solo nella linea cellulare di rene embrionale umano 293 anche un quarto trascritto che manca dell'intera sequenza dell'esone 4, e quindi del corrispondente codone di start (87). Due altri ATG in frame sono comunque stati trovati a 6 e 42 pb a valle del 5' dell'esone 5, dando la possibilità di un secondo sito di inizio della traduzione. L'esone 4 sembra essere essenziale per il corretto processamento cellulare che produce una forma secreta di GDNF, mentre l'espressione dell'esone 5 da solo è sufficiente solo per codificare una forma matura di GDNF che viene ritenuta all'interno della cellula. Questo trascritto non è stato ancora trovato in altri tessuti e potrebbe essere specifico di questa linea tumorale o dello sviluppo (87).

La sequenza dell'estremità 5' del gene mostra tutti i segni distintivi tipici di una regione promotore. Inizialmente questa sequenza è stata caratterizzata come altamente ricca in GC (>72%) e senza i motivi canonici CCAT- e TATA-box (88, 89), combinazione inizialmente associata ai geni housekeeping ed ora frequentemente descritta anche per geni altamente regolati (93). Altri autori hanno però localizzato in una regione di 340 pb a monte dell'esone 1 gli elementi essenziali del promotore, inclusi TATA-box, GC box, sito CREB. Il gene GDNF sembra quindi guidato da un promotore inducibile che contiene un prossimale e putativo TATA-box che precede l'esone 1 (87).

La regione regolatoria 5' è estremamente ricca di elementi in cis canonici e più di 12 potenziali siti di legame per fattori di trascrizione sono localizzati all'interno di 520 pb di sequenza nucleotidica. La regione promotore di GDNF può essere divisa approssimativamente in due parti. Il promotore prossimale è ricco di siti di legame per il fattore proteico Sp1. Ci sono almeno quattro elementi Sp1 in cis all'interno di una

sequenza di 300 pb, e tre di questi sono raggruppati nella regione prossimale (88). La prevalenza di elementi multipli Sp1 in cis è comune nei geni che mostrano un grado di espressione costitutiva. Nei promotori senza TATA-box, sembra che la proteina Sp1 ancori il macchinario trascrizionale al DNA, permettendo quindi l'inizio della trascrizione (94). La regione del promotore prossimale contiene anche un sito di legame consenso per il fattore di trascrizione muscolo-specifico MNF. Il segmento distale 5' del promotore differisce marcatamente dalla regione prossimale appena descritta e contiene svariati elementi putativi in cis che possono alterare l'espressione di GDNF in risposta a stimoli legati allo sviluppo, tessuto-specifici e ambientali. Questa regione del promotore contiene tre MRE (metal response elements) in una regione di 220 pb (88). Questi elementi in cis in multipla copia sovraregolano la trascrizione in risposta a elevate concentrazioni di certi metalli (cadmio, zinco, rame) e in risposta a stress ossidativi (95, 96). Tra i due MREs più distali ci sono un sito NFkB e un elemento di risposta all'AMP ciclico (CRE). Anche questi due elementi possono mediare alterazioni di espressione di GDNF. Il sito Zif/268 definisce la linea di demarcazione tra le regioni prossimale e distale del promotore (88). Questo fattore di trascrizione media l'espressione genica in risposta alla depolarizzazione (97). Infine, è stato identificato un elemento putativo in cis denominato GPR (GDNF Promoter Repeat). Questo elemento è rappresentato da un sito costituito di due parti, la seconda delle quali è una ripetizione invertita della prima e dista da essa 10 pb, e gioca anch'esso un ruolo nella trascrizione di GDNF (88).

Due studi precedenti all'update del database genomico hanno postulato l'esistenza di promotori intragenici in quello che al tempo era l'introne 1 (87, 98). È stato descritto un secondo elemento promotore, più debole, nella regione fiancheggiante l'estremità 5' dell'attuale esone 4, esattamente a 0.9 kb a monte dell'esone. Un'analisi comparativa dei due promotori ha mostrato un'attività molto più alta per il primo promotore (87). Il secondo promotore GDNF mancherebbe di CCAAT- e TATA-box, ma presenterebbe siti di legame multipli per fattori di trascrizione come CREB, AP2, Zif/268, NFkB e MRE-BP. Suter-Crazzolaro et al. avevano inoltre proposto che potessero esistere esoni alternativi nell'introne 1 e, secondo i loro dati, gli esoni che andavano incontro a splicing alternativo erano localizzati proprio intorno a quelle 0.9 kb prima citate (98).

L'organizzazione del gene nella sua interezza assomiglia a quella riportata per il gene omologo murino. Nel topo, il gene è composto da 3 esoni (99). Grimm et al. hanno

stabilito una lunghezza di 1.1 kb per l'esone 1 umano e hanno proposto che il sito putativo di inizio della trascrizione per il gene umano sia lo stesso che nel topo (87). Entrambi i geni sono guidati da un TATA-box e dalla sua regione prossimale (100). Altri autori hanno ritenuto invece che ci fossero delle differenze tra le due specie all'estremità 5' del gene e che i geni umano e murino iniziassero la trascrizione in siti differenti, e molto probabilmente utilizzando promotori diversi (88, 89). Il confronto delle sequenze genomiche mostra il 95% di omologia tra topo e uomo per le 115 pb a monte del sito di inizio della trascrizione, incluso il TATA box, ma un'omologia più bassa per l'esone 1 (70%). L'elevata conservazione di entrambe le sequenze umana e murina suggerisce l'esistenza di importanti elementi regolatori in questa regione (87).

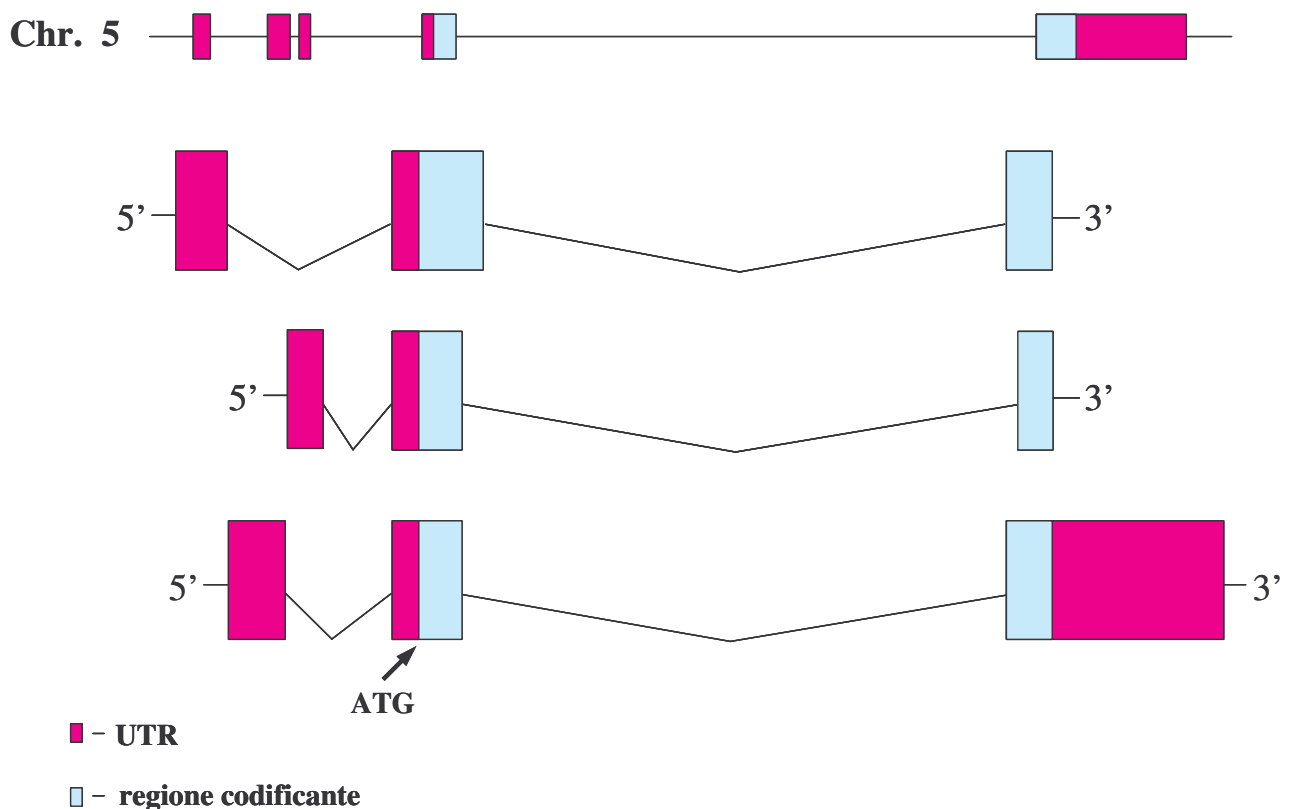


Figura 5. Rappresentazione schematica del gene umano GDNF e dei tre principali trascritti che si generano per splicing alternativo. Gli esoni sono raffigurati da rettangoli, mentre gli introni da linee continue.

1.6 PROTO-ONCOGENE RET (REARRANGED DURING TRANSFECTION): STRUTTURA DEL GENE

Il proto-oncogene RET (rearranged during transfection), identificato nel 1985 come un gene riarrangiato in un esperimento di transfezione cellulare (101), è localizzato nella regione pericentromerica del cromosoma umano 10 nell'area 11.21q, è costituito da 20 esoni che sono distribuiti lungo 53.28 kb di DNA genomico (102, 103) (figura 6), e codifica per un recettore transmembrana tirosina-chinasi di 1114 residui aminoacidici. Il recettore RET consiste di una porzione extracellulare composta da sei domini differenti (quattro domini caderina-simili, un sito di legame per il calcio e un dominio ricco di cisterna), di un dominio transmembrana monopasso e di una porzione intracellulare che contiene due distinti domini tirosina-chinasici. Il dominio intracellulare di RET contiene almeno dodici siti di autofosforilazione (104, 105). Il dominio extracellulare è codificato da 10 esoni, mentre il dominio citoplasmatico da 9 esoni. Il dominio transmembrana è invece codificato da un unico esone (106). La proteina RET, membro della superfamiglia delle caderine, è una subunità di un complesso multimolecolare che lega i fattori di crescita della famiglia GDNF, che includono GDNF, neurturina (NTN), artemina (ARTN) e persefina (PSPN), e trasduce segnali di crescita, differenziazione e motilità cellulare. Ciascuno dei ligandi, per attivare RET, ha bisogno della presenza di un co-recettore specifico, una proteina di membrana ancorata ad un glicolipide, il glicosilfosfatidilinositolo, e denominata Gfr α (1-4, a seconda del ligando). L'attivazione del recettore da parte del complesso ligando/co-recettore comporta la dimerizzazione di RET e la fosforilazione di specifici residui tirosina presenti nel dominio intracellulare, che stimola l'attività tirosina-chinasica. Le tirosine fosforilate servono da siti di attracco per le proteine che trasducono il segnale all'interno della cellula (36, 107). Questi ligandi in alcuni casi sono in grado di segnalare anche indipendentemente da RET via Gfr α (108).

Da un confronto tra il gene RET umano e murino, l'organizzazione genomica sembra altamente conservata, in termini di grandezza degli esoni e degli introni e di posizione dei siti di poliadenilazione. Una regione che si estende 386 pb a monte del primo esone è stata sequenziata e confrontata con la sua controparte murina. Alcune caratteristiche riportate per il promotore umano sono conservate, come l'assenza di CAAT- e TATA-box e un alto contenuto in CG (>76%) (109). Non si sa molto dei fattori di trascrizione

che si legano al promotore del gene. Sono stati identificati alcuni elementi cis-regolatori responsabili dell'attività del promotore basale di RET, localizzati nelle 70 pb a monte del sito di inizio della trascrizione, che corrispondono a due siti di legame Sp1/Sp3 (110). Nel promotore sono presenti anche altri siti di legame per fattori di trascrizione, come quattro GC box ripetute in tandem e siti di legame ETF e AP-2. Molti di questi siti sono localizzati nelle isole CG in prossimità del sito di inizio della trascrizione. Questo promotore estremamente ricco di sequenze dinucleotidiche CG è trascrizionalmente inattivo in molti, se non tutti, i tessuti umani, ma manca di residui citidina metilati nella regione prossimale a monte del sito di inizio della trascrizione (109). La metilazione di sequenze specifiche del promotore è frequentemente responsabile dell'inattivazione a lungo termine dei geni eucarioti e l'assenza di residui metilati nella regione promotore di RET ha fatto pensare che si tratti di un gene la cui funzione possa occasionalmente essere richiesta (109).

Sono state identificate due varianti trascrizionali per RET che originano da splicing alternativo nella regione 3' terminale del gene (111, 112) e che codificano due isoforme proteiche (RET9 e RET51) che differiscono per il numero di residui aminoacidici presenti all'estremità C-terminale dopo l'aminoacido 1062 (rispettivamente, 9 e 51). Il codone di start traduzionale per entrambi i peptidi è localizzato nel primo esone del gene. Questi trascritti alternativi includono i primi 19 esoni di RET, ai quali segue una sequenza codificante distintiva, rappresentata dall'esone 20 per il trascritto RET51 e da una sequenza intronica, che codifica gli ultimi nove aminoacidi della proteina, per il trascritto RET9 (111, 112, 113). Queste isoforme sono altamente conservate tra le specie, il che implica anche che il loro significato funzionale viene conservato. È stato ipotizzato che ciascuna di esse possa svolgere una funzione diversa e che la loro espressione sia differenzialmente regolata nel tempo e nello spazio durante lo sviluppo (113). Di queste, RET9 sembra essere cruciale nello sviluppo del sistema nervoso enterico e del rene. L'isoforma RET51 può invece essere coinvolta in eventi di differenziazione (38). Sono stati descritti anche trascritti addizionali, come RET43, ma la loro validità biologica non è stata confermata.

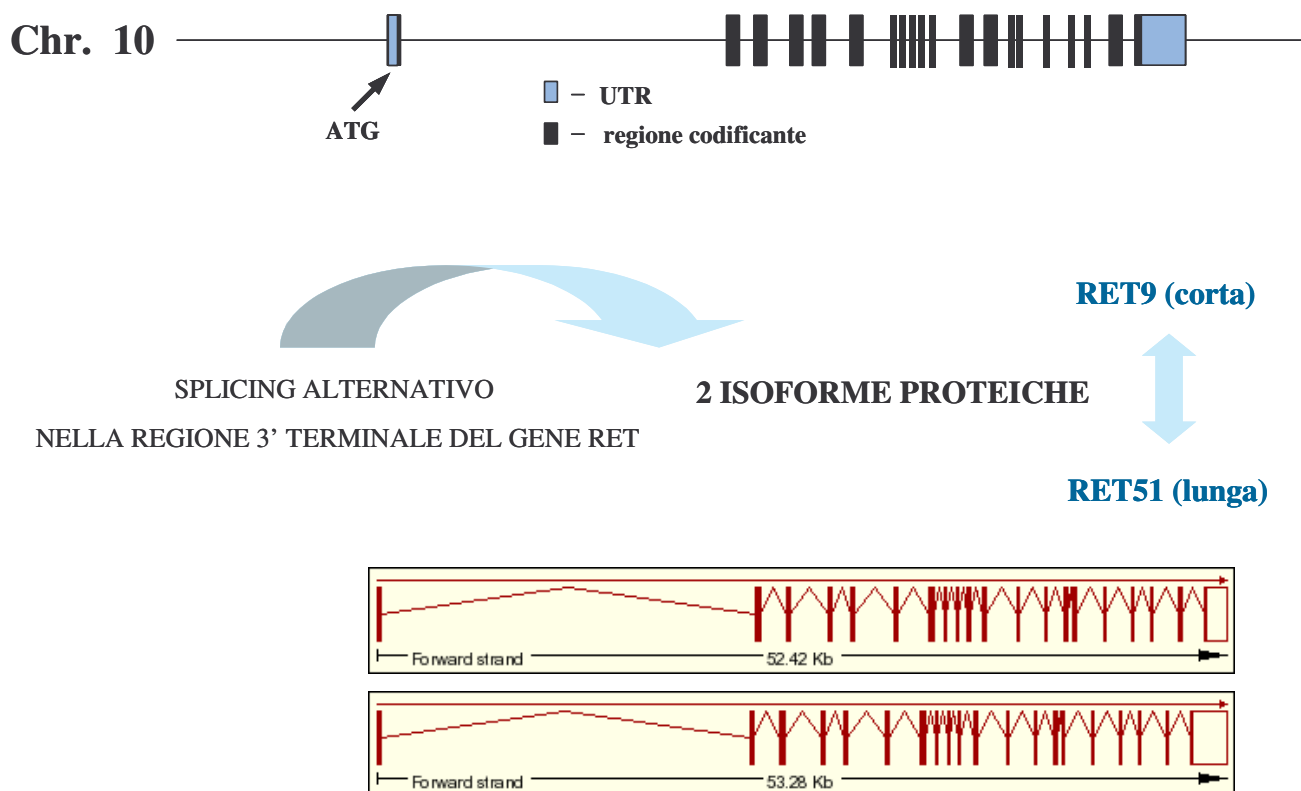


Figura 6. Rappresentazione schematica del gene umano RET e dei due principali trascritti che si generano per splicing alternativo. Gli esoni sono raffigurati da rettangoli, mentre gli introni da linee continue.

1.7 MUTAZIONI DEI GENI GDNF E/O RET E FENOTIPI MALATTIA

RET è espresso nelle linee cellulari che derivano dalla cresta neurale ed ha un ruolo cruciale nella regolazione della proliferazione cellulare, della migrazione, della differenziazione e della sopravvivenza durante l'embriogenesi. La scelta di quale di questi pathways segnale debba essere attivato sembra dipendere dall'esatta localizzazione cellulare di RET a livello di membrana (strato lipidico interno o esterno) (114). Funzendo da trasduttore del segnale per quattro diversi complessi ligando/co-recettore, RET svolge molte funzioni in differenti tessuti (107). Oltre che nell'organogenesi renale, questo recettore tirosina-chinasi è necessario nello sviluppo del sistema nervoso, nella spermatogenesi e nella regolazione della funzione tiroidea(38).

Mutazioni del gene RET danno origine ad un complesso spettro di sintomi clinici e fenotipi malattia che sembrano però relegati a determinati organi e tessuti, sebbene RET sia un gene ampiamente espresso a livello tissutale durante lo sviluppo e nella vita adulta (115). Il motivo per cui questo avviene non è ancora chiaro. Sono state ipotizzate diverse ragioni che potrebbero spiegare la variabilità fenotipica e che si basano sul coinvolgimento mutazionale di differenti domini di RET che sono adibiti a funzioni specifiche (114). La gran parte delle mutazioni localizzate nella sequenza genica che codifica per i domini caderina-simili della regione proteica extracellulare di RET è associata allo sviluppo della malattia di Hirschsprung (HSCR), disordine congenito caratterizzato da aganglionosi intestinale (116, 117, 118). Quest'ultimo fenotipo, assieme ad agenesia renale, si osserva in topi knockout omozigoti per RET o GDNF (55, 56, 57). Un danneggiamento del segnale GDNF/RET sembra coinvolto anche nella patogenesi della sindrome da ipoventilazione centrale congenita (CCHS), una rara malattia dovuta ad un anomalo controllo del respiro e a disfunzione del sistema nervoso autonomo (119). Nel 16% dei casi si osserva un'associazione di CCHS con HSCR. Una auto-attivazione di RET è associata a neoplasia endocrina multipla di tipo 2 (MEN2), rara sindrome caratterizzata da carcinoma midollare della tiroide (MTC) e che mostra una forte correlazione genotipo-fenotipo. A seconda della presenza e del tipo di sintomi addizionali, MEN2 viene distinta in tre sottogruppi (120). Alcune mutazioni nel dominio ricco di cisteine di RET che causano la formazione di ponti disolfuro anomali tra due molecole RET, stabilizzando la struttura del recettore e attivandolo anche in assenza di un ligando, sono riscontrate nei fenotipi MEN2A (MTC, feocromocitoma e iperparatiroidismo) e FMTC (MTC familiare), due dei sottogruppi di MEN2. Altre mutazioni sempre in quest'ultima regione di RET sono associate non solo a MEN2A e FMTC, ma anche al fenotipo HSCR (114). Dall'analisi di alcuni pedigrees è stato rinvenuto che MEN2A/FMTC e HSCR possono anche co-segregare in alcune famiglie. L'attivazione del dominio chinasi di RET è la funzione centrale del recettore. In questo dominio, alcune mutazioni caratterizzano HSCR, producendo recettori enzimaticamente inattivi (116), mentre altre si associano al fenotipo più severo MEN2B, il terzo sottogruppo di MEN2, e a FMTC. Infine, anche il carcinoma papillare della tiroide (PTC) è causato spesso da riarrangiamenti genici di RET (121).

