



UNIVERSITÀ  
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: SCIENZE NEFROLOGICHE

CICLO XXIV

***GENETICA MOLECOLARE, EPIDEMIOLOGIA, PATOGENESI  
DEL RENE MIDOLLARE A SPUGNA***

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.ma Prof.ssa Angela D'Angelo

**Supervisore :** Dr.ssa Franca Anglani

**Dottoranda:** Dr.ssa Rosalba Cristofaro

*ALLA MIA FAMIGLIA*

# INDICE

<b>Riassunto</b>	1
<b>Summary</b>	5
<b>1. Rene con Midollare a Spugna</b>	9
1.1 Introduzione	9
1.2 Aspetti clinici di MSK	11
1.3 Imaging di MSK	12
1.4 MSK e la sua associazione ad altre patologie	13
1.5 MSK tra le anomalie congenite	14
1.6 Ruolo della genetica nelle malformazioni renali	16
1.7 Embriogenesi renale	20
1.8 Segnale GDNF/RET: evidenza in vivo della sua importanza nello sviluppo renale	23
<b>2. GDNF</b>	25
2.1 Famiglia di GDNF	25
2.2 GDNF: contesto genomico	29
2.3 RET: contesto genomico	29
2.4 Determinazione genetica della nefrogenesi: il network dei geni Pax2/Eya/Six	30
2.5 Regolazione dell'espressione di GDNF	31
2.6 Ruolo di GDNF nel rene adulto	34
2.7 SIX 1, SPRY1, PAX2	37
2.7.1 SIX1	37
2.7.2 SPRY1	40
2.7.3 PAX2	44

<b>3. SCOPO</b>	47
<b>4. Materiali e Metodi</b>	49
4.1 Pazienti MSK	49
4.2 Popolazione di controllo	49
4.3 Analisi di mutazione	50
4.3.1 Estrazione, purificazione, quantificazione e amplificazione del DNA genomico	50
4.3.2 Primers GDNF	52
4.3.3 Primers per studio di : Six1, Spry1 e Pax2	53
4.3.4 Purificazione, quantificazione e sequenziamento del DNA amplificato	56
4.4 Anali RFLP	59
4.4.1 Visualizzazione dei prodotti di digestione enzimatica	62
4.4.2 Doppia digestione enzimatica	63
4.5 Analisi statistica	64
4.6 Studio funzionale di GDNF	65
4.6.1 Colture cellulari di HK2	65
4.6.2 Trasfezione di plasmidi shRNA per GDNF	66
4.6.3 Stimolazione Osteogenica	70
4.6.3 Estrazione dell'RNA	70
4.6.4 Quantificazione dell'RNA	71
4.6.5 Verifica dell'integrità dell'RNA	72
4.6.6 Retrotrascrizione	72
4.6.7 Real time PCR	73
4.6.8 Immunocitochimica per lo studio della proteina di GDNF	76
4.6.9 Metodo colorimetrico per la valutazione della	77

<i>proliferazione cellulare</i>	
<i>4.6.10 Colorazione con il reagente von Kossa</i>	<i>77</i>
<i>4.6.11 Scanning Electron Microscope (SEM)</i>	<i>78</i>
<b>5. Risultati e Discussione</b>	<b>81</b>
<i>5.1 Studio di mutazione di GDNF</i>	<i>82</i>
<i>5.2 Studio dei casi famigliari di MSK</i>	<i>92</i>
<i>5.3 Studio funzionale di GDNF</i>	<i>98</i>
<b>6 Conclusioni</b>	<b>113</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>117</b>