Mutazioni di RET che producono recettori costitutivamente attivi danno quindi origine a sindromi cancerose, mentre mutazioni la cui conseguenza è un recettore RET non funzionale o sottoespresso sono responsabili dello sviluppo di HSCR.

Oltre a mutazioni disease-causing, anche combinazioni genotipiche di specifici aplotipi del gene RET sono state associate alla predisposizione a queste malattie (122). Alcune varianti polimorfiche di RET inoltre sono sovra- o sotto-rappresentate nei pazienti affetti da HSCR e possono rappresentare loci modificatori dell'espressione fenotipica (123, 124).

Due delle condizioni patologiche citate, CCHS e HSCR, possono essere ereditate come disordini monogenici o possono non mostrare una semplice eredità mendeliana, ma bensì multifattoriale (poligenica) con un gene principale coinvolto, penetranza incompleta ed espressività variabile, fungendo così da modelli, in particolar modo HSCR, per i disordini complessi (125). Nel 90% dei pazienti con CCHS si osserva una mutazione in eterozigosi del gene PHOX-2B (126). Vi è una maggiore prevalenza di mutazioni del gene RET (50% dei casi familiari) nei pazienti affetti da HSCR. MEN2 è invece un disordine monogenico legato ad un modello di eredità autosomico dominante. Approssimativamente il 98% dei pazienti con MEN2 presenta mutazioni di RET (127).

Il fenotipo di patologie umane causato da mutazioni RET può essere differenzialmente influenzato da GDNF (128). GDNF è espresso nel neuroectoderma anteriore durante i primi stadi della neurogenesi e in diversi organi che si sviluppano attraverso interazioni induttive epiteliali-mesenchimali (129). In questi organi, la sua espressione è confinata ai tessuti mesenchimali e non si rinviene negli epitelii. Mutazioni in questo gene possono essere associate a HSCR, ma finora sono state identificate in 4/6 pazienti con una mutazione del gene RET o con trisomia 21 (130, 131), il che farebbe pensare che non siano sufficienti a determinare il fenotipo clinico, e solo in sei pazienti senza mutazioni addizionali di altri geni, indicando che è possibile, ma abbastanza raro, che possano essere la causa della malattia (<5%) (132). Tutte le mutazioni che sono state descritte sono localizzate nella regione codificante del gene GDNF e sono rappresentate solo da quattro tipologie di varianti. Una di esse è stata rilevata anche in un paziente con CCHS, assieme ad un'espansione polialaninica nel gene PHOX-2B (133, 134) in un paziente con feocromocitoma sporadico (135) e in un caso familiare di neurofibromatosi di tipo 1 e megacolon congenito, in associazione ad una mutazione nel gene NF1 (136).

2. SCOPO

Lo scopo dello studio era capire se potesse esistere una base genetica del fenotipo MSK, identificando possibili geni causa di malattia o geni di suscettibilità alla malattia, che agirebbero in questo caso modificando l'espressione di geni chiave del processo nefrogenetico, e valutando quale fosse la modalità di trasmissione ereditaria di tale forma. Attraverso un approfondimento dei meccanismi patogenetici coinvolti, lo studio potrebbe avere una potenziale ricaduta su diagnosi, prevenzione e terapia della malattia. Obiettivo generale è stato quindi condurre un'analisi genetica, mutazionale e di espressione, su una casistica consistente e molto ben selezionata di un'anomalia, qual è il rene con midollare a spugna, che si suppone abbia origine da una disregolazione della nefrogenesi. Nello specifico, le ipotesi da verificare, e che hanno costituito gli obiettivi della ricerca, sono state:

- 1) valutare il coinvolgimento del gene GDNF nel determinismo della malattia;
- 2) valutare il coinvolgimento del gene RET nel determinismo della malattia.

Sono state perciò condotte analisi di mutazione, studi di associazione, analisi genetiche con raccolta dell'albero genealogico e studi di espressione su frammenti tissutali, valutando:

- a) se le sostituzioni nucleotidiche eventualmente osservate in questi geni potessero essere mutazioni disease-causing, quindi con significato funzionale a livello trascrizionale o traduzionale;
- b) se le sostituzioni nucleotidiche eventualmente osservate in questi geni non potessero essere invece varianti polimorfiche che caratterizzassero un particolare aplotipo con eventuale effetto sulla suscettibilità alla malattia;
- c) nell'ipotesi di una malattia dominante o di un gene maggiore di suscettibilità, se i casi sporadici non fossero invero casi familiari per la presenza in alcuni dei familiari di fenotipi intermedi di MSK;

d) nell'ipotesi di una malattia recessiva e con un allele negativo per mutazioni di uno di questi geni, se potesse esserci la concomitante presenza di una alterazione in un altro gene.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

La casistica dello studio ha compreso un gruppo di 50 pazienti non imparentati affetti da MSK diagnosticato sulla base di criteri urografici, di età compresa tra i 22 e i 63 anni e originari del Veneto, segnalati per ricorrente nefrolitiasi calcica e seguiti presso la Clinica Nefrologica dell'Ospedale di Padova e la Divisione Clinicizzata dell'Ospedale di Verona. I pazienti presentavano le papille di entrambi i reni con le tipiche alterazioni calcinosiche e cistiche. I criteri di selezione dei probandi con MSK si sono basati sulla descrizione radiologica riportata in letteratura (137). La diagnosi era posta quando tre o più collezioni lineari di materiale di contrasto venivano evidenziate all'interno della papilla e almeno tre papille erano coinvolte bilateralmente. In tutti i casi si trattava di MSK apparentemente sporadico e in tre pazienti era evidente anche una malformazione renale, nella fattispecie un rene piccolo, in associazione con iperparatiroidismo o con emipertrofia somatica.

3.2 POPOLAZIONI DI CONTROLLO

Sono stati utilizzati due tipi di popolazione di controllo per gli studi di frequenza e di associazione caso/controllo: l'una è costituita da campioni di sangue da cordone ombelicale ricavato da 125 neonati consecutivi nati presso l'azienda Ospedaliera di Padova, l'altra è costituita da 85 campioni di sangue prelevato da pazienti adulti con nefrolitiasi calcica idiopatica non affetti da MSK.

Si è fatto anche riferimento, per il confronto delle frequenze di alleli, genotipi e aplotipi del gene RET, a popolazioni di origine europea riportate in letteratura (italiana per la gran parte, spagnola e tedesca) che sono state analizzate per specifici polimorfismi a singolo nucleotide (138, 139, 140).

La raccolta dei campioni biologici dei pazienti e dei soggetti di controllo è avvenuta secondo quanto previsto dalle vigenti norme della Good Clinical Practice e previo ottenimento del consenso informato.

3.3 ANALISI DI MUTAZIONE

3.3.1 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO

Il DNA di ciascun paziente è stato estratto da leucociti del sangue periferico mediante il QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) seguendo il protocollo standard fornito dalla ditta. Il DNA, purificato da proteine, nucleasi e altri contaminanti o inibitori ed eluito in un buffer opportuno, è stato poi quantificato utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Celbio, Italia) ed usato direttamente nella reazione di amplificazione genica (PCR), condotta nel termociclatore iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), alla concentrazione di 25 ng e in un volume totale di 25 μ l. La miscela di reazione era costituita da: MgCl₂ (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 mM o 1.5 mM a seconda della coppia di primers utilizzata, primers forward e reverse (Primm, Milano, Italia) 0.4 μ M, dNTPs (Boehringer, Mannheim, Germania) 0.2 mM, JumpStart Taq DNA Polimerasi (Sigma) 0.04 U/ μ l, in un buffer (Sigma) 1X di KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3). Per aumentare specificità ed efficienza della reazione PCR è stata utilizzata la procedura 'hot start', che fa sì che la polimerasi divenga attiva solo ad una temperatura maggiore di 70°C. Questo è possibile grazie ad un anticorpo monoclonale che è legato all'enzima e che lo neutralizza, salvo dissociarsi dal complesso al raggiungimento della temperatura di denaturazione, primo step del profilo termico della reazione.

Il protocollo PCR seguito prevedeva:

1. Denaturazione iniziale.
 - a. Rapida escursione termica a 95 °C
 - b. 95 °C per 5 minuti

2. Annealing dei primers.
 - a. *n* volte il seguente ciclo:
 - 94 °C per 45 secondi
 - T °C variabile (in base al set di primers) per 45 secondi
 - 72 °C per 1 minuto

3. Estensione finale.
 - a. 72 °C per 7 minuti

4. Rapida escursione termica a 4 °C.

Per amplificare l'esone 1 del gene RET, che comprende la regione del promotore, è stato utilizzato il metodo touch-down. In questa tecnica, la temperatura di annealing viene progressivamente abbassata, di modo che i primi annealings dei primers avvengano solo con sequenze perfettamente complementari. In una fase successiva, l'abbassamento di temperatura permette di aumentare la resa.

Il profilo termico era il seguente:

1 ciclo	95°C	4 min
10 cicli con -1°C per ogni ciclo	95°C	30 sec
	66°C	30 sec
	72°C	50 sec
27 cicli	95°C	30 sec
	55°C	30 sec
	72°C	50 sec
1 ciclo	72°C	10 min

3.3.2 DISEGNO DEI PRIMERS

L'amplificazione è stata condotta mediante PCR degli esoni del gene e delle regioni di giunzione esone-introne. Con l'aiuto del software Beacon Designer 2.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) sono state selezionate delle coppie di primers opportune che blastassero nelle regioni introniche a monte e a valle di ogni esone del gene, così da poter comprendere nell'analisi di sequenza anche i siti di splicing. I primers sono stati scelti di almeno 18 pb, per assicurare una buona ibridazione, e con un contenuto G-C compreso tra il 30 e l'80 % e sono state attentamente esaminate, e se possibile evitate, strutture secondarie del template. Si è cercato inoltre di scegliere primers che non fossero complementari fra di loro per impedire un self-annealing. Questa precauzione è estremamente importante all'estremità 3', dove ogni complementarietà potrebbe produrre un dimero di primers.

Le sequenze dei primers che sono stati utilizzati nelle reazioni di PCR sono elencate nelle tabelle 1 e 2, assieme alle rispettive condizioni di amplificazione e alle dimensioni dell'amplicone.

Esone	Primers (5' → 3')	MgCl₂ (mM)	T di annealing (°C)	cicli (N°)	Amplicone (pb)
1	F: CAGCCCTCGCCCTGTTGG R: CACCCGCTCCCTGCTCCC	1	66	36	257
2	F: GAGAAGCCAAACAGAGCC R: TTCCCAAAGCACTGATTCCG	1.5	60	33	405
3	F: ACTTTAAGAGGTGGGAGGAG R: CAACCGGGCTTCTGGCTAGTC	1	58	36	219
4	F: GTGCATTCTGCGGTTCTCTCC R: GGGCTGGCTGCGGGTGGG	1	68	36	292
5.1	F: CGGCTGATAGTTTTGCTGTGGG R: CAGTTCCTCCTTGGTTTCATAGCC	1	60	30	390
5.2	F: GGGTTGTGTCTTAACTGCAATAC R: CGCCTCCTTGGTCCTCATCTT	1.5	60	30	399

Tabella 1. Informazioni relative alle sei coppie di primers utilizzate per l'amplificazione del gene GDNF. L'esone 5 è stato amplificato dividendolo in due parti a causa della dimensione relativamente grande di questo frammento di DNA. Per gli esoni 1 e 4 è stata utilizzata nella reazione di PCR una concentrazione doppia di primers (0.8 µM) rispetto alle condizioni generali di amplificazione descritte.

Esone	Primers (5' → 3')	T di annealing (°C)	Amplicone (pb)
1	F: CCGCACTGAGCTCCTACAC R: ACAGAAAGGCGCTTCTGAAC	55	536
2	F: CCATATTCTCACCATCCCTC R: AGTGTCAGCGGCTGTGATAA	58	264
3	F: GCCTGGCAGATGTGGCCGAT R: AAGACCAGCAGTAGCAGGCA	62	288
4	F: GCTGGTGATCACGCGGGGC R: GGACACTAAACCGACCGAG	62	242
5	F: ATCTCGCCTGCACTGACCA R: GCACCTCATTCTGGGGG	60	196
6	F: CATGAGGAAGCAGCCAGAGC R: CCCAGACAGGCAATAGGTA	62	200
7	F: TCTACCCTCAGGCCATTACAG R: GCTCCCAGACCCCAGCCCT	64	259
8	F: CTGGTGCTGTTCCCTGTCC R: GGTGCCATCGCCCCTGCA	62	126
9	F: TCTGCCTAGAGTGTGGGGT R: CTCCTACCTGTTCCCATGC	58	111
10	F: GGAGGCTGAGTGGGCTACG R: CTGGGAGGTGGTGGTGGTC	62	187
11	F: CCTCTGCGGTGCCAAGCCTC R: TCACAGGATGGCCTCTGTCT	64	416
12	F: GCCTTCTTCCTCCCCTGTCAT R: GCCCGGAGACTCCCCAG	65	148
13	F: CTCTCTGTCTGAACTTGGGC R: TCACCCTGCAGCTGGCCTTA	62	239
14	F: AAGACCCAAGCTGCCTGAC R: GGCTGGGTGCAGAGCCATA	60	326
15	F: GACTCGTGCTATTTTTCTC R: TATCTTTCCTAGGCTTCCCA	56	234
16	F: GTCTTTATTCCATCTTCTCT R: TCTGTAACCTCCACCCCAAG	60	157

Esone	Primers (5' → 3')	T di annealing (°C)	Amplicone (pb)
17	F: CACTGGTCCTTTCACTCTCT R: GGGAGGGAATGCACACAGAT	60	138
18	F: TGTGGTGGGCTGTCCTTCTG R: CTGGGGTGAGGCTGGAGTCT	64	100
19	F: AGTGACCGGCCATCTCTGT R: ATAGTGCAGAGGGGACAGC	58	148
20	F: AGTTTTGGTTCTTCAGTGC R: GACTTTCCATTCTCAGCAT	52	158

Tabella 2. Informazioni relative alle coppie di primers utilizzate per l'amplificazione del gene RET. Le condizioni di amplificazione prevedevano una concentrazione 1.5 mM di MgCl₂ e lo step 2 di annealing dei primers era ripetuto 35 volte.

3.3.3 PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL DNA AMPLIFICATO

La verifica dell'avvenuta amplificazione del DNA è stata eseguita mediante elettroforesi capillare nel Bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA). Questo sistema utilizza la tecnologia microfluidica per l'analisi di campioni biologici in un chip miniaturizzato in vetro che contiene una rete di canali interconnessi e pozzetti. Il riempimento dei canali con una matrice di gel e con un colorante fluorescente e dei pozzetti con il tampone o con il campione consente di effettuare una separazione elettroforetica in miniatura, in cui i campioni vengono rilevati mediante la loro fluorescenza e convertiti in immagini gel simili (bande) ed elettroferogrammi (picchi).

L'amplificato è stato poi purificato da primers, nucleotidi, polimerasi e sali utilizzando il MinElute[®] PCR Purification Kit (QIAGEN), il cui procedimento prevede una successione di tre passaggi: adsorbimento del DNA ad una membrana di silice, lavaggio ed eluizione in un buffer opportuno. Nel caso in cui fossero presenti prodotti di amplificazione aspecifici, veniva condotta una corsa elettroforetica in gel di agarosio alla concentrazione del 3%, in buffer TBE 1X (90 mM Tris-borato, 0.2 mM EDTA; pH 8) e ad un voltaggio di 100 V, per isolare il frammento di DNA specifico. Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il Φ X-174 digerito con l'enzima Hae III (frammenti da 72 a 1353 bp). Il prodotto ottenuto era visualizzato con bromuro di etidio ed esposizione a luce ultravioletta. Per purificare il DNA isolato dal gel è stato seguito il protocollo del MinElute[™] Gel Extraction Kit (QIAGEN), che utilizza la stessa procedura a tre step descritta sopra. Il pezzetto di gel veniva dissolto in un buffer opportuno e la miscela veniva poi applicata in una colonna da microcentrifuga fornita dal kit dotata di membrana di silice. L'elevata concentrazione salina del buffer favorisce il legame del DNA alla membrana. Il DNA veniva eluito in un buffer a bassa concentrazione di sale.

Il DNA purificato è stato poi quantificato nel Bioanalizzatore Agilent 2100 ed è stata utilizzata una concentrazione totale di 6 ng (scelta basandosi sulla lunghezza dell'amplificato) per l'allestimento della reazione per il sequenziamento diretto dei prodotti PCR. I primers utilizzati erano gli stessi della reazione PCR. Il protocollo che è stato seguito si basa sulla chimica del BigDye[®] Terminator v1.1 ed è stato fornito con il BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 μ l, che includeva 3 μ l di templat

DNA, 1 µl del primer forward 3.2 µM (concentrazione finale del primer nel volume di reazione pari a 3.2 pmoli) e 8 µl della Terminator Ready Reaction Mix (costituita da terminatori marcati, deossinucleosidi trifosfati, AmpliTaq DNA Polimerasi, FS, pirofosfatasi rTth, cloruro di magnesio, buffer), secondo il seguente profilo termico:

1. Denaturazione iniziale.
 - a. Rapida escursione termica a 96 °C
 - b. 96 °C per 1 minuto

2. 25 volte il seguente ciclo:
 - 96 °C per 10 secondi
 - 50 °C per 5 secondi
 - 60 °C per 4 minuti

3. Rapida escursione termica a 4 °C.

Poichè i terminatori marcati non incorporati devono essere rimossi prima dell'analisi della sequenza, si è proceduto con la purificazione della reazione mediante le CENTRI-SEPTM Spin Columns (Princeton Separations, Applied Biosystems, USA). Il protocollo prevede una prima fase di idratazione della colonna, una seconda fase di rimozione del fluido interstiziale ed una terza fase in cui il campione viene processato mediante gel filtrazione e purificato dai componenti a basso peso molecolare.

L'eluato è stato poi caricato nella piastra per il sequenziamento e analizzato nel 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Per verificare la presenza di eventuali sostituzioni nucleotidiche, la sequenza visualizzata con il programma Chromas 1.45 è stata confrontata con la sequenza genomica mediante il programma NCBI BLAST (bl2seq) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Le mutazioni identificate sono state confermate in due reazioni PCR indipendenti e sequenziando entrambi i filamenti di DNA e sono state siglate secondo la nomenclatura proposta dalla Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) (141).

3.3.4 ANALISI RFLP

Le sostituzioni nucleotidiche puntiformi che sono state rilevate dall'analisi della sequenza genica sono state analizzate mediante restrizione enzimatica dei prodotti PCR opportuni (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) nelle popolazioni di controllo prese in esame in questo studio e in qualche caso familiare.