## Riassunto

*IL Rene con Midollare a Spugna (MSK) riconosciuto per la prima volta a Padova, da Lenarduzzi nel 1939 grazie all'impiego dell'allora nuova tecnica dell'urografia e successivamente descritto nel 1949 da Cacchi e Ricci, rispettivamente urologo e patologo dell'Università patavina può essere annoverato tra le nefropatie congenite malformative per la presenza di ectasie precaliceali dei dotti collettori e per la sua frequente associazione con altre malformazioni congenite renali ed extrarenali. La funzione renale e la durata della vita nei pazienti MSK è normale; spesso si complica con lo sviluppo di nefrocalcinosi e nefrolitiasi. La patogenesi di MSK non è stata completamente chiarita ma la maggior parte degli autori concorda che si tratta di una patologia congenita con espressione ritardata. Che la causa di MSK potesse essere di natura genetica era suggerito dalla descrizione di alcuni casi familiari, dall'appartenenza di MSK al gruppo delle patologie malformative e dalla sua associazione con altre malattie ereditarie. La scoperta del gene/i responsabili della patologia è stato negli ultimi anni obiettivo del nostro gruppo di lavoro ed in particolare del mio lavoro di dottorato. L'ipotesi che ha dato inizio allo studio è che MSK sia la conseguenza di un disturbo durante lo sviluppo renale dell'interfaccia "gemma ureterale- mesenchima metanefrico" a causa di mutazioni/polimorfismi di RET, GDNF, o di altri geni coinvolti nell'embriogenesi renale, o in particolare a causa dell'interazione GDNF/RET. I risultati del sequenziamento diretto e test RFLP di GDNF su una casistica veneta di 112 pazienti, ben selezionata sulla base di stretti criteri urografici hanno permesso di identificare 1 variante rara della regione del promotore di GDNF (-27+18G>A) significativamente associata a MSK (p=0.02). Inoltre, la possibilità di estendere lo screening di GDNF su alcuni familiari di pazienti MSK ci ha permesso di scoprire che le varianti erano ereditate e che nelle famiglie erano associate al fenotipo MSK. Nella seconda parte del lavoro di dottorato è stata posta l'attenzione sui casi familiari di MSK.*

*In collaborazione con la Clinica Nefrologica di Verona sono stati indagati 50 gruppi famigliari scelti random dalla coorte di 112 pazienti con MSK . Dall'analisi mediante ecografia e/o Uro-TC estesa ai consanguinei della stessa generazione, e di 1, se possibile, 2 generazioni precedenti e/o successive è emerso che in 27 famiglie MSK segregava come carattere autosomico dominante, con espressività variabile e ridotta penetranza. Sui probandi di queste famiglie è stato fatto lo screening per il gene GDNF. Inoltre, in collaborazione con il laboratorio di Nefrologia Pediatrica dell'Università di Padova è stato fatto, lo screening di Six1, Spry1 e Pax2 che sono geni coinvolti nel processo di nefrogenesi renale e con un importante ruolo nei meccanismi di regolazione di GDNF, per un totale di 19 casi famigliari. Lo screening di GDNF mediante sequenziamento diretto delle regioni esoniche e delle giunzioni introne-esone non ha evidenziato nessuna variante rare né altre sostituzioni nucleotidiche. Allo stesso modo nessuna mutazione causativa è stata evidenziata per Six1, Spry1 e Pax2. Per Spry1 e Pax2 solo polimorfismi noti ma senza alcuna significatività statistica nelle frequenze alleliche confrontata con quella di popolazioni di controllo riportate in letteratura. Un altro obiettivo del mio lavoro di dottorato è stato quello di aver cercato di capire come varianti rare di GDNF possano essere associate al fenotipo MSK, in un sottogruppo di pazienti con nefrolitiasi, nefrocalcinosi ed MSK bilaterale. L'asportazione di un carcinoma renale in una paziente con MSK e mutazione di GDNF (-27+18G/C) ha dato l'opportunità di studiare per la mutazione di GDNF il suo significato funzionale e di verificare che cellule papillari renale prelevate da polo indenne al carcinoma renale e con bassi profili di espressione per GDNF, differenziavano spontaneamente verso un lineaggio osteogenico con la sintesi di proteine tipiche della matrice osteoide. Per cercare di approfondire se la down regolazione di GDNF, molto probabilmente dovuta alla mutazione che cade nella regione del promotore, possa avere avuto un coinvolgimento nel fenomeno di calcificazione osservato si è cercato di ottenere su cellule epiteliali renali (HK2), attraverso la tecnica di RNA interference, un*