Gli enzimi di restrizione sono delle endonucleasi, ricavate da batteri da cui prendono il nome, che legano il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche, originando tagli a doppio filamento all'interno o in prossimità della sequenza stessa. Le sequenze di DNA riconosciute sono spesso “palindromiche”, ossia possono essere lette in un senso e nell'altro, e solitamente di 4 o 6 basi. Gli enzimi di restrizione sono utili in quanto consentono di distinguere facilmente due sequenze di DNA che differiscono per uno o più nucleotidi, qualora tale differenza sia in grado di modificare il sito bersaglio riconosciuto dall'enzima.

Poiché varianti nucleotidiche possono alterare dei siti di restrizione, mediante il software a libero accesso on-line Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) sono stati cercati degli enzimi di restrizione i cui siti di taglio contenessero i nucleotidi sostituiti nella sequenza genica. Questo strumento informatico infatti mappa i siti di restrizione di una sequenza di DNA. Il numero di basi riconosciute è di importanza pratica perché determina la frequenza media di taglio. La scelta è quindi ricaduta, se possibile, su endonucleasi che tagliavano una o al massimo due volte (figura 7). Una volta individuate, è stato studiato il loro pattern specifico di restrizione così da sapere a priori le dimensioni dei frammenti di DNA che si sarebbero ottenuti.

Le frequenze delle varianti -45G>C e IVS3+18G>A identificate nel gene GDNF sono state esaminate utilizzando rispettivamente gli enzimi MnlI e AVAI (New England BioLabs, Ipswich, MA). La frequenza dello SNP rs2973033 del gene GDNF è stata valutata con l'endonucleasi di restrizione BlnI (Sigma). Sono state seguite le condizioni di utilizzo specificate dai fornitori: 37°C in soluzione tampone pH 7.5/7.9, fornita con l'enzima. Il DNA da analizzare è stato prima amplificato mediante PCR secondo quanto descritto nel paragrafo 3.3.1 e controllato nel Bioanalizzatore Agilent 2100. 5 µl della reazione sono stati poi aggiunti ad una miscela contenente 1U di enzima, buffer 1X (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT o 50 mM acetato di potassio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato di magnesio, 1 mM DTT o 50 mM Tris-HCl, 100 mM

NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditioeritritolo, a seconda dell'enzima utilizzato) e acqua q.b. per un volume finale totale di 15 µl. MnlI necessitava anche dell'aggiunta alla miscela di reazione di BSA, fornita con l'enzima, alla concentrazione di 1X. Dopo incubazione a caldo over-night nel termociclatore iCycler, la reazione veniva bloccata tramite raffreddamento in ghiaccio e sottoposta ad elettroforesi su gel di poliacrilamide al 7% (3% C; 5% glicerolo) in tampone TBE 1X (90 mM Tris-borato, 0.2 mM EDTA; pH 8) per un'ora ad un voltaggio costante di 120 V, per visualizzare il pattern di restrizione. Quest'ultimo processo si basa sul fatto che molecole dotate di carica possono migrare se sottoposte ad un campo elettrico. Il gel costituisce la matrice porosa di supporto della migrazione. Il gel di acrilamide viene definito in base alla percentuale totale di acrilamide presente e le dimensioni dei pori del gel sono determinati dalle concentrazioni di acrilamide e bisacrilamide impiegate. Gel a percentuale bassa (3-5%) possiedono pori di grosse dimensioni e sono utilizzati nei gel di impaccamento che permettono il caricamento e la concentrazione del campione. Il gel di separazione vero e proprio ha una percentuale compresa fra il 7 e il 20%, in cui le dimensioni ridotte dei pori producono un effetto di filtrazione che contribuisce a separare le macromolecole in base alla loro grandezza. Il supporto di poliacrilamide è preferito all'agarosio per il suo più elevato potere risolutivo.

Nel gel venivano anche caricati, ciascuno per pozzetto: 7 µl del marcatore di peso molecolare ΦX-174 digerito con l'enzima Hae III, 2 µl della reazione PCR non digerita addizionati di 2 µl di loading buffer (0.25% BB, 0.25% XC, 30% glicerolo in H₂O) e 3 µl di acqua, 10 µl della miscela di digestione enzimatica addizionati di 4 µl di loading buffer relativi ad un campione di controllo privo di sostituzioni nucleotidiche nella sequenza genica e 10 µl della miscela di digestione enzimatica addizionati di 4 µl di loading buffer relativi ad un campione che era risultato mutato all'analisi di sequenza. In questo modo era possibile confrontare il pattern di migrazione dei campioni da analizzare con quello di individui di nota combinazione allelica.

Gli enzimi sono stati scelti in modo tale che taglino una sequenza di DNA normale. Questo vuol dire che la variante allelica sarà individuata nel gel dalla presenza di un frammento di DNA di dimensioni equivalenti al DNA amplificato non sottoposto a digestione enzimatica. L'enzima infatti, non riconoscendo il sito di restrizione a causa del nucleotide mutato, non sarà in grado di tagliare. Un individuo eterozigote per una

variante genica sarà dunque identificato da due o più frammenti corrispondenti al DNA tagliato e un frammento corrispondente al DNA non digerito.

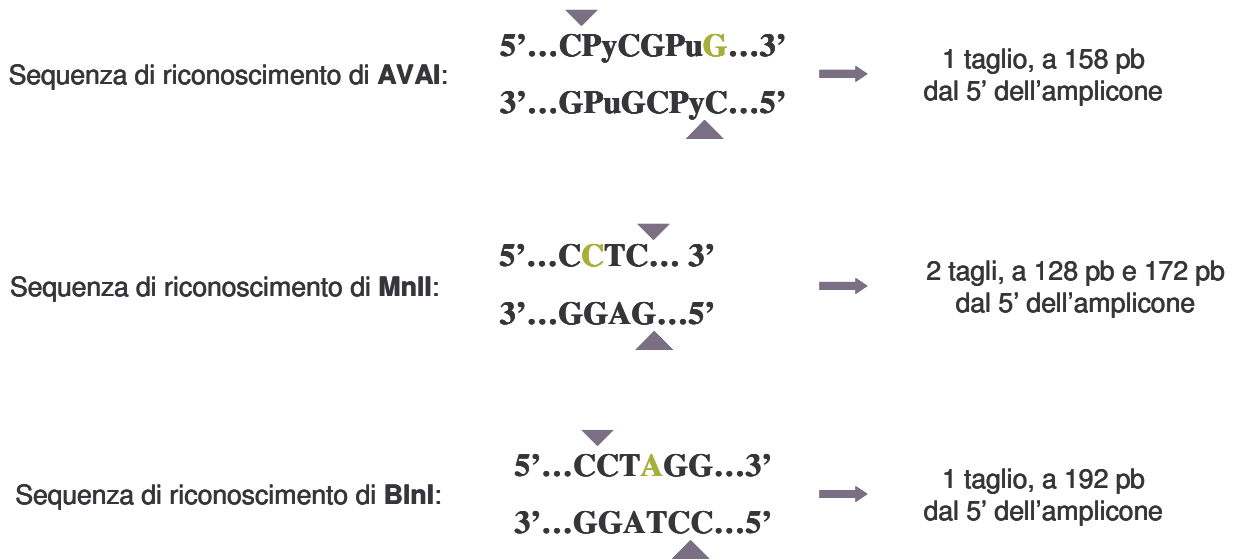


Figura 7. Informazioni relative agli enzimi di restrizione AVAI, MnlI e BlnI utilizzati nell'analisi RFLP. Sono riportati i siti di riconoscimento, la loro posizione nella sequenza dell'amplicone e il numero di tagli effettuato dall'enzima. È evidenziato in verde il nucleotide che corrisponde alla sequenza genica normale e di cui è stata rilevata una variante nell'analisi di sequenza. La sua sostituzione non permette all'enzima di riconoscere il sito di taglio.

3.3.5 VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI DIGESTIONE ENZIMATICA

La visualizzazione dei frammenti di DNA è stata eseguita mediante la tecnica di colorazione in argento (silver staining) secondo il protocollo descritto da Merrill et al. (142), che sfrutta la precipitazione degli ioni Ag^{++} precedentemente legati ai frammenti di DNA, a seguito della riduzione in ambiente alcalino. Dopo immersione per 5 minuti in una soluzione di etanolo al 10% e successivamente per 3 minuti in una soluzione di HNO_3 all'1%, il gel veniva lavato in acqua deionizzata e trasferito in una soluzione impregnante costituita da AgNO_3 12 mM per 20 minuti. Si effettuava poi un breve risciacquo in acqua deionizzata per rimuovere l'eccesso di argento dalla superficie e si immergeva il gel nella soluzione di sviluppo (Na_2CO_3 280 mM addizionato di

formaldeide 0.019%). All'apparire delle prime bande, il gel veniva trasferito in soluzione di sviluppo fresca fino al momento del fissaggio, effettuato mediante l'aggiunta di acido acetico al 10% per 2 minuti. Tutti i passaggi venivano eseguiti mantenendo il gel in agitazione. Dopo risciacquo in acqua deionizzata, il gel veniva posto in glicerolo al 10% per almeno 24 ore a 4°C e poi si lasciava essiccare.

3.3.6 DOPPIA DIGESTIONE ENZIMATICA

Per valutare se le varianti -45G>C e IVS3+18G>A identificate nel gene GDNF si trovassero o meno nello stesso allele, è stata condotta una duplice reazione di digestione enzimatica nello stesso campione. Dapprima il DNA amplificato è stato trattato con l'endonucleasi AVAI secondo quanto descritto nel paragrafo 3.3.4. In seguito, 4 µl del DNA digerito sono stati utilizzati in una seconda miscela di reazione, sempre di 15 µl totali, che conteneva l'enzima MnlI. La digestione (13 µl addizionati di 5 µl di loading buffer) è stata poi caricata in gel di poliacrilamide e visualizzata mediante colorazione in argento come indicato nei paragrafi 3.3.4 e 3.3.5. Previo studio dell'esatto pattern di restrizione (numero e dimensioni dei frammenti) che si sarebbe dovuto ottenere nel caso in cui le sostituzioni nucleotidiche fossero entrambe nello stesso allele e nel caso in cui invece fossero localizzate in alleli diversi, l'analisi del gel ha permesso di discriminare tra le due opzioni.

3.4 STUDIO DI ESPRESSIONE

3.4.1 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA TOTALE

L' RNA totale è stato estratto, mediante il metodo che utilizza OMNIzol (Euroclone, Celbio, Italia), da un prelievo biotico di tessuto renale corticale eseguito dopo nefrectomia per carcinoma renale in una paziente con MSK familiare e portatrice di una variante allelica in eterozigosi del gene GDNF (IVS3+18G>A).

Il materiale biotico raccolto, immediatamente posto in una provetta contenente il buffer di omogenizzazione (1 ml di OMNIzol per 100 mg di tessuto), è stato conservato per una

notte a -20°C e in seguito disgregato mediante ripetuto ed energico spipettamento. Dopo estrazione dell'RNA dall'omogenato con cloroformio (aggiunto in proporzione 1:10 secondo il protocollo fornito dalla ditta), la fase acquosa recuperata dopo centrifugazione è stata miscelata con una equivalente quantità di isopropanolo freddo per precipitare e purificare l'RNA. Il pellet di centrifugazione, lavato con etanolo al 75% e centrifugato nuovamente, è stato poi risospeso in acqua priva di RNAsi, fornita dal kit di estrazione, per evitare la degradazione dell'RNA. L'RNA che si ottiene comprende tutti i diversi tipi di RNA e non dovrebbe essere contaminato da proteine e DNA. Lo stesso procedimento è stato seguito anche per estrarre l'RNA da colture primarie di cellule papillari (passaggio 1) provenienti da un frammento chirurgico di polo renale indenne della stessa paziente (1 ml di OMNIzol per 2×10^7 cellule). Come campioni di controllo, sono stati utilizzati rispettivamente RNA totale commerciale proveniente da tessuto sano renale di un donatore femmina (MVP™ Total RNA, Human Kidney, Stratagene, USA) e RNA totale estratto da colture primarie di cellule renali (passaggio 1) provenienti da un frammento chirurgico di polo renale indenne di un paziente non affetto da MSK sottoposto a nefrectomia per carcinoma renale, oltre a RNA totale estratto da cellule HK-2 (linea cellulare umana epiteliale renale con caratteristiche tipiche delle cellule tubulari prossimali; ATCC, Rockville, USA). L'estrazione in tutti i casi è stata eseguita secondo il protocollo relativo a OMNIzol.

L'RNA è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000. La relazione tra assorbanza e concentrazione per RNA in forma di singola elica è la seguente: $1 \text{ OD}_{260} = [40 \mu\text{g/ml}]$. La purezza dell'RNA era assicurata da un rapporto spettrofotometrico $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$, dove A_{260} è l'assorbanza in nm relativa agli acidi nucleici, mentre l'assorbanza negli UV (A_{280}) è indice della contaminazione proteica.

La popolazione di RNA cellulari è molto eterogenea: l'RNA codificante rappresenta circa il 4% e comprende le molecole di RNA messaggero citoplasmatico e i precursori nucleari (hnRNA: heterogeneous nuclear RNA), mentre circa il 96% è costituito da RNA non codificante. Quest'ultimo è rappresentato per l'80% da RNA ribosomiali (28S, 18S, 5S) con i relativi precursori e per il resto da RNA transfer (tRNA) e altri piccoli RNA a localizzazione nucleare, nucleolare o citoplasmatica (rispettivamente snRNA, snoRNA, scRNA). Le preparazioni di RNA totale sono quindi composte prevalentemente di RNA ribosomiali. L'integrità è stata valutata visivamente osservando le due distinte bande

ribosomiali 28S e 18S e considerando il rapporto 28S/18S (che dovrebbe essere approssimativamente 2) nel Bioanalizzatore Agilent 2100.

120 ng di RNA totale estratto da tessuto e 200 ng di RNA totale estratto da cellule sono stati retrotrascritti in un volume finale di 20 μ l che conteneva $MgCl_2$ (Sigma) 5 mM, dNTPs (Boehringer) 1 mM, esameri random (Applied Biosystems) 2.5 μ M, inibitore delle RNAsi (Applied Biosystems) 1 U/ μ l e trascrittasi inversa MuLV (Applied Biosystems) 2.5 U/ μ l, in un buffer (Sigma) 1X di KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3). La trascrittasi inversa MuLV è una DNA polimerasi che utilizza RNA a singolo filamento come stampo in presenza di un primer per sintetizzare un filamento complementare di DNA (cDNA). Il protocollo RT prevedeva, previa incubazione della miscela di reazione a temperatura ambiente per 10 minuti per favorire l'estensione dei primers esameri da parte della trascrittasi inversa, un ciclo unico di tre step che è stato eseguito nel termociclatore iCycler:

1. Trascrizione inversa.
 - a. Rapida escursione termica a 42 °C
 - b. 42 °C per 30 minuti

2. Denaturazione.
 - a. 99 °C per 5 minuti

3. Raffreddamento.
 - a. Rapida escursione termica a 5 °C
 - b. 5 °C per 5 minuti
 - c. 4 °C all'infinito.

3.4.2 AMPLIFICAZIONE DEL cDNA E ANALISI QUANTITATIVA

È stata utilizzata un'aliquota di 2 μ l di reazione RT in 25 μ l di volume totale per amplificare un frammento comune ai trascritti del gene GDNF. La miscela di reazione era costituita da: $MgCl_2$ (Sigma) 1.5 mM, primers forward e reverse (Primm) 0.4 μ M,

dNTPs (Boehringer) 0.2 mM, JumpStart™ Taq DNA Polimerasi (Sigma) 0.04 U/μl, in un buffer (Sigma) 1X di KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3).

Il profilo di amplificazione del cDNA per l'analisi dell'espressione genica nel tessuto renale e nelle cellule consisteva in:

1. Denaturazione iniziale.
 - a. Rapida escursione termica a 95 °C
 - b. 95 °C per 5 minuti

2. Annealing dei primers.
 - a. 40 volte il seguente ciclo:
 - 94 °C per 45 secondi (melt step)
 - 68 °C per 45 secondi (anneal step)
 - 72 °C per 1 minuto (extend step)

3. Estensione finale.
 - a. 72 °C per 7 minuti

4. Rapida escursione termica a 4 °C.

Nessun metodo di purificazione può garantire che l'RNA sia completamente privo di DNA. Per prevenire che il DNA interferisca nella RT-PCR si dovrebbero scegliere primer forward e reverse posizionati a cavallo di o in esoni diversi del gene, così che il DNA genomico non possa essere amplificato per la presenza 'ingombrante' degli introni. Per analizzare l'espressione di GDNF, è stato disegnato un set di primers specifico per la regione comune ai trascritti del gene (tabella 3) che però non rispondeva a questo requisito. I primers infatti sono localizzati all'interno di uno stesso esone (esone 5). È stata allora eseguita prima della RT-PCR una digestione con DNasi I dell'RNA estratto, come da protocollo (DNasi I, Amp Grade, Invitrogen™, Italia). 1 μl di DNasi I buffer (Tris-HCl 200 mM - pH 8.4 -, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM), 1 μl di DNasi I, Amp Grade 1 U/μl e acqua trattata con 0.1% DEPC (dietil pirocarbonato) fino ad un volume finale di 10 μl sono stati aggiunti a 1 μg di RNA. DEPC è un forte inibitore delle RNasi che

vengono inattivate per modificazione covalente. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti, la DNasi I veniva inattivata aggiungendo alla miscela di reazione 1 μ l di EDTA 25 mM (pH 8.0) e scaldando per 10 minuti a 65 °C. La contaminazione da DNA è stata comunque verificata nel Bioanalizzatore Agilent 2100 dopo RT-PCR, eseguendo esperimenti di controllo in cui non si è aggiunta trascrittasi inversa prima della PCR.

È stato utilizzato un approccio RT-PCR semi-quantitativo comparativo per lo studio di espressione del gene GDNF, utilizzando come controllo interno la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH; Clontech, Palo Alto, CA, USA) che è un gene housekeeping, ossia non soggetto a modulazioni dell'espressione, a livello renale (143). Il profilo di amplificazione per il prodotto PCR della GAPDH era identico a quello utilizzato per il gene target, tranne per la temperatura di annealing (60 °C). Il numero di cicli è stato selezionato all'interno della fase esponenziale di amplificazione (tabella 3), così come era stato determinato per il gene target. Solo in questa fase infatti esiste un rapporto proporzionale tra il prodotto di amplificazione e la quantità di cDNA, e quindi di mRNA, di partenza, a differenza della fase di plateau della reazione PCR, raggiunta oltre un certo numero di cicli, che è indipendente dalla quantità iniziale di template.

Gli amplificati sono stati controllati e quantificati nel Bioanalizzatore Agilent 2100. In tutti i campioni lo standard interno GAPDH veniva sempre amplificato e a 30 cicli era visibile un chiaro segnale. La quantità di GDNF è stata espressa come valore relativo, calcolato come rapporto tra le concentrazioni (ng/ μ l) del gene target e del gene housekeeping.

Gene	Primers (5' → 3')	MgCl ₂ (mM)	T di annealing (°C)	Cicli (N°)	Amplicone (pb)
GDNF	F: GGCTATGAAACCAAGGAGGAACTG R: TGCCTGCCCTACTTTGCTCACTC	1.5	68	40	135
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	1.5	60	30	452

Tabella 3. Informazioni relative alla coppia di primers del gene GDNF e del gene housekeeping GAPDH utilizzata per l'amplificazione del cDNA.

3.5 ANALISI STATISTICA DEI DATI

Sono stati utilizzati il test esatto di Fisher e il test chi-quadrato con la correzione di Yates (software PRIMER 1.0) per confrontare la distribuzione delle diverse varianti di sequenza identificate nel gene GDNF e dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) del gene RET tra gli individui affetti e il gruppo rappresentativo di controllo, come pure per l'analisi degli aplotipi. Il livello di significatività considerato nella procedura statistica era del 5% ($p < 0.05$).