*silenziamento stabile di GDNF. I dati preliminari di questi ultimi esperimenti hanno mostrato che nelle cellule HK2 silenziate per GDNF vi era la presenza di depositi di  $Ca_2PO_4$ , confermati sia dalla colorazione von Kossa sia dall'analisi SEM. La presenza dei depositi di calcio fosfato non sono state osservate né nel controllo negativo né nei cloni silenziati in normali condizioni di coltura, mentre nel controllo negativo in condizione osteogenica i depositi erano presenti, seppur in minore quantità rispetto al clone silenziato. Sebbene preliminari, i nostri suggeriscono che la down regolazione di GDNF potrebbe favorire la deposizione di  $Ca_2PO_4$  attraverso un meccanismo non ancora identificato. La nostra ipotesi è che l'apoptosi potrebbe essere la chiave.*



## Summary

*Medullary Sponge Kidney (MSK) was recognized for the first time in Padua, in 1939 by Lenarduzzi utilizing a new urography technique and subsequently described in 1949 by Cacchi and Ricci respectively urologist and pathologist at the University of Padua. Since its association with other congenital renal and extrarenal malformations, MSK may be considered among the congenital renal malformations also due to the presence of precalyceal ectasia of collecting ducts. The renal function and life span are normal in MSK patients, nevertheless MSK is often complicated by the development of nephrocalcinosis and nephrolithiasis. The pathogenesis of MSK has not been totally elucidated but many authors agree that it is a congenital disease with delayed expression. A genetic cause for MSK could be suggested by the description of some familial cases, by its link to the group of congenital malformations and by its association with other inherited diseases. Recently, the discovery of the genes responsible for this disease has attracted the attention of our group work and in particular of my PhD work. The working hypothesis is that MSK is the consequence of a disturbance in the ureteric bud- metanephric blastema interface, which might be due either to disease- causing mutation/ specific polymorphism of RET, GDNF and other genes involved in the interfacing, or to particular RET/GDNF genotype interaction. The results of direct sequencing and RFLP testing of GDNF on a population of 112, unrelated of Venetian origin MSK patients selected on the basis of strict urographic criteria led to the identification of a rare variant of GDNF promoter region (27+18G>A) significantly associated with MSK ( $p=0.02$ ). In addition, the possibility to extend GDNF screening to the family members of MSK patients carrying rare variants allowed us to discover that the variants were inherited and that they were associated with the MSK phenotype. In the second part of the study it has been placed attention to the familial cases of MSK. Sampling 50 cases from the cohort of*

112 sporadic MSK cases, and analyzing family members of the 1° and 2° generations by ultrasonography and /or UroTAC, we found that in 27 families MSK was inherited as an autosomal dominant trait, with variable expressivity and incomplete penetrance. In 19 families the screening of GDNF gene was conducted and, in addition, the screening of Six1, Spry1 and PAX2 genes that are involved in nephrogenesis with an important role in the mechanisms of GDNF regulation was performed. Sequencing of exon and intron boundaries of GDNF gene on the 19 families did not reveal any nucleotide substitutions or rare variants. Similarly, no causative mutation was found for Six1, Spry1 and Pax2. For Spry1 and Pax2 polymorphisms have been found but without any significance in the allele frequency as compared to control population. Another objective of the study was to understand the functional significance of GDNF rare variants in the context of MSK phenotype. The removal of a renal cell carcinoma in a MSK patient with the GDNF intronic (-27+18 G / C )rare variant gave us the opportunity to study MSK papillary cells in culture. We observed an exceptional phenomenon, the appearance of an osteogenic-like phenotype with deposition of calcium phosphate. We wonder if the down-regulation of GDNF expression that was lower in MSK cells in respect to control cells were the culprit of the observed phenomenon. To investigate if GDNF down-regulation most likely due to the mutation in the promoter region, may have had a role in the process of spontaneous calcification, we have stably silenced GDNF gene in human renal epithelial cells (HK2), through the technique of RNA interference. Preliminary data from these experiments showed in the silenced HK2 cells cultured under osteogenic conditions the presence of aggregates that Won Kossa staining and SEM analysis confirmed to be of  $Ca_2PO_4$ . The presence of calcium phosphate deposits were not observed in control negative as well as in silenced clones cultured in normal conditions, while in control negative cells under osteogenic stimulation few deposits were seen, however in lower number in respect to silenced cells. Although preliminary, our results suggest that GDNF down regulation in HK2