4. RISULTATI

4.1 ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE GDNF

Il sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione degli esoni e delle regioni di giunzione esone-introne del gene GDNF ha permesso di identificare nella casistica di pazienti affetti da MSK la presenza di quattro diversi tipi di sostituzioni nucleotidiche puntiformi.

Una variante di sequenza A>G è stata rilevata in eterozigosi e in omozigosi nella regione 5' UTR non tradotta dell'esone 1 del gene nei pazienti con MSK (figura 8). Tale sostituzione viene descritta in NCBI SNP Database e Ensembl come polimorfismo a singolo nucleotide e corrisponde al numero di riferimento refSNP ID: rs2973033. La frequenza degli alleli A e G dello SNP, come pure la frequenza dei genotipi A/A, A/G e G/G, è stata calcolata nei pazienti e confrontata con quella ottenuta da uno screening eseguito mediante RFLP di 250 cromosomi provenienti da campioni di sangue da cordone ombelicale della popolazione veneta. Nella tabella 4 sono riportati i valori delle frequenze alleliche e genotipiche per entrambe le popolazioni.

Informazione genomica			Informazione trascrizionale	
SNP ID	Chr 5 (posizione)	Sequenza	Tipo	
rs2973033	37875390(-)	GTTAATGTCCAACCT A GGGTCTGCGGAGACG	UTR	

Popolazioni	N° cromosomi	Frequenze Genotipiche (%)			Frequenze Alleliche
		A/A	A/G	G/G	
CONTROLLI (popolazione veneta)	250	58.4	36.8	4.8	 A: 0.77 G: 0.23
PAZIENTI	100	55.2	37.9	6.9	 A: 0.74 G: 0.26

Tabella 4. Informazioni relative allo SNP rs2973033 del gene GDNF.

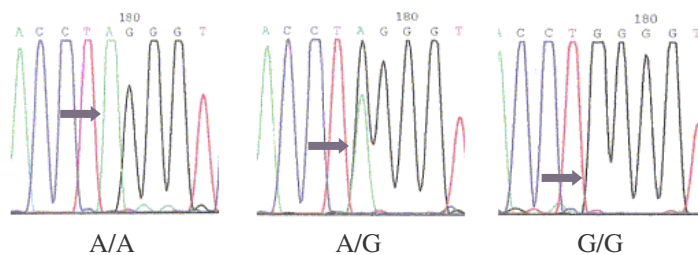


Figura 8. Identificazione delle varianti nucleotidiche dello SNP rs2973033 (indicate dalla freccia) mediante sequenziamento dell'esone 1 del gene GDNF.

L'analisi dei cromatogrammi dei pazienti affetti da MSK ha rilevato anche l'esistenza di due sostituzioni nucleotidiche puntiformi concomitanti in eterozigosi, mai precedentemente descritte, rispettivamente nella regione 5' UTR non tradotta dell'esone 3 (-45G>C) e nella regione intronica subito a valle (IVS3+18G>A) (figure 9 e 10). Questo allele complesso è stato riscontrato in ben quattro pazienti, mentre due pazienti presentavano la variante allelica costituita dalla sola sostituzione intronica IVS3+18G>A. In nessun paziente è stata trovata la variante allelica con la sola sostituzione esonica -45G>C.

Per verificare se si trattasse di polimorfismi o mutazioni causa di malattia, sono stati eseguiti degli studi di frequenza e di associazione. Dapprima è stata valutata mediante analisi RFLP la frequenza allelica di queste varianti nucleotidiche in 250 cromosomi provenienti da campioni di sangue da cordone ombelicale della popolazione veneta. Solo in due cromosomi è stato identificato l'allele complesso, così come la variante allelica con la sola sostituzione intronica, e anche in questo screening non è stato rilevato l'allele costituito dalla variante -45G>C da sola. Poi, per testare l'ipotesi che potesse trattarsi di mutazioni associate alla patologia del rene con midollare a spugna, è stato condotto uno studio caso-controllo nei pazienti affetti da MSK e in un gruppo di 85 individui con nefrolitiasi calcica recidivante, che però non presentavano MSK, della medesima derivazione geografica dei pazienti e paragonabili ad essi anche per età e sesso. La restrizione enzimatica non ha rilevato, in questo caso, nessuna variante nei 170 cromosomi della popolazione di controllo, mentre le frequenze dell'allele complesso e dell'allele IVS3+18A nei pazienti risultavano rispettivamente di 0.040 e 0.020. 8.0% e 4.0% erano i valori corrispondenti alle frequenze genotipiche dell'eterozigote con l'allele complesso e dell'eterozigote con la variante allelica IVS3+18A nei pazienti (tabella 5).

In tutte le popolazioni analizzate sussisteva l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

L'analisi statistica ha evidenziato una associazione statisticamente significativa tra l'allele complesso e il fenotipo MSK ($p = 0.035$).







Popolazioni	N° cromosomi	Frequenze Genotipiche (%)		Frequenze Alleliche	
		Allele complesso/wt	IVS3+18A/wt	Allele complesso	IVS3+18A
CONTROLLI (popolazione veneta)	250	1.6	1.6	 wt 0.008	 wt 0.008
PAZIENTI	100	8.0	4.0	 wt 0.040	 wt 0.020
CONTROLLI (nefrolitiasici)	170	0.0	0.0	 wt 0.000	 wt 0.000

Tabella 5. Frequenze relative all'allele complesso, costituito dalle due varianti di sequenza -45C e IVS3+18A della regione 5' UTR, e all'allele IVS3+18A del gene GDNF nei pazienti e nelle popolazioni utilizzate come controllo (popolazione veneta e nefrolitiasici).

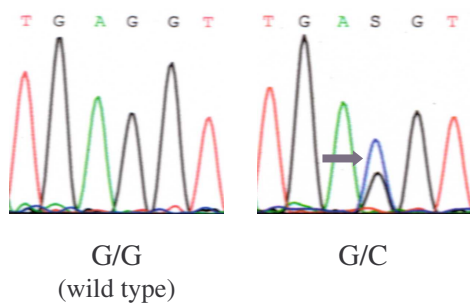


Figura 9. Identificazione della sostituzione nucleotidica -45G>C (indicata dalla freccia) mediante sequenziamento dell'esone 3 del gene GDNF.

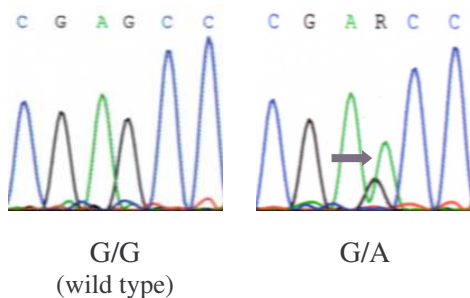


Figura 10. Identificazione della sostituzione nucleotidica IVS3+18G>A (indicata dalla freccia) mediante sequenziamento dell'introne 3 del gene GDNF.

Per indagare l'origine di queste varianti nucleotidiche, è stato eseguito uno screening mediante analisi RFLP nei genitori di tre pazienti che le presentavano. Nello specifico, si trattava di un caso di sola variante intronica e di due casi di allele complesso. L'analisi ha rivelato che le variazioni di sequenza dei probandi erano ereditate da un genitore (in due casi la madre, nell'altro il padre), che a sua volta le presentava in eterozigosi, e che quindi non si trattava di mutazioni *de novo* (figura 11). I genitori che avevano trasmesso l'allele mutato erano però ritenuti apparentemente sani.

Dal pattern di digestione enzimatica non si avevano, tuttavia, informazioni a riguardo del fatto che queste variazioni di sequenza si trovassero nello stesso allele. Nonostante la vicinanza di posizione lo facesse supporre, per affermare con certezza che esse non fossero localizzate in alleli diversi è stata condotta una doppia restrizione enzimatica utilizzando entrambi gli enzimi AVAI e MnlI nei campioni di DNA dei genitori (figura 12). Questo ha permesso di accertare che le due varianti si trovavano effettivamente nello stesso allele e che i genitori possedevano lo stesso allele complesso dei rispettivi figli.

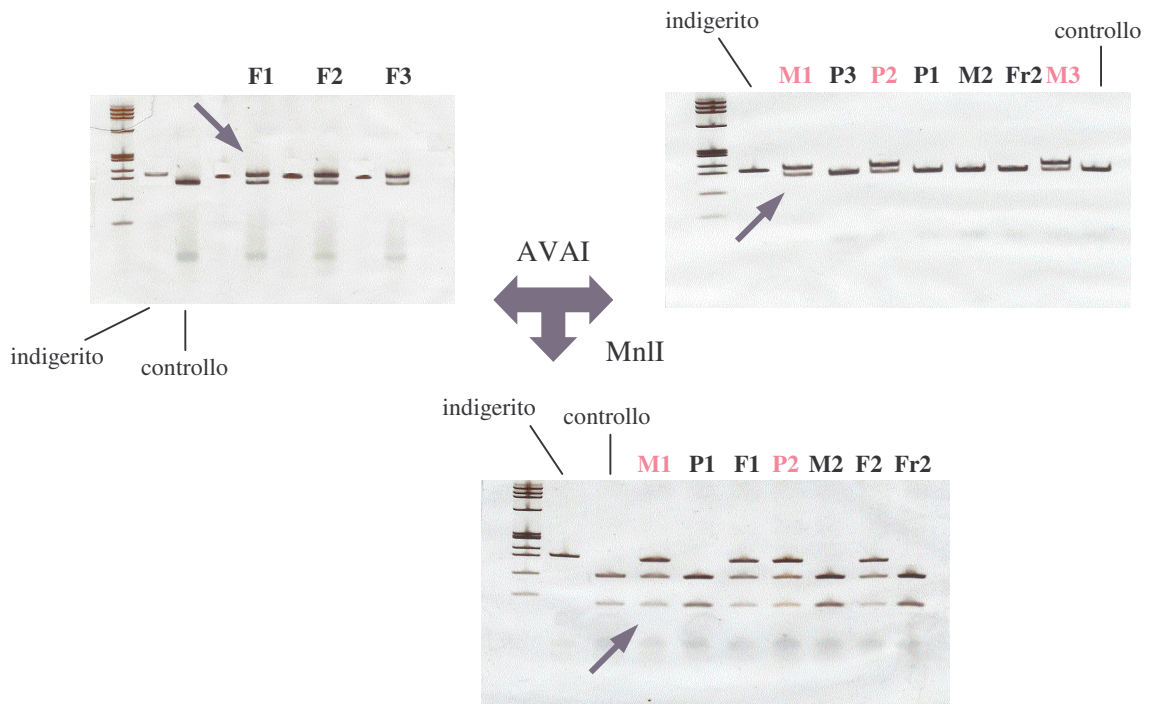


Figura 11. Screening per le varianti IVS3+18G>A e -45G>C mediante analisi di restrizione con gli enzimi AVAI e MnlI rispettivamente. Le regioni dell'esone 3 del gene GDNF e di confine esone-introne sono state amplificate nei pazienti F1, F2 (portatori dell'allele complesso) e F3 (portatore della sola variante intronica). I pazienti e uno dei loro genitori mostravano eterozigotità per le varianti. Nel campione di controllo tutto l'amplificato era tagliato dall'enzima, mentre in alcuni campioni da testare, l'amplificato in parte veniva tagliato, in parte no, confermando l'esistenza di una sostituzione nucleotidica in eterozigosi. L'allele normale era identificato nel gel dalla banda di DNA digerito, l'allele mutato era identificato dalla banda di DNA non digerito (il sito di restrizione non veniva riconosciuto dall'enzima a causa del nucleotide mutato).

M1, madre, P1, padre, del paziente F1; M2, madre, P2, padre, Fr2, fratello, del paziente F2; M3, madre, P3, padre, del paziente F3.

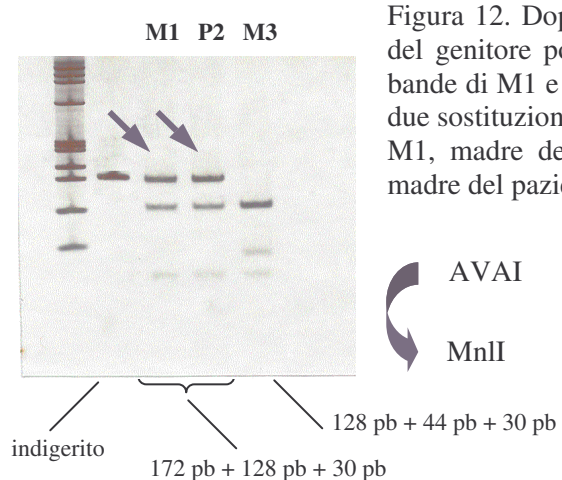


Figura 12. Doppia restrizione enzimatica AVAI/MnlI nel DNA del genitore portatore delle varianti di sequenza di GDNF. Le bande di M1 e P2 coincidono con quelle attese nel caso in cui le due sostituzioni fossero localizzate entrambe nello stesso allele. M1, madre del paziente F1; P2, padre del paziente F2; M3, madre del paziente F3.

È stata quindi indagata la storia familiare di due di questi pazienti e i membri familiari sono stati sottoposti ad un esame ecografico renale che ha portato alla luce casi di MSK non apparenti. Si è infatti scoperto che questi due casi patologici creduti sporadici in realtà erano familiari e che membri di diverse generazioni nei pedigrees, pur essendo affetti da MSK, non presentavano alcun sintomo della malattia. In un caso, si trattava della sorella del paziente, mentre nell'altro, della nonna materna, della madre e della sorella del paziente.

L'analisi mutazionale condotta mediante sequenziamento diretto in tutti i familiari ha rivelato che le varianti nucleotidiche, sia che si trattasse di allele complesso che di sola variante intronica, segregavano con la malattia nei pedigrees (figura 13).

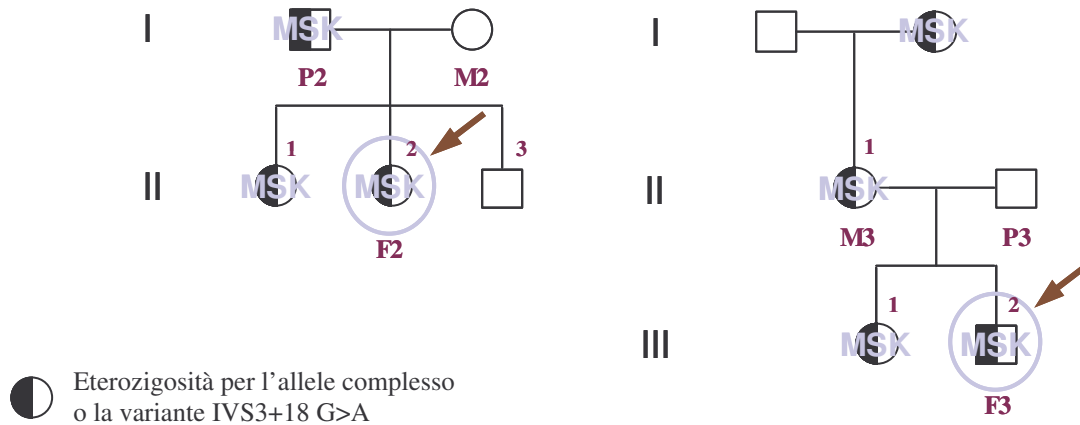


Figura 13. Pedigrees delle famiglie dei pazienti F2 (portatore dell'allele complesso) e F3 (portatore della sola variante intronica), indicati dalla freccia. Viene mostrato come esista una co-segregazione variante di sequenza del gene GDNF/malattia in più generazioni familiari e come gli individui affetti siano tutti eterozigoti per la mutazione.

Una variazione addizionale è stata rilevata dall'analisi della sequenza della regione codificante del gene GDNF nei pazienti MSK. In un paziente è stata osservata la presenza in eterozigosi di una transizione C-T nel codone 93 dell'esone 5 (figura 14). Questo cambiamento genera una mutazione missense che causa la sostituzione di un residuo di arginina con l'aminoacido triptofano (R93W). Questa variante è già stata descritta in pazienti con malattia di Hirschsprung, con sindrome da ipoventilazione centrale congenita e con feocromocitoma, e studi di letteratura per determinarne la

frequenza hanno documentato la sua assenza in 376 alleli di controllo. Anche in questo caso, è stata indagata la storia familiare del paziente ed è stato ricostruito l'albero genealogico. A differenza dei casi presentati in precedenza, in questa famiglia il fenotipo MSK, da solo o in associazione a malformazioni renali, ricorreva ma indipendentemente dalla mutazione R93W di GDNF. Si è scoperto così un altro caso familiare di MSK. Come si può vedere dal pedigree, solo la nonna, affetta da MSK, era portatrice della mutazione in eterozigosi. Né la figlia, che presentava MSK associato a una anomalia ureterale, né la nipote, affetta anch'ella da MSK, avevano ereditato la variante R93W (figura 15).

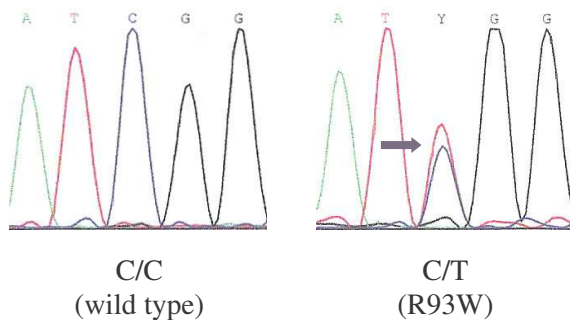


Figura 14. Identificazione della sostituzione nucleotidica c277 C>T (indicata dalla freccia) mediante sequenziamento dell'esone 5 del gene GDNF.

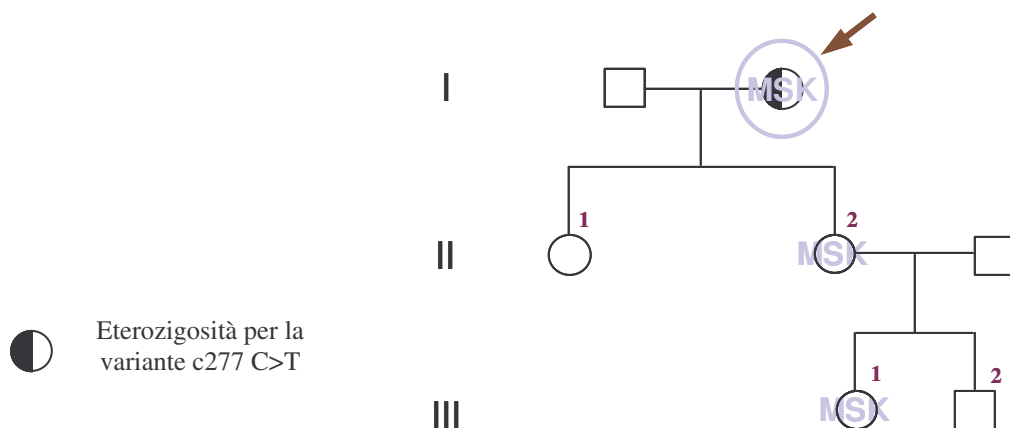


Figura 15. Pedigree della famiglia del paziente, indicato dalla freccia, portatore della mutazione R93W del gene GDNF. Viene mostrato come non esista una co-segregazione variante di sequenza del gene GDNF/malattia in più generazioni familiari e come l'individuo affetto sia eterozigote per la mutazione.

4.2 STUDIO DI ESPRESSIONE DEL GENE GDNF

È stata eseguita un'analisi di espressione di GDNF, esaminata a livello di RNA con RT-PCR semi-quantitativa utilizzando come controllo interno la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), che è un gene housekeeping a livello renale. L'RNA proveniva da un prelievo biotipico di tessuto renale eseguito dopo nefrectomia per carcinoma renale nella nonna del paziente F3, portatrice della sola variante di sequenza intronica IVS3+18G>A del gene, e da colture primarie di cellule papillari provenienti da un frammento chirurgico di polo renale indenne della stessa paziente. Come campioni di controllo, sono stati utilizzati rispettivamente RNA totale commerciale proveniente da tessuto sano renale di un donatore femmina e RNA totale estratto da colture primarie di cellule renali provenienti da un frammento chirurgico di polo renale indenne di un paziente non affetto da MSK sottoposto a nefrectomia per carcinoma renale, oltre a RNA totale estratto da cellule HK-2.

Il livello di espressione del gene GDNF, valutato in due distinte RT-PCR a partire dallo stesso RNA, è risultato più o meno equivalente nella paziente e nei campioni di controllo, senza nessuna apprezzabile differenza (valore medio relativo, calcolato come rapporto tra le concentrazioni del gene target e del gene housekeeping, rispettivamente di 0.18 e 0.22). Nella figura 16 sono mostrate le immagini dei risultati relativi alle colture cellulari.

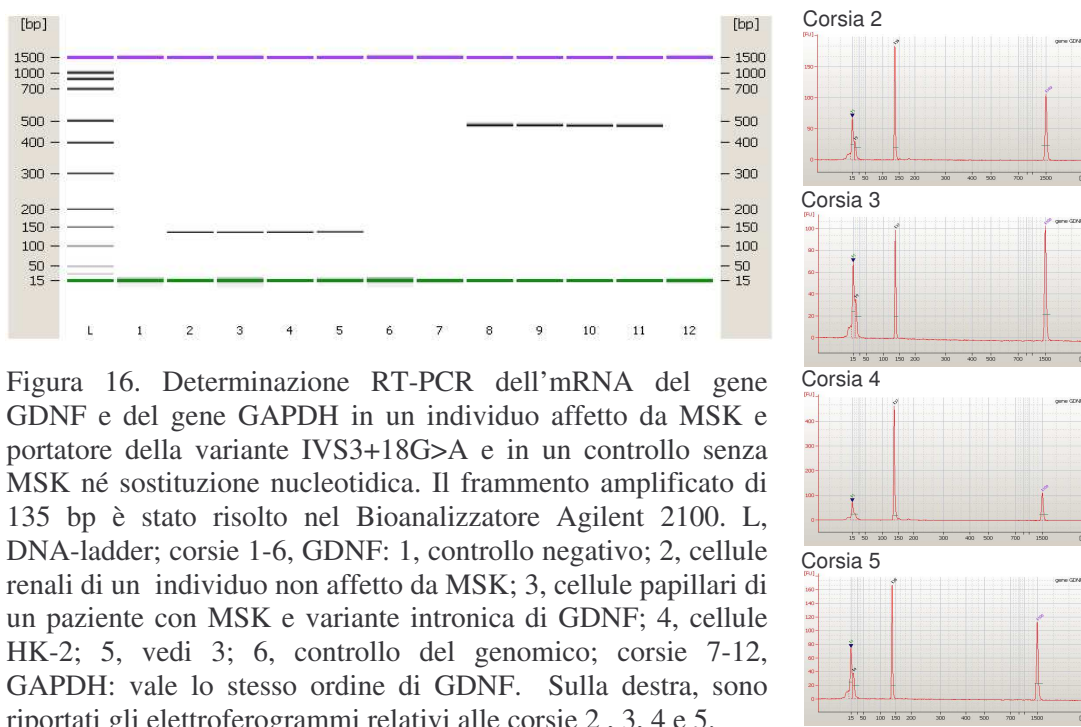


Figura 16. Determinazione RT-PCR dell'mRNA del gene GDNF e del gene GAPDH in un individuo affetto da MSK e portatore della variante IVS3+18G>A e in un controllo senza MSK né sostituzione nucleotidica. Il frammento amplificato di 135 bp è stato risolto nel Bioanalizzatore Agilent 2100. L, DNA-ladder; corsie 1-6, GDNF: 1, controllo negativo; 2, cellule renali di un individuo non affetto da MSK; 3, cellule papillari di un paziente con MSK e variante intronica di GDNF; 4, cellule HK-2; 5, vedi 3; 6, controllo del genomico; corsie 7-12, GAPDH: vale lo stesso ordine di GDNF. Sulla destra, sono riportati gli elettroferogrammi relativi alle corsie 2, 3, 4 e 5.

4.3 ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE RET

L'analisi del gene RET, condotta mediante sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione della regione codificante e del promotore, non ha evidenziato nessuna mutazione causativa nei pazienti affetti da MSK studiati. E' stata rilevata, invece, la presenza di diversi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nel gene, già descritti. Nella tabella 6 sono elencati gli SNPs sui quali è stata focalizzata l'attenzione, perché ritenuti i più significativi, e dei quali è stata studiata la frequenza allelica nei pazienti. Della regione del promotore, sono stati indagati due noti polimorfismi, funzionalmente rilevanti, localizzati a -5 pb e -1 pb dal sito di inizio della trascrizione del gene (SNPs -5G>A e -1C>A rispettivamente). Sono state utilizzate, come gruppi di controllo per il confronto delle frequenze di alleli, genotipi e aplotipi, popolazioni di origine europea riportate in letteratura (italiana per la gran parte, spagnola e tedesca) che sono state analizzate per questi SNPs (138, 139, 140). Non è sempre stato possibile effettuare l'analisi delle frequenze sulla totalità dei pazienti con MSK per i polimorfismi del gene RET considerati.

SNP	Codone	Sostituzione nucleotidica	Frequenza Allelica (%)		p-value
			Pazienti	Controlli	
PROMOTORE BASALE (-5)		G> <u>A</u>	26.9	24.0	-
PROMOTORE BASALE (-1)		C> <u>A</u>	46.1	40.0	-
ESONE 13	L769L	T><u>G</u>	40.0	21.0	0.006
ESONE 11	G691S	G> <u>A</u>	20.0	19.0	-
ESONE 15	S904S	C> <u>G</u>	20.4	23.4	-

Tabella 6. Informazioni relative a cinque SNPs del gene RET per entrambe le popolazioni, pazienti e popolazione utilizzata come controllo. Sono riportate le frequenze relative all'allele sottolineato nella terza colonna, il meno frequente nei controlli.

Solo l'allele G dello SNP c2307 T>G (L769L) localizzato nell'esone 13 ha mostrato una frequenza significativamente differente da quella della popolazione di controllo, ossia è risultato essere sovra-rappresentato nei pazienti con MSK ($p=0.006$).

4.3.1 SNP-5 DEL PROMOTORE DEL GENE RET

Sono state calcolate le frequenze dei genotipi relativi agli SNPs del promotore. Rispetto alla popolazione di controllo, le frequenze genotipiche sono risultate diverse nella popolazione affetta per uno dei due polimorfismi. In particolare, la variante $-5G>A$ era caratterizzata da una distribuzione genotipica quasi inversa ($p=0.009$), con una sovra-rappresentazione significativa del genotipo eterozigote G/A nei pazienti (53.8% contro 38.3% nei controlli). L'analisi ha inoltre rilevato che il genotipo omozigote A/A era rappresentato solo nei controlli, mentre i pazienti non lo presentavano (tabella 7).

GENOTIPO Promotore $-5G>A$	Frequenza (%)		p-value
	Pazienti	Controlli	
G/A	53.8	38.3	0.040
A/A	0.0	5.8	0.043
G/G	46.2	55.9	0.218

Tabella 7. Frequenze genotipiche della variante polimorfica $-5G>A$ del gene RET nei pazienti e negli individui di controllo.

4.3.2 SNP-5 E SNP-1 DEL PROMOTORE DEL GENE RET

Sono stati ricostruiti gli aplotipi relativi agli SNPs del promotore. In dieci pazienti studiati è stata trovata una eterozigosità composta delle varianti $-5G>A$ e $-1C>A$ del promotore, che non permetteva la ricostruzione degli aplotipi a partire dai genotipi.

Poiché non era possibile fare un'analisi familiare, per ricostruire tali aplotipi è stata eseguita un'analisi in SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Il pattern di migrazione delle diverse combinazioni aplotipiche relative ai due SNPs è stato confrontato in un gel di poliacrilamide al 12% addizionato di glicerolo all'8%, fatto correre per circa tre ore ad una potenza costante di 20 W e colorato con il metodo di sviluppo all'argento (immagine non mostrata). I controlli, in questo caso, erano rappresentati da individui di nota combinazione allelica ai due SNPs.

In un paziente è stato trovato l'aplotipo -5/-1 AA che non è mai stato rilevato invece nella popolazione di controllo. L'aplotipo -5/-1 AC mostrava una frequenza pressoché uguale in entrambi i gruppi di confronto, mentre l'aplotipo -5/-1 GA era presente nel 44.9% dei pazienti, a differenza dei controlli in cui la frequenza era di 38.0%, e risultava quindi il più rappresentato (tabella 8).

APLOTIPO Promotore -5G>A, -1C>A	Frequenza (%)	
	Pazienti	Controlli
AA	1.3	0.0
GA	44.9	38.0
GC	28.2	36.0
AC	25.6	26.0

Tabella 8. Frequenze degli aplotipi relativi agli SNPs -5/-1 del promotore del gene RET nei pazienti e negli individui di controllo. Nessuna differenza significativa nelle frequenze aplotipiche della popolazione affetta è stata evidenziata dal confronto con il gruppo di controllo.

Sono state prese in considerazione anche le combinazioni genotipiche degli aplotipi relativi ai due SNPs del promotore, ma non è stato possibile confrontarne le frequenze con quelle di una popolazione di individui sani. Si è potuto comunque osservare nella distribuzione genotipica dei pazienti che il genotipo -5,-1/-5,-1 GA/AC era il più ricorrente, presentando una frequenza di 28.2%, e che il genotipo -5,-1/-5,-1 AC/AC era assente.

4.3.3 SNPs DEGLI ESONI 11 E 15 DEL GENE RET

Le frequenze dei polimorfismi c2071 G>A (G691S) dell'esone 11 e c2712 C>G (S904S) dell'esone 15 erano risultate simili nei pazienti e nel gruppo di controllo. Un'analisi di co-segregazione di polimorfismi ha già dimostrato che queste due varianti di RET co-segregano assieme come aplotipo (co-segregazione del 100%) (139, 144, 145). Si è quindi voluta analizzare anche la frequenza allelica e genotipica dell'aplotipo AG (G691S/S904S). Non si è osservata una differenza significativa tra pazienti e controlli nella frequenza allelica dei polimorfismi G691S/S904S (tabella 9). Tuttavia, in tre pazienti è stata rilevata la presenza del genotipo omozigote AG/AG, mai identificato nella popolazione di controllo ($p=0.024$). Nonostante sia predetto che i due polimorfismi siano in linkage disequilibrium tra loro, nei pazienti sono state osservate anche le combinazioni aplotipiche AC e GG. In più, l'analisi dei genotipi ha evidenziato la presenza dell'inusuale aplotipo GG in omozigosi in due pazienti e dell'inusuale aplotipo AC, in eterozigosi solo con l'aplotipo più frequente GC, in quattro pazienti (tabella 10).

APLOTIPO c2071 G>A, c2712 C>G	Frequenza (%)	
	Pazienti	Controlli
GC	75.1	83.7
AG (G691S/S904S)	15.9	16.3
AC	4.5	0.0
GG	4.5	0.0

Tabella 9. Frequenze degli aplotipi relativi agli SNPs c2071 G>A (esone 11) e c2712 C>G (esone 15) del gene RET nei pazienti e negli individui di controllo. L'aplotipo AG corrisponde alla variante allelica denominata G691S/S904S.

Popolazioni	Frequenze Genotipiche(%)				
	APLOTIPO G691S/S904S		ALTRI APLOTIPI		
	GC/AG	AG/AG	GC/GC	GC/AC	GG/GG
CONTROLLI	32.5	0.0	67.5	0.0	0.0
PAZIENTI	22.7	6.8	56.9	9.1	4.5
<i>p</i> -value	0.164	0.024	0.162	0.006	0.095

Tabella 10. Percentuali degli eterozigoti e degli omozigoti per la variante allelica G691S/S904S nei pazienti e nei controlli. Sono riportate anche le frequenze delle altre combinazioni genotipiche trovate nelle due popolazioni.

4.3.4 SNP-5 E SNP-1 DEL PROMOTORE E SNP DELL'ESONE 13 DEL GENE RET

Per vedere se sussisteva una correlazione tra una o più specifiche combinazioni alleliche e lo sviluppo di MSK, sono stati ricostruiti nei pazienti gli aplotipi relativi ai due SNPs - 5 e -1 del promotore e al polimorfismo c2307 T>G (L769L) localizzato nell'esone 13 ed è stata confrontata la loro distribuzione nei pazienti e nei controlli (tabella 11). Sei combinazioni aplotipiche erano comuni ad entrambe le popolazioni, ma alcune mostravano frequenze differenti nei due gruppi. La differenza tra le due distribuzioni è risultata inoltre significativa ($p=0.002$). L'aplotipo osservato più spesso in entrambi i casi era GAT, ma i due aplotipi GAG e GCG sono risultati sovra-rappresentati nei pazienti in modo significativo (p -value rispettivamente di 0.008 e 0.019). L'aplotipo GCT al contrario mostrava una sottorappresentazione statisticamente significativa nella popolazione affetta ($p=0.038$). Questa combinazione differiva dalle due precedenti per la presenza al terzo locus dell'allele G dello SNP c2307 T>G. L'aplotipo AAT non è stato invece trovato nella popolazione di controllo.

APLOTIPO -5G>A, -1C>A, c2307 T>G	Frequenza (%)		<i>p</i> -value
	Pazienti	Controlli	
GAG	11.5	1.3	0.008
GAT	30.8	38.7	0.306
ACT	11.5	14.1	-
ACG	7.7	9.9	-
GCG	23.1	9.8	0.019
AAT	1.9	0.0	0.512
GCT	13.5	26.2	0.038

Tabella 11. Frequenze degli aplotipi relativi a tre SNPs del gene RET (-5 e -1 del promotore e c2307 T>G dell'esone 13) nei pazienti e nei controlli.

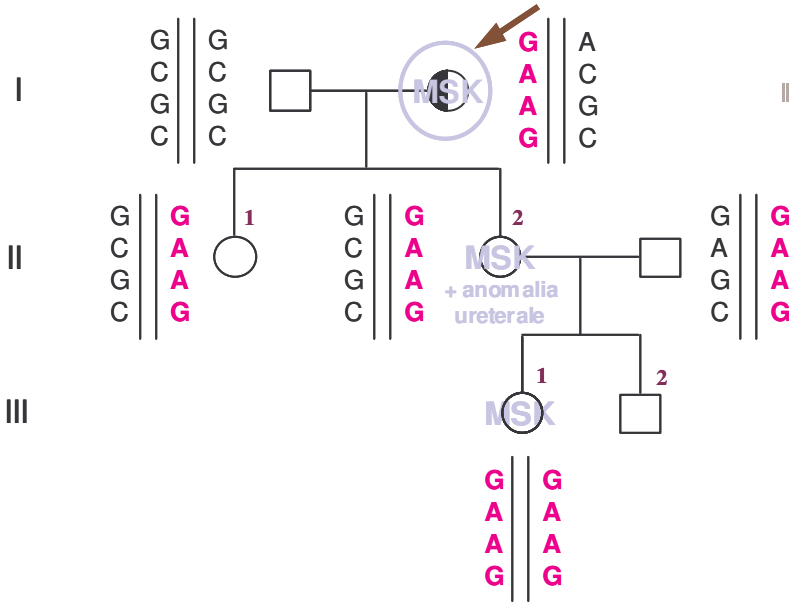
4.3.5 SNP-5 E SNP-1 DEL PROMOTORE E SNPs DEGLI ESONI 11 E 15 DEL GENE RET

È stata anche condotta un'analisi mutazionale della regione codificante e del promotore del gene RET in tutti i membri familiari dei pedigrees, precedentemente discussi, dei tre pazienti portatori di varianti di sequenza del gene GDNF. In particolare, sono stati indagati gli SNPs -5 e -1 del promotore, lo SNP c2071 G>A (G691S) dell'esone 11 e lo SNP c2712 C>G (S904S) dell'esone 15 e sono stati ricostruiti gli aplotipi relativi a questi quattro polimorfismi (figura 17).

Nel terzo caso familiare trattato, dove non si aveva una co-segregazione mutazione di GDNF/malattia, è stato osservato in un individuo affetto da MSK l'aplotipo GAAG in omozigosi. Questa combinazione genotipica presentava al terzo e quarto locus le varianti polimorfiche A e G corrispondenti all'aplotipo G691S/S904S. Risalendo nel pedigree, gli altri membri affetti portavano l'aplotipo GAAG in eterozigosi, compreso quindi il paziente con la mutazione R93W. L'aplotipo è stato individuato anche in uno degli altri due casi familiari studiati e segregava con la malattia e con la mutazione del gene GDNF. Nell'altra famiglia, invece, la combinazione allelica è stata trovata, ma non sembrava legarsi in nessun modo alla patologia di MSK. Quest'ultimo caso, però, differiva dagli altri per la presenza di una duplice variazione di sequenza di GDNF (allele complesso) negli individui affetti.

Eterozigotità per una variante del gene GDNF

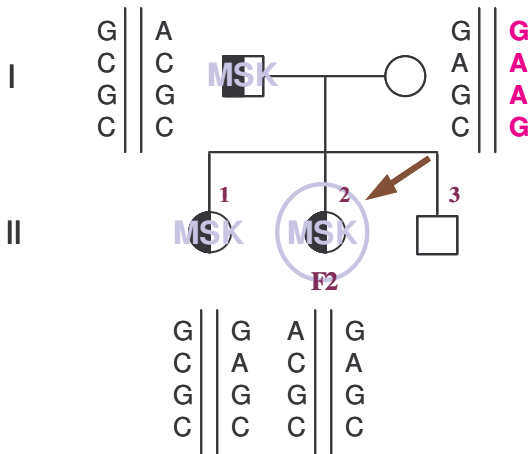
CASO 3
gene GDNF: R93W



APLOTIPO RET

Promotore (-5 G>A)
Promotore (-1 C>A)
Ex 11 (c2071 GGT→AGT)
Ex 15 (c2712 TCC→TCG)

CASO 1
gene GDNF: [-45G>C; IVS3+18G>A]



CASO 2
gene GDNF: IVS3+18G>A

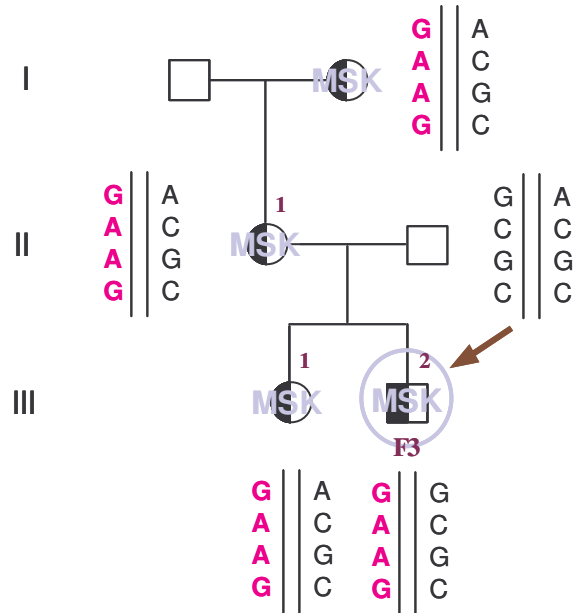


Figura 17. Ricostruzione dell'aplotipo relativo a quattro SNPs del gene RET (-5 e -1 del promotore, c2071 G>A dell'esone 11 e c2712 C>G dell'esone 15) nei pedigrees dei tre casi familiari di MSK studiati.