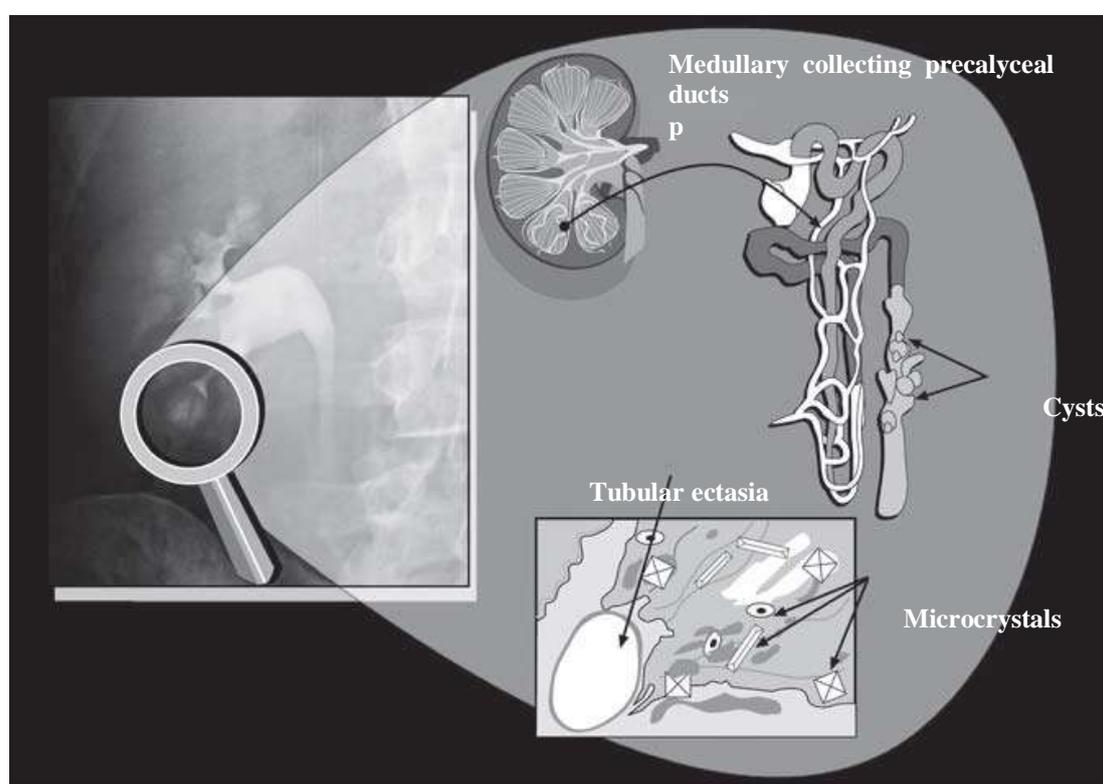
*cells may favor  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  deposition through a mechanism not yet identified. Our hypothesis is that apoptosis might be the key.*



# 1. Rene con Midollare a Spugna

## 1.1 INTRODUZIONE

Il rene con Midollare a Spugna è una malformazione renale caratterizzata da un elevato rischio di sviluppare nefrocalcinosi e calcoli renali, con alterazioni nell'acidificazione e concentrazione urinaria, anomalie cistiche dei dotti precaliceali ed un moderato rischio di infezioni urinarie ed insufficienza renale. Generalmente è una malattia sporadica ma in letteratura sono stati riportati anche alcuni casi familiari. Sebbene relativamente rara, la malattia non è rara in pazienti con nefrolitiasi calcica. La sua prevalenza nella popolazione generale non è esattamente conosciuta, non è stata mai eseguita nessuna autopsia sistematica per indagare la condizione e a volte le indagini radiografiche sono veramente soggettive.



**Figura 1. Formazione di calcoli in MSK.** Schema che mostra il tipico aspetto all'esame urografico delle papille renali con il classico aspetto a bouquet di fiori nel caso di ( a ) rene con midollare a spugna corrispondente alla presenza di ( b ) dotti precaliceali dilatati ( c ) con alcune cisti e ( d ) strutture tubulari con aree ectasiche ben evidenti al microscopio ottico , che offrono un ambiente favorevole per la deposizione di cristalli.

La diagnosi di MSK è radiografica e l'urografia è l'indagine di riferimento. I quadri tipici sono rappresentati 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, con la classica manifestazione di un bouquet di fiori (fig.1,2).



**Figura 2. Bouquet di fiori**

In MSK è frequente la nefrocalcinosi midollare, ma non è né sempre presente né obbligatoria per la diagnosi. I casi classici coinvolgono tutte le papille renali bilateralmente, ma possono essere interessate le papille di un solo rene o alcune di esse. La malattia è interessante per molti aspetti: 1) per l'impatto delle tecnologie impiegate per la sua diagnosi, sia in passato che in futuro; 2) l'elusiva patogenesi: siamo ancora di fronte a vecchi e generiche ipotesi (sviluppo anomalo congenito dei tubuli renali con secondaria dilatazione cistica; dotti collettori dilatati secondariamente ad ostruzione di sali di calcio; manifestazione renale di un disturbo del tessuto connettivo sistemico; manifestazione renale di un primario iperparatiroidismo), malgrado la sua associazione con disordini dello sviluppo suggerisca un'origine mal formativa, una recente classificazione dei disordini dello sviluppo del rene non considera affatto MSK (1).

## **1.2 ASPETTI CLINICI DI MSK**

Sebbene MSK possa essere silente, le sue caratteristiche anatomiche e la sua associazione con alterazioni funzionali fanno sì che sia frequentemente complicata dalla nefrolitiasi e dalla pielonefrite. Altre manifestazioni meno frequenti sono ematuria macro/microscopica, insufficienza renale e iperparatiroidismo primario. Segnali più comuni sono invece la ricorrente nefrolitiasi calcica e nefrocalcinosi. L'associazione con ipercalciuria renale, acidosi tubulare distale e ipocitraturia ( con stasi urinaria nei dotti papillari ectasici) porta alla formazione di calcoli di calcio fosfato e/o ossalato di calcio. L' iperparatiroidismo è frequentemente associato ed è stato spesso considerato causare MSK ed innescare la formazione in questi pazienti di calcoli (2). Tuttavia in molti pazienti l'ipercalciuria, la nefrocalcinosi e la formazione di calcoli renali precedono di molti anni l'insorgenza dell'iperparatiroidismo. E' stato anche suggerito che l'ipercalciuria renale innesci la stimolazione della ghiandola paratiroide che porta all'iperplasia (3).

Tuttavia oggi si pensa che l'iperparatiroidismo e la formazione di calcoli siano secondari ad un comune disordine. In aggiunta alle altre anomalie morfologiche dei dotti precaliceali, MSK è associata ad altre alterazioni sia dei tubuli inferiori , come una difettosa concentrazione urinaria, acidosi tubulare distale e ipocitraturia e sia del nefrone superiore (nel tubulo prossimale) che è la zona di massimo riassorbimento del glucosio (TmGlucose) e di massima secrezione del P-amminoippurato (TmPAH). In MSK il rischio di insufficienza renale sembra essere relativamente modesto in relazione anche a infezioni renali e alla formazione di calcoli di struvite (4,5). In MSK sono stati riportati anche casi familiari associati con agenesia renale, altre malformazioni renali o anomalie del tratto urinario. Per questi casi familiari è stato individuato un pattern di ereditarietà del tipo autosomico dominante (6,7).

### **1.3 IMAGING DI MSK**

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) si tradurrà inevitabilmente in una riduzione del numero di casi di MSK diagnosticati. Infatti, pur essendo stato scritto che MSK è diagnosticata tramite ecografia renale, essa non consente di mettere in evidenza i reperti tipici e patognomonicici di questa condizione che al contrario l'urografia è in grado di mostrare (8).

L'ecografia evidenzia solo l'iperecogenicità midollare dovuta prevalentemente alla nefrocalinosi, ma per questo è un segno aspecifico (9).

Per quanto riguarda la TAC , la sua sensibilità è discretamente inferiore a quella dell'urografia poiché anche nei casi più conclamati di questa patologia, la TAC può solo mostrare immagini che suggeriscono l'MSK. Recenti dati preliminari suggeriscono che la TAC spirale possa essere più sensibile dell'urografia nella diagnostica di MSK, ma questo attende ancora di essere confermato. Infine la NMR non pare essere sufficientemente sensibile nel dimostrare i segni tipici di MSK (10). Pertanto MSK la cui entità clinica fu riconosciuta da Lenarduzzi nel 1963 a Padova con l'avvento dell'urografia nella diagnostica radiologica, sembra destinata a scomparire ancora, ad essere cioè sempre meno diagnosticata.