5. DISCUSSIONE

Questo studio ha voluto indagare le basi genetiche della patologia del rene con midollare a spugna (MSK), condizione malformativa rara, ma decisamente frequente nei pazienti con ricorrente nefrolitiasi calcica, e generalmente sporadica, benché siano stati riportati alcuni casi familiari in letteratura con trasmissione ereditaria verosimilmente dominante. A tal fine è stata raccolta una grossa casistica di pazienti affetti da MSK ed è stata condotta un'analisi mutazionale dei geni che sono stati identificati come buoni candidati per l'eziologia della malattia sulla base dell'ipotesi che MSK sia una patologia disembrionica e delle informazioni fornite da modelli animali knock-out. L'attenzione è stata focalizzata sul legame GDNF/RET, cruciale nell'embriogenesi renale e indispensabile non solo per lo sviluppo corretto degli ureteri e dei dotti collettori, ma anche per la nefrogenesi. È noto dalla letteratura che mutazioni dei geni GDNF e RET possono causare o modulare diversi fenotipi patologici. RET, infatti, è l'esempio paradigmatico di come diverse mutazioni di un singolo gene possono portare a diverse malattie: mutazioni 'gain of function' portano a sindromi cancerose, mutazioni 'loss of function' causano aganglionosi intestinale (146). È stato inoltre pubblicato il caso di una paziente con carcinoma midollare della tiroide (MTC) che aveva un concomitante iperparatiroidismo (il che consentiva di formulare la diagnosi di MEN 2A) assieme a MSK, e nella quale era presente una mutazione del gene RET. Gli autori avanzarono l'ipotesi che l'associazione MSK/mutazione RET fosse patogenetica (24), ma mutazioni del gene si osservano nell'80% dei casi di MTC. Non è escluso quindi che possa esistere un meccanismo patogenetico comune alle due malattie. Il fatto di aver trovato un paziente con iperparatiroidismo nella casistica MSK studiata supporta il ruolo del gene RET.

Difetti nel gene GDNF possono invece essere causa della malattia di Hirschsprung e della sindrome da ipoventilazione centrale congenita, ma spesso non sono sufficienti da soli. Ad oggi, sono state descritte in letteratura solo quattro tipologie di varianti nucleotidiche in questo gene, tutte nella regione codificante.

Lo studio condotto in questi anni di dottorato ha messo in evidenza un possibile ruolo patogenetico del gene GDNF nella patologia di MSK. Variazioni di sequenza di GDNF sono state infatti trovate in eterozigosi in sette pazienti della casistica analizzata, sei dei

quali risultavano portatori di varianti nella regione non tradotta 5'UTR, mentre un paziente mostrava un'alterazione di sequenza nella regione codificante.

5.1 VARIANTI DI SEQUENZA NEL GENE GDNF: POLIMORFICHE O CAUSA DI MALATTIA?

Le varianti -45G>C e IVS3+18G>A sono entrambe localizzate nella regione 5' UTR non codificante del gene GDNF e non sono mai state descritte finora. I pazienti le presentavano o sottoforma di allele complesso, ossia c'era una concomitanza delle due sostituzioni nucleotidiche (4 pazienti), o come allele portatore della sola variante intronica IVS3+18G>A (2 pazienti). Entrambe le varianti alleliche sono state rilevate nella popolazione veneta con una frequenza inferiore a 1% e non sono state trovate in un gruppo di calcolotici calcici recidivanti che non presentavano MSK. Lo studio ha inoltre evidenziato una associazione statisticamente significativa tra l'allele complesso e il fenotipo MSK ($p=0.035$), previa verifica che nelle popolazioni analizzate sussistesse l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Uno screening nei genitori di tre di questi pazienti ha rivelato che le mutazioni venivano ereditate da un genitore (indifferentemente madre o padre), che le presentava in eterozigosi. È stato quindi raccolto l'albero genealogico di due di questi tre probandi con MSK (in un caso la famiglia non ha voluto collaborare allo studio) ed è stata eseguita un'esplorazione anamnestica per individuare eventuali casi familiari presentanti fenotipi intermedi di MSK. Particolare attenzione è stata posta ai genitori dei probandi poiché l'ipotesi della dominanza, a tutt'oggi formulata, soprattutto nel caso in cui delle alterazioni nucleotidiche dei geni candidati fossero trovate, impone la valutazione diagnostica di MSK. Membri di più generazioni familiari sono stati trovati affetti da MSK, sebbene non mostrassero sintomi clinici evidenti. Questa rilevazione fa ipotizzare che esista una possibile sottovalutazione di casi familiari di rene con midollare a spugna, la cui prevalenza potrebbe quindi essere superiore a quella reale attualmente documentata, così come potrebbe essere maggiore di quella stimata la prevalenza della condizione MSK nella popolazione generale.

Nelle famiglie di questi pazienti con alterazione del gene GDNF, l'analisi della segregazione dell'aplotipo di GDNF nei familiari affetti e non affetti ha mostrato

l'esistenza di una co-segregazione della variante di sequenza con il fenotipo MSK, il che fa supporre una eziologia genetica di MSK.

I criteri per determinare la patogenicità di mutazioni non note sono principalmente tre: 1) valutare la frequenza della variante in popolazioni di controllo; 2) osservare una co-segregazione della variante con il fenotipo malattia in casi familiari; 3) valutare la capacità o meno della variante di alterare la trascrizione o la traduzione genica. I punti 1) e 2) sono soddisfatti dai risultati ottenuti, ossia una frequenza delle varianti alleliche del gene GDNF inferiore a 1% nella popolazione generale di appartenenza dei pazienti (per definizione, la frequenza di un polimorfismo è $\geq 1\%$) e nulla in una popolazione di controllo mirata, e una loro eredità familiare solo nei membri affetti da MSK del pedigree.

Per rispondere al punto 3) sono stati utilizzati tre softwares bioinformatici, Automated Splice Site Analyses (<https://splice.cmh.edu/>), ESEfinder (<http://exon.cshl.edu/ESE/>) e RESCUE-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) che provvedono a predire l'effetto delle mutazioni sullo splicing dell'mRNA e a fornire quindi informazioni sul segmento di RNA maturo da analizzare e sui primers specifici da utilizzare. Il secondo e il terzo programma fanno particolare riferimento alla ricerca di brevi sequenze oligonucleotidiche specifiche (ESEs) che aumentano lo splicing del pre-mRNA quando sono presenti negli esoni e giocano un ruolo importante nello splicing costitutivo e alternativo. Le ESEs sono frequenti nelle regioni esoniche vicine ai siti di splicing, soprattutto in quelle distanti 80-120 basi dal sito accettore di splicing. Una variazione che distrugge una ESE, ad esempio, potrebbe causare 'exon skipping' che provocherebbe l'esclusione di un intero esone dal trascritto mRNA. Cambiamenti di sequenza che alterano dei segnali di processamento genico possono dunque avere un drammatico impatto sulla funzione genica ed essere causa di malattie genetiche.

Tutti e tre i softwares hanno predetto che la variante esonica -45G>C crea un nuovo sito criptico di splicing, con un aumento di sei volte nella percentuale di legame dei fattori di splicing. Questo cambiamento provoca una profonda modificazione del trascritto. Il non trovare mai la variante allelica -45G>C del gene GDNF da sola potrebbe dunque far pensare che essa rappresenti una mutazione critica deleteria che sortisce un effetto fenotipico non letale in associazione alla variazione di sequenza IVS3+18G>A oppure che a quest'ultima sia legato un effetto fondatore, comunque di rilevanza, a cui si è

aggiunta una seconda variante funzionale che viaggia in linkage disequilibrium e agisce piuttosto rafforzando l'effetto patogenetico della sostituzione IVS3+18G>A.

Questo approccio computazionale andrebbe affiancato da una convalidazione sperimentale così da togliere ogni dubbio sulla patogenicità delle alterazioni di sequenza trovate. Fino ad oggi si è potuta indagare solo l'espressione del gene, cumulativa dei diversi trascritti di GDNF, in una paziente affetta da MSK portatrice della sola variante intronica IVS3+18G>A, per vedere se la presenza di quest'ultima generasse un eventuale mRNA quantitativamente differente da un controllo sano. L'RNA totale è stato estratto da un prelievo biotico di tessuto renale, eseguito dopo nefrectomia per carcinoma renale nella paziente, e da colture primarie di cellule papillari provenienti da un frammento chirurgico di polo renale indenne della stessa paziente. Come campioni di controllo, sono stati utilizzati rispettivamente RNA totale commerciale proveniente da tessuto sano renale di un donatore femmina e RNA totale estratto da colture primarie di cellule renali provenienti da un frammento chirurgico di polo renale indenne di un paziente non affetto da MSK sottoposto a nefrectomia per carcinoma renale, oltre a RNA totale estratto da cellule HK-2.

L'espressione genica di GDNF nel tessuto e nelle cellule renali ha dato risultati simili. Il fatto che il livello di espressione del gene GDNF sembra essere più o meno equivalente nella paziente con MSK e nei campioni di controllo, senza nessuna apprezzabile differenza (rispettivamente 0.18 e 0.22) è a sfavore di un possibile effetto genico regolativo quantitativo dovuto alla variante intronica. È comunque necessaria un'analisi più approfondita dell'effetto della sostituzione nucleotidica, che vede l'utilizzo di altri approcci metodologici (ad esempio minigeni ibridi in esperimenti di transfezione transiente) per confermare la veridicità di questa affermazione. Inoltre, una differenza quantitativa potrebbe esistere a livello di singolo trascritto e non di mRNA complessivo del gene. Non è escluso, poi, che possa esserci un effetto regolativo qualitativo che genera prodotti di splicing alterati, vista la posizione critica della mutazione (18 pb dal sito donatore di splicing), e quindi dovrebbero essere costruite coppie di primers opportune per verificare eventuali splicing alternativi. Rimane anche aperto il discorso che riguarda la sostituzione esonica -45G>C del gene, che è effettivamente la variante che i softwares bioinformatici predicono influenzare lo splicing e il cui reale effetto non è

stato indagato perché non erano disponibili campioni tissutali opportuni da cui estrarre l'RNA da analizzare.

I risultati fin qui ottenuti sembrano comunque rispondere ai requisiti richiesti per la definizione di una mutazione causa di malattia e porterebbero a supporre una potenziale patogenicità delle alterazioni di sequenza trovate. Purtroppo questo studio ha potuto prendere in considerazione e studiare, a causa di una scarsa collaborazione dei pazienti, solo due nuclei familiari di MSK relativamente piccoli. Estendendo l'analisi alle altre famiglie che hanno membri portatori di varianti del gene GDNF, si potrebbe ottenere un'informazione ancora più completa ed esauriente sulla correlazione di queste ultime con la malattia.

A conferma dell'importanza di variazioni di sequenza nel gene GDNF, in un paziente è stata identificata anche una transizione C-T in eterozigosi nel codone 93 localizzato nell'esone 5 che porta ad un cambiamento aminoacidico (da arginina a triptofano). Questa mutazione missense (R93W) potrebbe essere considerata potenzialmente patogena poiché causa una sostituzione aminoacidica non conservativa in un residuo conservato nell'evoluzione, è stata individuata in pazienti con malattia di Hirschsprung, con sindrome da ipoventilazione centrale congenita e con feocromocitoma (130, 133, 135) e non è stata trovata in 376 alleli di controllo (130, 131). Si tratta, inoltre, di una variante a bassa penetranza (131, 135) sempre associata a mutazioni di altri geni, per lo più del gene RET.

La mutazione è stata trovata in un caso familiare di MSK dove, tuttavia, non tutti i membri affetti la presentavano. Il pedigree, infatti, rivelava che solo la nonna affetta da MSK portava la mutazione in eterozigosi e che essa non veniva trasmessa alla figlia, che presentava anche un'anomalia ureterale oltre a MSK, e di conseguenza neppure alla nipote affetta. Si è ipotizzato che in questa famiglia GDNF potesse agire in sinergia con il gene RET per determinare il fenotipo malattia. Anche in un caso familiare di malattia di Hirschsprung, due membri familiari affetti non mostravano la mutazione R93W, sebbene altri due familiari affetti portavano la mutazione associata a mutazioni del gene RET (131). Basandosi anche su quanto documentato, si è indagato dal punto di vista molecolare il gene RET, in modo particolare in questa famiglia.

Il polimorfismo rs2973033 del gene GDNF, invece, rilevato in eterozigosi e in omozigosi nella regione 5' UTR non tradotta dell'esone 1 nei pazienti con MSK non sembra essere

correlato alla patologia di MSK. Ne sono conferma il riscontro di una frequenza allelica pressoché simile nella popolazione di controllo e nei pazienti (rispettivamente 23.2% contro 25.9%) e il riscontro di un caso familiare in cui un paziente affetto da MSK non ereditava l'allele polimorfo dal padre, che a sua volta lo presentava in eterozigosi. Si tratta dunque di un polimorfismo molto frequente nella popolazione generale. Oltretutto, lo SNP si trova in un frammento di DNA poco conservato nell'evoluzione e un cambiamento di nucleotide potrebbe avere poca influenza in questa zona.

5.2 SPECIFICI ALOTIPI DI VARIANTI POLIMORFICHE NEL GENE RET: ALLELI DI SUSCETTIBILITÀ ALLA MALATTIA?

L'analisi mutazionale della regione codificante del gene RET nei pazienti affetti da MSK ha rilevato diversi polimorfismi a singolo nucleotide già descritti (SNPs), ma nessuna mutazione causativa. È risaputo che alleli polimorfi possono essere fortemente associati ad una patologia e che specifici alotipi possono avere effetti protettivi o predisponenti oppure modulare la gravità di un fenotipo clinico. Si è allora focalizzata l'attenzione su tre SNPs che potrebbero essere funzionalmente rilevanti, prendendo come riferimento la documentazione riportata da alcuni autori in letteratura: la variante polimorfica c2307 T>G (L769L) localizzata nell'esone 13, che sembra influenzare la suscettibilità a diverse patologie, il polimorfismo c2071 G>A (G691S) dell'esone 11, che causa una sostituzione aminoacidica e che non è escluso possa avere un ruolo funzionale basato su effetti quantitativi, e il polimorfismo c2712 C>G (S904S) dell'esone 15, che non porta ad un cambiamento aminoacidico, ma presenta una co-segregazione del 100% con lo SNP dell'esone 11.

L'analisi delle frequenze alleliche di questi SNPs nei pazienti ne ha evidenziato solo uno con una frequenza significativamente differente da quella della popolazione di controllo. Nello specifico, l'allele G del polimorfismo localizzato nell'esone 13 è risultato essere sovra-rappresentato nei pazienti MSK con un *p*-value di 0.006. Tale variante polimorfica potrebbe dunque rappresentare un allele di suscettibilità o un locus modificatore dell'espressività fenotipica per la patologia di MSK. Un risultato analogo è stato riportato per la forma sporadica della malattia di Hirschsprung (147), come pure per il carcinoma

papillare sporadico della tiroide (148) e gli autori indicavano il polimorfismo L769L dell'esone 13 come possibile causa di aumentata suscettibilità a queste patologie.

Sono stati analizzati anche due noti polimorfismi nella regione promotore di RET, localizzati a -5 pb e -1 pb dal sito di inizio della trascrizione del gene (SNPs -5G>A e -1C>A), che potrebbero influenzare l'attività del promotore stesso e avere un effetto funzionale, predisponendo così allo sviluppo della malattia. Le frequenze alleliche di entrambi gli SNPs osservate nei pazienti non differivano significativamente da quelle dei controlli. Una valutazione delle frequenze genotipiche del promotore ha però rivelato che il genotipo omozigote A/A relativo allo SNP localizzato a -5 pb dal sito di inizio della trascrizione del gene (SNP-5), rappresentato nei controlli, era assente nei pazienti affetti da MSK e che il genotipo eterozigote G/A era sovra-rappresentato in modo significativo nei pazienti rispetto alla popolazione di controllo con un *p*-value di 0.040. La distribuzione di questo genotipo quasi inversa negli affetti rispetto al gruppo di controllo (rispettivamente, 53.8% contro 38.3% per G/A; 46.2% contro 55.9% per G/G; 0.0% contro 5.8% per A/A) potrebbe confermare l'importanza della combinazione relativa a questa posizione nella patologia di MSK. Un'analisi degli aplotipi relativi al promotore ha poi identificato l'aplotipo -5,-1 AA, mai rilevato nei controlli, in un paziente affetto. Anche questa variante allelica potrebbe essere rilevante ai fini della patogenesi di MSK. Studi di espressione in vitro hanno infatti dimostrato come l'aplotipo -5,-1 AA, non trovato in 400 cromosomi di controllo, sia associato ad un'attività del promotore del gene significativamente molto bassa (140). Livelli di espressione più bassi di questo allele potrebbero dunque avere un effetto deleterio e disturbare così la nefrogenesi.

L'aplotipo -5,-1 GA è risultato invece essere il più rappresentato nei pazienti affetti da MSK (44.9 % contro 38.0 % nella popolazione di controllo), sebbene il *p*-value non fosse significativo. Questi risultati messi assieme portano a considerare le combinazioni genotipiche del promotore -5,-1/-5,-1 GA/AC e GA/AA come possibili genotipi predisponenti alla patologia di MSK. A conferma di quanto ipotizzato, si è osservato che il genotipo -5,-1/-5,-1 GA/AC era il più frequentemente trovato nei pazienti affetti e, in più, che sei individui sulla totalità degli affetti risultati portatori di varianti di sequenza del gene GDNF lo presentavano e nessun membro sano dei casi familiari lo mostrava. Il genotipo -5,-1/-5,-1 GA/AA, invece, non è mai stato rilevato in individui sani, mentre è stato trovato una volta nei pazienti con MSK non portatori di varianti del gene GDNF.

Un dato certo, comunque, è che l'aplotipo -5,-1 AC in omozigosi non è mai stato individuato nei pazienti affetti e potrebbe essere protettivo nei confronti della malattia.

Per vedere se sussisteva una correlazione tra una o più specifiche combinazioni alleliche del gene RET e lo sviluppo di MSK, sono stati ricostruiti gli aplotipi relativi ai due SNPs -5 e -1 del promotore e allo SNP dell'esone 13 che avevano mostrato un'associazione con la malattia nelle singole analisi. Il confronto della loro distribuzione nei pazienti e nei controlli ha messo in evidenza un'inversione significativa di alcune frequenze nei due gruppi. Tre aplotipi su sei risultavano infatti sovra- o sotto-rappresentati nella popolazione affetta e un aplotipo (AAT) era assente nei controlli. La sovra-rappresentazione dell'allele G (SNP c2307 T>G dell'esone 13), precedentemente rilevata, potrebbe essere legata agli aplotipi GAG e GCG (SNPs -5G>A, -1C>A, c2307 T>G) che sono risultati i più significativamente rappresentati nei pazienti (rispettivamente, 11.5 % contro 1.3 % nei controlli, $p=0.008$; 23.1 % contro 9.8 % nei controlli, $p=0.019$). L'aplotipo GCT, che al contrario mostrava una sottorappresentazione statisticamente significativa nella popolazione affetta ($p=0.038$), differiva dalle due combinazioni precedenti per la presenza al terzo locus dell'allele T dello SNP c2307 T>G.

L'analisi della regione codificante del gene RET ha rilevato anche due polimorfismi già descritti, c2071 G>A (G691S) nell'esone 11 e c2712 C>G (S904S) nell'esone 15, che sono ritenuti co-segregare assieme come aplotipo. È stato suggerito che essi siano in linkage disequilibrium (139). L'analisi degli aplotipi ha però evidenziato in questo studio la presenza degli inusuali aplotipi AC e GG, mai rilevati nei controlli. In più, la combinazione GG è stata osservata nei pazienti anche in omozigosi. L'attenzione è stata invero focalizzata sull'aplotipo AG (G691S/S904S) che, nonostante mostrasse una frequenza simile nei pazienti e nei controlli, è stato trovato in omozigosi in tre affetti. Si è pensato di ritenere importante questa osservazione. La sostituzione aminoacidica conservativa da glicina a serina G691S si trova vicino al dominio extracellulare ricco di cisteine di RET e, sebbene non sia considerata una mutazione causativa, potrebbe altresì avere un ruolo funzionale basato su effetti quantitativi ed essere quindi rilevante. Il polimorfismo S904S è invece una variante silente ma potrebbe avere comunque un effetto sull'espressione di RET, creando un nuovo sito di splicing alternativo (accettore, donatore o enhancer). È noto infatti che varianti polimorfiche possono essere in grado di

produrre quantità diverse di mRNA o di alterare lo splicing (149). È probabile quindi che l'aplotipo AG (G691S/S904S) non abbia influenza da solo ma in duplice dose allelica e che questa combinazione possa essere associata in qualche modo al fenotipo MSK, o come causa patogenetica o come modulatore dell'espressività del disordine. Questa combinazione genotipica è stata osservata anche in uno dei casi familiari trattati (caso 3). L'aplotipo G691S/S904S segregava nel pedigree ma solo un individuo affetto lo presentava in entrambi gli alleli. Poiché dalla prima generazione familiare non veniva trasmessa la variante R93W del gene GDNF, si potrebbe ritenere che quest'ultima non sia una mutazione causativa e che piuttosto una certa rilevanza possa essere attribuita a specifici genotipi di varianti alleliche del gene RET.

5.3 VARIANTI ALLELICHE NEI GENI GDNF E RET: SINERGIA CHE PUÒ CAUSARE IL FENOTIPO MALATTIA?

La ricostruzione degli aplotipi relativi ai polimorfismi della regione promotore (SNPs -5G>A e -1C>A), dell'esone 11 (c2071 G>A) e dell'esone 15 (c2712 C>G) di RET nei tre pedigrees studiati ha permesso di osservare, soprattutto in un caso (caso 2), la co-segregazione dell'aplotipo GAAG con il fenotipo MSK e con la variante di sequenza del gene GDNF. L'associazione tra questa variante allelica e una mutazione di GDNF è stata riscontrata anche nel caso familiare 3, come pure la sua segregazione con la malattia. In più, il membro familiare affetto che presentava in omozigosi le varianti polimorfiche A e G corrispondenti all'aplotipo G691S/S904S, era anche omozigote per l'aplotipo GAAG. In disaccordo con quanto constatato, nel caso familiare 1 la combinazione GAAG non segregava con la variante allelica del gene GDNF e con la patologia di MSK, ma bensì era portata solo da un individuo sano. Bisogna comunque tener presente che in quest'ultimo caso negli affetti erano state individuate ben due varianti del gene GDNF (allele complesso). Anche due membri familiari sani del caso 3 in realtà mostravano l'aplotipo GAAG in eterozigosi e in combinazione genotipica anche uguale a un paziente affetto. Purtroppo, sono stati trattati casi ognuno sui generis, perché a ciascuno era associata una variante allelica diversa del gene GDNF, e quindi si può solo fare un'ipotesi. La combinazione aplotipica GAAG potrebbe avere importanza ai fini della patogenesi di MSK solo se presente in concomitanza a un'alterazione genica di GDNF o

in omozigosità. Essa potrebbe dunque fungere da modificatore genetico e considerarsi come un evento compensatorio a una seconda mutazione di GDNF.

Gli alleli T e G relativi allo SNP c2307 dell'esone 13 erano egualmente frequenti nei membri familiari affetti dei pedigrees e non mostravano una particolare segregazione, per cui il polimorfismo non è stato preso in considerazione nella ricostruzione aplo-tipica del gene RET che è stata mostrata in questo studio.

Si possono dunque trarre alcune conclusioni dalla discussione complessiva dei risultati:

1) le varianti di sequenza rilevate nella regione 5' UTR non tradotta dell'esone 3 (-45G>C) e nella regione intronica subito a valle (IVS3+18G>A) del gene GDNF sembrano responsabili di MSK in un sottogruppo di pazienti affetti da questa patologia; 2) la mutazione R93W, invece, non è sufficiente a causare il fenotipo MSK, ma potrebbe essere coinvolta in un modello di eredità digenica della patologia o modulare l'espressività del disordine; 3) non sono state trovate mutazioni causa di malattia del gene RET nei pazienti con MSK, ma esiste un polimorfismo a carico dell'esone 13 che risulta essere significativamente sovra-rappresentato e che potrebbe avere un significato se associato a specifici aplotipi di RET; e 4) alcune combinazioni aplotipiche e genotipiche del gene RET potrebbero essere coinvolte nella patogenesi di MSK, definendosi come predisponenti alla malattia o come modificatori genetici. Nello specifico, l'aplotipo AA relativo agli SNPs -5 e -1 del promotore potrebbe agire da solo influenzando l'espressione genica, il genotipo GA/AC relativo agli SNPs -5 e -1 del promotore potrebbe agire in sinergia a varianti del gene GDNF e l'aplotipo AG relativo allo SNP dell'esone 11 e allo SNP dell'esone 15 potrebbe agire in modalità dose-dipendente. In più, l'aplotipo GAAG costituito dagli SNPs del promotore, dell'esone 11 e dell'esone 15 potrebbe essere rilevante in associazione a una variazione di sequenza di GDNF.

Un'azione sinergica dei geni GDNF e RET, con un ruolo maggiore attribuito a GDNF, sembrerebbe quindi costituire il meccanismo molecolare che sta alla base della patologia di MSK.

6. CONCLUSIONI

Le malformazioni del rene e delle vie urinarie rappresentano circa il 30% di tutte le anomalie di sviluppo embrionale. Si tratta di malformazioni fenotipicamente diverse la cui rilevanza clinica varia da forme meno severe con lievi alterazioni funzionali renali, talvolta con manifestazione clinica in età adulta, a forme gravi quali l'agenesia e l'ipodisplasia renale. La possibilità di una loro diagnosi, prevenzione e cura dipende da una maggiore comprensione dei meccanismi patogenetici responsabili della malattia. Tali condizioni potrebbero essere la conseguenza di una disregolazione del normale programma nefrogenetico, che coinvolge un complesso network di geni. Studi sull'animale hanno permesso l'identificazione di alcuni di questi geni e nell'uomo mutazioni di geni omologhi sono responsabili di alcune di queste forme patologiche. Le mutazioni causa di malattia fino ad oggi identificate rendono ragione però solo di una piccola parte di casi sporadici o familiari osservati. In tutti gli altri casi la malattia potrebbe essere dovuta a mutazioni di geni fino ad oggi non indagati, ma potenzialmente coinvolti nella nefrogenesi.

Il rene con midollare a spugna (MSK) è una malattia malformativa renale, caratterizzata da anomalie cistiche dei dotti precaliceali, ad elevata prevalenza nei pazienti che soffrono di nefrolitiasi calcica ricorrente e con sintomi clinici, se presenti, ad estrinsecazione in età adulta. Sebbene la patogenesi di MSK non sia mai stata chiarita, la sua associazione con altre condizioni malformative renali ed extra-renali e il suo coinvolgimento in casi familiari hanno supportato l'ipotesi che si tratti di un disordine dello sviluppo e, in quanto tale, che fosse suscettibile di una analisi genetica alla ricerca di mutazioni causa di malattia o di geni di suscettibilità alla malattia. L'ipotesi che MSK potesse essere la conseguenza di una disregolazione che avviene a livello dell'interfaccia "abbozzo ureterale-mesenchima metanefrico", ossia di un danneggiamento dei processi molecolari coinvolti nella crescita e ramificazione dell'abbozzo ureterale e del cross-talk con il mesenchima metanefrico, avrebbe spiegato anche la sua associazione con altre forme malformative renali od anomalie del tratto urinario.

Sulla base dello stato dell'arte, questo studio ha portato a quattro risultati importanti per la ricerca delle basi genetiche di MSK: 1) la raccolta di una casistica consistente molto ben selezionata, unica nel panorama nazionale e forse internazionale, di pazienti affetti

da nefrolitiasi calcica e MSK, quest'ultimo diagnosticato sulla base di stretti criteri urografici. Questo ha permesso di confermare anche l'associazione di MSK con iperparitoridismo e con malformazioni renali, per la maggior parte rappresentate da rene piccolo congenito monolaterale; 2) la dimostrazione per la prima volta che varianti del gene GDNF sono presenti in alcuni pazienti affetti da MSK. L'analisi mutazionale del gene ha evidenziato in quattro pazienti due sostituzioni nucleotidiche, mai precedente descritte né segnalate come polimorfismi, portate in cis (sullo stesso allele) in regioni regolative del gene, nell'esone 3 non tradotto e nella regione dell'introne 3 vicino alla giunzione esone-introne, cruciali per il corretto splicing dell'RNA messaggero. Tali varianti mostrano una frequenza minore dell'1% nella popolazione generale e non sono state trovate in uno studio caso-controllo. In due pazienti è stata rilevata la variante intronica da sola e in un paziente la mutazione già descritta R93W nella regione codificante; 3) la prova che esistono casi familiari di MSK non apparenti. L'analisi familiare dei pazienti con varianti del gene GDNF ha rivelato, da un attento esame ecografico renale, che si trattava di casi familiari di MSK e non di casi sporadici, come supposto, e che esisteva una co-segregazione mutazione-malattia; 4) la dimostrazione che varianti alleliche del gene RET possono essere associate alla patologia di MSK. L'analisi mutazionale del gene ha identificato specifici genotipi, aplotipi o loro combinazioni che risultano o sovra-rappresentati o assenti nei pazienti con MSK e un particolare aplotipo che sembra essere determinante ai fini della malattia, se associato a variazioni di sequenza del gene GDNF o se presente in omozigosi.

Da questo si evince che varianti del gene GDNF e aplotipi funzionalmente rilevanti del gene RET potrebbero agire sinergicamente o da soli in modo dose-dipendente, disturbando così la nefrogenesi, ed essere fortemente associati al fenotipo MSK, costituendone la base genetica per lo meno in un sottogruppo di pazienti. Inoltre, è intuibile dallo studio che possa esserci una sottovalutazione di casi familiari della malattia.

La necessità di un'indagine accurata clinico strumentale per definire al meglio la ricorrenza della malattia (spesso è asintomatica), la necessità di condurre una più ampia analisi genetica per poter stabilire un possibile modello di eredità ed infine la necessità di studiare gli effetti delle alterazioni geniche identificate sull'espressione di GDNF a livello trascrizionale o traduzionale, per capire il loro potenziale significato

eziopatogenetico, richiederebbero comunque una prosecuzione dello studio per arrivare alla conclusione definitiva sul ruolo di GDNF nella patologia di MSK.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Pesce C, Colombo B, Nicolini E, Spata F, Cappellari F. [Medullary sponge kidney with severe renal function impairment: a case report]. *Pediatr Med Chir.* 1995; 17(1):65-7.
2. Gambaro G, Favaro S, D'Angelo A. Risk for renal failure in nephrolithiasis. *Am J Kidney Dis.* 2001; 37(2):233-43.
3. Osther PJ, Mathiasen H, Hansen AB, Nissen HM. Urinary acidification and urinary excretion of calcium and citrate in women with bilateral medullary sponge kidney. *Urol Int.* 1994; 52(3):126-30.
4. Pabico RC, McKenna BA, Freeman RB. Renal tubular dysfunction in patients with cystic disease of the kidneys. *Urology.* 1998; 51(5A Suppl):156-60.
5. Yagisawa T, Kobayashi C, Hayashi T, Yoshida A, Toma H. Contributory metabolic factors in the development of nephrolithiasis in patients with medullary sponge kidney. *Am J Kidney Dis.* 2001; 37(6):1140-3.
6. Macedo CS, Riyuzo MC, Bastos HD, Morcelli J. [Medullary sponge kidney, nephrolithiasis, hypercalciuria and hyperuricosuria in a child. Report of a case and follow-up]. *J Pediatr (Rio J).* 1996; 72(2):106-8.
7. Gupta S, Shanbag P, Vaidya M. Medullary sponge kidney. *Indian J Pediatr.* 2002; 69(12):1091-2.
8. Kasap B, Soylu A, Oren O, Türkmen M, Kavukçu S. Medullary sponge kidney associated with distal renal tubular acidosis in a 5-year-old girl. *Eur J Pediatr.* 2006; 165(9):648-51.

9. Dell' Adami G, Meneghini C. [The spongy kidney: first instance of the disease in brothers.] Arch Ital Urol. 1954; 27(2):81-9.
10. Copping GA. Medullary sponge kidney: its occurrence in a father and daughter. Can Med Assoc J. 1967; 96(10):608-11.
11. Kuiper JJ. Medullary sponge kidney in three generations. N Y State J Med. 1971; 71(22):2665-9.
12. Klemme L, Fish AJ, Rich S, Greenberg B, Senske B, Segall M. Familial ureteral abnormalities syndrome: genomic mapping, clinical findings. Pediatr Nephrol. 1998; 12(5):349-56.
13. Cameron S. Medullary Sponge Kidney. In: Oxford Textbook of Clinical Nephrology, 3rd Edition (Ed. A.M. Davison, J.S. Cameron, J-P Grünfeld, C. Ponticelli, E.Ritz, C.G. Winearls, C. van Ypersele). Oxford: University Press. 2004; 2495-501.
14. Choyke PL, Siegel MJ, Oz O, Sotelo-Avila C, DeBaun MR. Nonmalignant renal disease in pediatric patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. AJR Am J Roentgenol. 1998; 171(3):733-7.
15. Beetz R, Schofer O, Riedmiller H, Schumacher R, Gutjahr P. Medullary sponge kidneys and unilateral Wilms tumour in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome. Eur J Pediatr. 1991; 150(7):489-92.
16. Chesney RW, Kaufman R, Stapleton FB, Rivas ML. Association of medullary sponge kidney and medullary dysplasia in Beckwith-Wiedemann syndrome. J Pediatr. 1989; 115:761-4.

17. West PM, Love DR, Stapleton PM, Winship IM. Paternal uniparental disomy in monozygotic twins discordant for hemihypertrophy. *J Med Genet.* 2003; 40(3):223-6.
18. Kerr DN, Warrick CK, Hart-Mercer J. A lesion resembling medullary sponge kidney in patients with congenital hepatic fibrosis. *Clin Radiol.* 1962; 13:85-91.
19. Torres VE, Erickson SB, Smith LH, Wilson DM, Hattery RR, Segura JW. The association of nephrolithiasis and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 1988; 11(4):318-25.
20. Gambaro G, Feltrin GP, Lupo A, Bonfante L, D'Angelo A, Antonello A. Medullary sponge kidney (Lenarduzzi-Cacchi-Ricci disease): a Padua Medical School discovery in the 1930s. *Kidney Int.* 2006; 69(4):663-70.
21. Lambrianides AL, John DR. Medullary sponge disease in horseshoe kidney. *Urology.* 1987; 29(4):426-7.
22. Gambaro G, Fabris A, Citron L, Tosetto E, Anglani F, Bellan F, Conte M, Bonfante L, Lupo A, D'Angelo A. An unusual association of contralateral congenital small kidney, reduced renal function and hyperparathyroidism in sponge kidney patients: on the track of the molecular basis. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20(6):1042-7.
23. Maschio G, Tessitore N, D'Angelo A, Fabris A, Corgnati A, Oldrizzi L, Loschiavo C, Lupo A, Valvo E, Gambaro L, Rugiu C. Medullary sponge kidney and hyperparathyroidism--a puzzling association. *Am J Nephrol.* 1982; 2(2):77-84.

24. Diouf B, Ka EH, Calender A, Giraud S, Diop TM. Association of medullary sponge kidney disease and multiple endocrine neoplasia type IIA due to RET gene mutation: is there a causal relationship? *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(12):2062-3.
25. Pohl M, Bhatnagar V, Mendoza SA, Nigam SK. Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract. *Kidney Int*. 2002; 61(1):10-9.
26. Saxén L, Sariola H, Lehtonen E. Sequential cell and tissue interactions governing organogenesis of the kidney. *Anat Embryol (Berl)*. 1986; 175(1):1-6.
27. Saxén L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol*. 1987; 1(3):385-92.
28. Schedl A, Hastie ND. Cross-talk in kidney development. *Curr Opin Genet Dev*. 2000; 10(5):543-9.
29. Sampogna RV, Nigam SK. Implications of gene networks for understanding resilience and vulnerability in the kidney branching program. *Physiology (Bethesda)*. 2004; 19:339-47.
30. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec*. 1992; 232(2):194-201.
31. Shah MM, Sampogna RV, Sakurai H, Bush KT, Nigam SK. Branching morphogenesis and kidney disease. *Development*. 2004; 131(7):1449-62.
32. Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation*. 2006; 74(7):402-21.

33. Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(7):533-43.
34. Sariola H, Sainio K. The tip-top branching ureter. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9(6):877-84.
35. Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays.* 2006; 28(2):117-27.
36. Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12(4):361-73.
37. Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(4-5):441-67.
38. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development.* 1993; 119(4):1005-17.
39. Hellmich HL, Kos L, Cho ES, Mahon KA, Zimmer A. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev.* 1996; 54(1):95-105.
40. Bouchard M. Transcriptional control of kidney development. *Differentiation.* 2004; 72(7):295-306.
41. Esquela AF, Lee SJ. Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Dev Biol.* 2003; 257(2):356-70.
42. Kume T, Deng K, Hogan BL. Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development.* 2000; 127(7):1387-95.

43. Grieshammer U, Le Ma , Plump AS, Wang F, Tessier-Lavigne M, Martin GR. SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell*. 2004; 6(5):709-17.
44. Kim HJ, Bar-Sagi D. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5(6):441-50.
45. Basson MA, Akbulut S, Watson-Johnson J, Simon R, Carroll TJ, Shakya R, Gross I, Martin GR, Lufkin T, McMahon AP, Wilson PD, Costantini FD, Mason IJ, Licht JD. Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell*. 2005; 8(2):229-39.
46. Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J Clin Invest*. 2000; 105(7):863-73.
47. Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*. 2004; 131(14):3401-10.
48. Dudley AT, Godin RE, Robertson EJ. Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes Dev*. 1999; 13(12):1601-13.
49. Maeshima A, Vaughn DA, Choi Y, Nigam SK. Activin A is an endogenous inhibitor of ureteric bud outgrowth from the Wolffian duct. *Dev Biol*. 2006; 295(2):473-85.
50. Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P, Jani H, Grigoriou M, Sukumaran M, Wang LC, Hynes M, Raisman G, Pachnis V. Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*. 1999; 126(12):2785-97.

51. Hu J, Shima H, Nakagawa H. Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates sertoli cell proliferation in the early postnatal period of rat testis development. *Endocrinology*. 1999; 140(8):3416-21.
52. Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 19):3855-62.
53. Pepicelli CV, Kispert A, Rowitch DH, McMahon AP. GDNF induces branching and increased cell proliferation in the ureter of the mouse. *Dev Biol*. 1997; 192(1):193-8.
54. Majumdar A, Vainio S, Kispert A, McMahon J, McMahon AP. Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development*. 2003; 130(14):3175-85.
55. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*. 1994; 367(6461):380-3.
56. Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisé J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996; 382(6586):70-3.
57. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996; 382(6586):73-6.
58. Moore MW, Klein RD, Fariñas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996; 382(6586):76-9.

59. Srinivas S, Wu Z, Chen CM, D'Agati V, Costantini F. Dominant effects of RET receptor misexpression and ligand-independent RET signaling on ureteric bud development. *Development*. 1999; 126(7):1375-86.
60. Jijiwa M, Fukuda T, Kawai K, Nakamura A, Kurokawa K, Murakumo Y, Ichihara M, Takahashi M. A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(18):8026-36.
61. Wilkinson DG, Bailes JA, McMahon AP. Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell*. 1987; 50(1):79-88.
62. Andrews KL, Betsuyaku T, Rogers S, Shipley JM, Senior RM, Miner JH. Gelatinase B (MMP-9) is not essential in the normal kidney and does not influence progression of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Am J Pathol*. 2000; 157(1):303-11.
63. Georges-Labouesse E, Messaddeq N, Yehia G, Cadalbert L, Dierich A, Le Meur M. Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet*. 1996; 13(3):370-3.
64. King JA, Marker PC, Seung KJ, Kingsley DM. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol*. 1994; 166(1):112-22.
65. Cancilla B, Davies A, Cauchi JA, Risbridger GP, Bertram JF. Fibroblast growth factor receptors and their ligands in the adult rat kidney. *Kidney Int*. 2001; 60(1):147-55.

66. Qiao J, Uzzo R, Obara-Ishihara T, Degenstein L, Fuchs E, Herzlinger D. FGF-7 modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney. *Development*. 1999; 126(3):547-54.
67. Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277(3):643-9.
68. Karihaloo A, Karumanchi SA, Barasch J, Jha V, Nickel CH, Yang J, Grisaru S, Bush KT, Nigam S, Rosenblum ND, Sukhatme VP, Cantley LG. Endostatin regulates branching morphogenesis of renal epithelial cells and ureteric bud. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(22):12509-14.
69. Lelongt B, Makino H, Dalecki TM, Kanwar YS. Role of proteoglycans in renal development. *Dev Biol*. 1988; 128(2):256-76.
70. Barasch J, Yang J, Qiao J, Tempst P, Erdjument-Bromage H, Leung W, Oliver JA. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros. *J Clin Invest*. 1999; 103(9):1299-307.
71. Pohl M, Sakurai H, Bush KT, Nigam SK. Matrix metalloproteinases and their inhibitors regulate in vitro ureteric bud branching morphogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 279(5):F891-900.
72. Sakurai H, Nigam SK. Transforming growth factor-beta selectively inhibits branching morphogenesis but not tubulogenesis. *Am J Physiol*. 1997; 272(1 Pt 2):F139-46.

73. Bush KT, Sakurai H, Steer DL, Leonard MO, Sampogna RV, Meyer TN, Schwesinger C, Qiao J, Nigam SK. TGF-beta superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud. *Dev Biol.* 2004; 266(2):285-98.
74. Takayama H, LaRochelle WJ, Sabnis SG, Otsuka T, Merlino G. Renal tubular hyperplasia, polycystic disease, and glomerulosclerosis in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Lab Invest.* 1997; 77(2):131-8.
75. Dunn NR, Winnier GE, Hargett LK, Schrick JJ, Fogo AB, Hogan BL. Haploinsufficient phenotypes in *Bmp4* heterozygous null mice and modification by mutations in *Gli3* and *Alx4*. *Dev Biol.* 1997; 188(2):235-47.
76. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development.* 1997; 124(13):2659-70.
77. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature.* 1994; 372(6507):679-83.
78. Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, Yoshida K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Parravicini E, Malach S, Aranoff T, Oliver JA. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell.* 1999; 99(4):377-86.
79. Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, Rossant J. The basic-helix-loop-helix protein *pod1* is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development.* 1999; 126(24):5771-83.

80. Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, Krebs LJ, Costa J, Gallagher J, Wild Y, Saucier K. Molecular pathogenesis of primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res.* 2002; 17 Suppl 2:N30-6.
81. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993; 260(5111):1130-2.
82. Schindelhauer D, Schuffenhauer S, Gasser T, Steinkasserer A, Meitinger T. The gene coding for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5p12-p13.1. *Genomics.* 1995; 28(3):605-7.
83. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990; 6:597-641.
84. Butte MJ. Neurotrophic factor structures reveal clues to evolution, binding, specificity, and receptor activation. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(8):1003-13.
85. Springer JE, Seeburger JL, He J, Gabrea A, Blankenhorn EP, Bergman LW. cDNA sequence and differential mRNA regulation of two forms of glial cell line-derived neurotrophic factor in Schwann cells and rat skeletal muscle. *Exp Neurol.* 1995; 131(1):47-52.
86. Cristina N, Chatellard-Causse C, Manier M, Feuerstein C. GDNF: existence of a second transcript in the brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995; 32(2):354-7.
87. Grimm L, Holinski-Feder E, Teodoridis J, Scheffer B, Schindelhauer D, Meitinger T, Ueffing M. Analysis of the human GDNF gene reveals an inducible promoter, three exons, a triplet repeat within the 3'-UTR and alternative splice products. *Hum Mol Genet.* 1998; 7(12):1873-86.

88. Woodbury D, Schaar DG, Ramakrishnan L, Black IB. Novel structure of the human GDNF gene. *Brain Res.* 1998; 803(1-2):95-104.
89. Baecker PA, Lee WH, Verity AN, Eglen RM, Johnson RM. Characterization of a promoter for the human glial cell line-derived neurotrophic factor gene. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999; 69(2):209-22.
90. Springer JE, Mu X, Bergmann LW, Trojanowski JQ. Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. *Exp Neurol.* 1994; 127(2):167-70.
91. Schaar DG, Sieber BA, Sherwood AC, Dean D, Mendoza G, Ramakrishnan L, Dreyfus CF, Black IB. Multiple astrocyte transcripts encode nigral trophic factors in rat and human. *Exp Neurol.* 1994; 130(2):387-93.
92. Ashley CT Jr, Warren ST. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet.* 1995; 29:703-28.
93. Sehgal A, Patil N, Chao M. A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol Cell Biol.* 1988; 8(8):3160-7.
94. Pugh BF, Tjian R. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell.* 1990; 61(7):1187-97.
95. Thiele DJ. Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(6):1183-91.
96. Dalton TP, Li Q, Bittel D, Liang L, Andrews GK. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *J Biol Chem.* 1996; 271(42):26233-41.

97. Christy BA, Lau LF, Nathans D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85(21):7857-61.
98. Suter-Crazzolara C, Baecker PA, Johnson RM, Unsicker K. Characterization of a human GDNF gene-promoter (poster abstract). *Abstr Soc Neurosci*. 1997; 23:90.
99. Matsushita N, Fujita Y, Tanaka M, Nagatsu T, Kiuchi K. Cloning and structural organization of the gene encoding the mouse glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF. *Gene*. 1997; 203(2):149-57.
100. Tanaka M, Ito S, Kiuchi K. Novel alternative promoters of mouse glial cell line-derived neurotrophic factor gene. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1494(1-2):63-74.
101. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell*. 1985; 42(2):581-8.
102. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, Fertitta A, Carrano AV, Nagao M. Human *ret* proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene*. 1989; 4(12):1519-21.
103. Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, Ceccherini I, Patrone G, Priolo M, Buys CH, et al. The physical map of the human *RET* proto-oncogene. *Oncogene*. 1995; 11(9):1737-43.
104. Takahashi M, Cooper GM. *ret* transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*. 1987; 7(4):1378-85.
105. Kodama Y, Asai N, Kawai K, Jijiwa M, Murakumo Y, Ichihara M, Takahashi M. The *RET* proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer. *Cancer Sci*. 2005; 96(3):143-8.

106. Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BA, Mulligan LM. Structural analysis of the human ret proto-oncogene using exon trapping. *Oncogene*. 1993; 8(9):2575-82.
107. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(5):383-94.
108. Saarma M. GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem*. 2000; 267(24):6968-71.
109. Munnes M, Patrone G, Schmitz B, Romeo G, Doerfler W. A 5'-CG-3'-rich region in the promoter of the transcriptionally frequently silenced RET protooncogene lacks methylated cytidine residues. *Oncogene*. 1998; 17(20):2573-83.
110. Andrew SD, Delhanty PJ, Mulligan LM, Robinson BG. Sp1 and Sp3 transactivate the RET proto-oncogene promoter. *Gene*. 2000; 256(1-2):283-91.
111. Tahira T, Ishizaka Y, Itoh F, Sugimura T, Nagao M. Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene*. 1990; 5(1):97-102.
112. Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene*. 1995; 11(10):2039-45.
113. Carter MT, Yome JL, Marcil MN, Martin CA, Vanhorne JB, Mulligan LM. Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. *Cytogenet Cell Genet*. 2001; 95(3-4):169-76.
114. Runeberg-Roos P, Saarma M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med*. 2007;:1-9.

115. Plaza-Menacho I, Burzynski GM, de Groot JW, Eggen BJ, Hofstra RM. Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet.* 2006; 22(11):627-36.
116. Carlomagno F, De Vita G, Berlingieri MT, de Franciscis V, Melillo RM, Colantuoni V, Kraus MH, Di Fiore PP, Fusco A, Santoro M. Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. *EMBO J.* 1996; 15(11):2717-25.
117. Lantieri F, Griseri P, Ceccherini I. Molecular mechanisms of RET-induced Hirschsprung pathogenesis. *Ann Med.* 2006; 38(1):11-9.
118. Manié S, Santoro M, Fusco A, Billaud M. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet.* 2001; 17(10):580-9.
119. Sasaki A, Kanai M, Kijima K, Akaba K, Hashimoto M, Hasegawa H, Otaki S, Koizumi T, Kusuda S, Ogawa Y, Tuchiya K, Yamamoto W, Nakamura T, Hayasaka K. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Genet.* 2003; 114(1):22-6.
120. Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet.* 2000; 37(11):817-27.
121. Santoro M, Melillo RM, Fusco A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol.* 2006; 155(5):645-53.
122. Borrego S, Ruiz A, Saez ME, Gimm O, Gao X, López-Alonso M, Hernández A, Wright FA, Antiñolo G, Eng C. RET genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet.* 2000; 37(8):572-8.

123. Smigiel R, Lebioda A, Patkowski D, Czernik J, Dobosz T, Pesz K, Kaczmarz M, Sasiadek MM. Single nucleotide polymorphisms in the RET gene and their correlations with Hirschsprung disease phenotype. *J Appl Genet.* 2006; 47(3):261-7.
124. de Pontual L, Pelet A, Trochet D, Jaubert F, Espinosa-Parrilla Y, Munnich A, Brunet JF, Goridis C, Feingold J, Lyonnet S, Amiel J. Mutations of the RET gene in isolated and syndromic Hirschsprung's disease in human disclose major and modifier alleles at a single locus. *J Med Genet.* 2006; 43(5):419-23.
125. Pusch CM, Sasiadek MM, Blin N. Hirschsprung, RET-SOX and beyond: the challenge of examining non-mendelian traits. *Int J Mol Med.* 2002; 10(4):367-70 (Review).
126. Trang H. [Ondine syndrome or central congenital hypoventilation syndrome]. *Rev Prat.* 2006; 56(2):125-8.
127. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr, Marx SJ. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(12):5658-71.
128. Carlomagno F, Melillo RM, Visconti R, Salvatore G, De Vita G, Lupoli G, Yu Y, Jing S, Vecchio G, Fusco A, Santoro M. Glial cell line-derived neurotrophic factor differentially stimulates ret mutants associated with the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and Hirschsprung's disease. *Endocrinology.* 1998; 139(8):3613-9.

129. Hellmich HL, Kos L, Cho ES, Mahon KA, Zimmer A. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev.* 1996; 54(1):95-105.
130. Angrist M, Bolk S, Halushka M, Lapchak PA, Chakravarti A. Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. *Nat Genet.* 1996; 14(3):341-4.
131. Salomon R, Attié T, Pelet A, Bidaud C, Eng C, Amiel J, Sarnacki S, Goulet O, Ricour C, Nihoul-Fékété C, Munnich A, Lyonnet S. Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 1996; 14(3):345-7.
132. Ivanchuk SM, Myers SM, Eng C, Mulligan LM. De novo mutation of GDNF, ligand for the RET/GDNFR-alpha receptor complex, in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(12):2023-6.
133. Amiel J, Salomon R, Attié T, Pelet A, Trang H, Mokhtari M, Gaultier C, Munnich A, Lyonnet S. Mutations of the RET-GDNF signaling pathway in Ondine's curse. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(3):715-7.
134. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33(4):459-61.
135. Woodward ER, Eng C, McMahon R, Voutilainen R, Affara NA, Ponder BA, Maher ER. Genetic predisposition to pheochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET and VHL. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(7):1051-6.

136. Bahuau M, Pelet A, Vidaud D, Lamireau T, LeBail B, Munnich A, Vidaud M, Lyonnet S, Lacombe D. GDNF as a candidate modifier in a type 1 neurofibromatosis (NF1) enteric phenotype. *Med Genet.* 2001; 38(9):638-43.
137. Ginalski JM, Spiegel T, Jaeger P. Use of low-osmolality contrast medium does not increase prevalence of medullary sponge kidney. *Radiology.* 1992; 182(2):311-4.
138. Sancandi M, Griseri P, Pesce B, Patrone G, Puppo F, Lerone M, Martucciello G, Romeo G, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I. Single nucleotide polymorphic alleles in the 5' region of the RET proto-oncogene define a risk haplotype in Hirschsprung's disease. *J Med Genet.* 2003; 40(9):714-8.
139. Gil L, Azañedo M, Pollán M, Cristobal E, Arribas B, García-Albert L, García-Sáiz A, Maestro ML, Torres A, Menárguez J, Rojas JM. Genetic analysis of RET, GFR alpha 1 and GDNF genes in Spanish families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Int J Cancer.* 2002; 99(2):299-304.
140. Fitze G, Appelt H, König IR, Görgens H, Stein U, Walther W, Gossen M, Schreiber M, Ziegler A, Roesner D, Schackert HK. Functional haplotypes of the RET proto-oncogene promoter are associated with Hirschsprung disease (HSCR). *Hum Mol Genet.* 2003; 12(24):3207-14.
141. den Dunnen JT and Antonarakis SE. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. *Hum Mutat.* 2000; 15:7-12.
142. Merrill CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science.* 1981; 211(4489):1437-8.

143. Del Prete D, Forino M, Gambaro G, D'Angelo A, Baggio B, Anglani F. A comparative kinetic RT-PCR strategy for the quantitation of mRNAs in microdissected human renal biopsy specimens. *Exp Nephrol.* 1998; 6(6):563-7.
144. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, Barale R, Pacini F, Pinchera A. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(7):3579-84.
145. Robledo M, Gil L, Pollán M, Cebrián A, Ruíz S, Azañedo M, Benitez J, Menárguez J, Rojas JM. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res.* 2003; 63(8):1814-7.
146. Pasini B, Ceccherini I, Romeo G. RET mutations in human disease. *Trends Genet.* 1996; 12(4):138-44.
147. Borrego S, Sáez ME, Ruiz A, Gimm O, López-Alonso M, Antiñolo G, Eng C. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet.* 1999; 36(10):771-4.
148. Lesueur F, Corbex M, McKay JD, Lima J, Soares P, Griseri P, Burgess J, Ceccherini I, Landolfi S, Papotti M, Amorim A, Goldgar DE, Romeo G. Specific haplotypes of the RET proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma. *J Med Genet.* 2002; 39(4):260-5.
149. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11):2935-9.

IL CONTENUTO DI QUESTA TESI È STATO PRESENTATO A DIVERSI CONGRESSI NAZIONALI E INTERNAZIONALI DI INTERESSE NEFROLOGICO:

R. Torregrossa, F. Anglani, M. Ceol, A. Fabris, L. Citron, A. Lupo, A. D'Angelo, G. Gambaro. *Il gene GDNF può essere coinvolto nel fenotipo rene con midollare a spugna?* XXI Convegno della Sezione Triveneta della Società Italiana di Nefrologia, Padova 22-23 Settembre 2005; p.115.

R. Torregrossa, F. Anglani, M. Ceol, A. Fabris, L. Citron, A. Lupo, A. D'Angelo, G. Gambaro. *Analisi del gene GDNF nel rene con midollare a spugna: sulla pista delle basi molecolari.* 21° Congresso Nazionale della Società Italiana di Nefrologia Pediatrica, Venezia 27-29 Ottobre 2005; (C05).

Presentato come COMUNICAZIONE ORALE.

Torregrossa R, Anglani F, Ceol M, Fabris A, Citron L, Lupo A, D'Angelo A, Gambaro G. *Variazioni di sequenza del gene GDNF in pazienti affetti da rene con midollare a spugna: primi dati suggeriscono che si tratti di disease-causing mutations.* 47° Congresso Nazionale della Società Italiana di Nefrologia, Roma 24-27 Maggio 2006 - Giornale Italiano di Nefrologia n. S-35 2006; p.S6(4).

Presentato come COMUNICAZIONE ORALE.

R. Torregrossa, F. Anglani, M. Ceol, A. Fabris, L. Citron, A. Lupo, A. D'Angelo, G. Gambaro. *GDNF gene sequence variations in patients with medullary sponge kidney: preliminary data suggest disease-causing mutations.* XLIII Congress of the European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA), Glasgow, UK, July 15-18 2006 - NDT Nephrology Dialysis Transplantation Volume 21 Supplement 4 2006; p. iv352 (MP162).

Torregrossa R. Gambaro G, Fabris A, Citron L, Mezzabotta F, Lupo A, D'Angelo A, Anglani F. *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): un gene candidato per la patogenesi del rene con midollare a spugna.* IX Congresso Nazionale della Società Italiana di Genetica Umana – SIGU, Lido di Venezia 8-10 Novembre 2006; CD-ROM p. 61.

Presentato come COMUNICAZIONE ORALE.

R. Torregrossa, F. Anglani, M. Ceol, F. Mezzabotta, A. Fabris, A. Lupo, E. Tosetto, L. Artifoni, S. Centi, A. D'Angelo, G. Gambaro. *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a candidate gene for the pathogenesis of Medullary Sponge Kidney.* ISN – Nature Genetics Forefronts Symposium on Nephrogenetics: from development to physiology, Danvers, MA, USA March 8-11 2007; official website, abstract n. 12.

R. Torregrossa, A. Fabris, G. Gambaro, A. Lupo, A. Gozzini, F. Del Monte, A. Tanini, L. Citron, G. Scaparrotta, A. D'Angelo, F. Anglani. *Polimorfismi del gene RET e varianti del gene GDNF in pazienti affetti da rene con midollare a spugna.* XXIII Convegno della Sezione Triveneta della Società Italiana di Nefrologia, Stra (VE) 20-21 Settembre 2007; pp.128-129.

Torregrossa R., Gozzini A., Del Monte F., Fabris A., Citron L., Lupo A., Tanini A., D'Angelo A., Anglani F., Gambaro G. *Aplotipi funzionalmente rilevanti del gene RET e varianti del gene GDNF in pazienti affetti da rene con midollare a spugna.* 48° Congresso Nazionale della Società Italiana di Nefrologia, Bari 7-10 Ottobre 2007 - Giornale Italiano di Nefrologia n. S-39 2007; p.S15(4).

Presentato come COMUNICAZIONE ORALE.

L'ATTIVITÀ DI RICERCA È STATA PRESENTATA COME COMUNICAZIONE ORALE AL:

“ *Convegno di Presentazione dell'Attività di Ricerca dei Dottorandi del XX Ciclo della Macroarea 4 (Medicina e Chirurgia)*”, Padova 17 Ottobre 2006. Abstract Book p.37: **Torregrossa R.** Gambaro G, Ceol M, Fabris A, Citron L, Lupo A, D'Angelo A, Anglani F. *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): un gene candidato per la patogenesi del rene con midollare a spugna.*

INOLTRE, ESSA È STATA L'ARGOMENTO DI ALCUNI SEMINARI TENUTI ALL'INTERNO DELLA SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI – INDIRIZZO NEFROLOGIA:

Torregrossa R. “ *La nefropatia rene con midollare a spugna*”, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Padova 9 Giugno 2006.

Torregrossa R. “ *L'approccio dei geni candidati nello studio delle basi genetiche del rene con midollare a spugna, una nefropatia malformativa*”, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Padova 30 Maggio 2007.