#### **1.4 MSK E LA SUA ASSOCIAZIONE AD ALTRE PATOLOGIE**

Pur non essendo stata ancora chiarita la patogenesi di MSK, la sua associazione con diverse condizioni malformative suggerisce si tratti di una patologia disembrionogenetica. Le più importanti di queste patologie sono l'emi-ipertrofia congenita e la sindrome di Beckwith-Wiedemann (una sindrome caratterizzata da macroglossia, onfalocele, anomalie ombelicali, anomalie della parete addominale alla nascita e che presenta il rischio di sviluppare neoplasie quali carcinoma surrenalico, tumore di Wilms, epatoblastoma, rabdiomiosarcoma) (11). Quando MSK si associa a tumore di Wilms, ciò accade generalmente nel contesto di una emi-ipertrofia congenita o di una sindrome di Beckwith-Wiedemann. All'incirca 1 paziente ogni 8 con sindrome di Beckwith-Wiedemann ha qualche grado di emi-ipertrofia, e questo rapporto sale al 40% se vi si associa anche il tumore di Wilms. In una casistica pediatrica con sindrome di Beckwith-Wiedemann, il 22% presentava ipercalciuria (contro un valore atteso nella popolazione pediatrica generale del 7-10%) e la gran parte di essi aveva anche nefrocalcolosi, dati questi che suggerivano la coesistenza di MSK (12). Chesney ed altri (13) hanno proposto che MSK ed emi-ipertrofia costituiscano una forma parziale di sindrome di Beckwith-Wiedemann. Sembra pertanto esserci una triangolazione tra MSK, tumore di Wilms e emi-ipertrofia/ sindrome di Beckwith-Wiedemann. Un secondo gruppo di condizioni associate a MSK comprende le dilatazioni congenite intraepatiche dei dotti biliari e la fibrosi epatica, nonché il rene policistico nella sua forma autosomica dominante (ADPKD).

In MSK sono stati riportati anche casi familiari associati con agenesia renale, altre malformazioni renali o anomalie del tratto urinario. Per questi casi familiari è stato individuato un pattern di ereditarietà del tipo autosomico dominante (14,15).

### **1.5 MSK TRA LE ANOMALIE RENALI CONGENITE**

Le anomalie congenite sono particolarmente frequenti nel rene rispetto ad altri organi. Molte possono passare inosservate in quanto non provocano alcun disturbo o vengono riscontrate occasionalmente in età adulta nel corso di indagini eseguiti per altri motivi. Le anomalie renali possono essere divise in:

1. Anomalie di numero
  - Agenesia
  - Rene soprannumerario
2. Anomalie di volume
  - Ipoplasia
  - Duplicità (triplicità) renale-bifidità
3. Anomalie di struttura
  - Rene multicistico
  - Rene policistico di tipo infantile
  - Rene policistico di tipo adulto
  - Malattie cistiche della Midollare (MSK)
4. Anomalie di posizione (o ascesa)
5. Anomalie di forma e fusione
6. Anomalie di rotazione

Tra le malattie cistiche della midollare si colloca MSK. Essa comprende sostanzialmente due sindromi.

1. La malattia cistica della midollare (nefronoftisi) è una forma familiare che può manifestarsi durante l'adolescenza. E' costituita dalla presenza di molte piccole cisti sparse nella midollare renale (giunzione corticomidollare). I reni sono caratteristicamente di dimensione ridotta e di forma conservata. In un primo momento si manifesta di solito con anemia e affaticabilità successivamente compaiono insufficienza renale, iperfosfatemia e acidosi e può insorgere anche ipertensione arteriosa. Nella denominazione di "malattia cistica della midollare" vengono incluse forme ereditarie, sia dominanti che recessive e, eccezionalmente forme senza precedenti anamnestici.
2. Il rene con midollare a spugna (16).

## **1.6 RUOLO DELLA GENETICA NELLE MALFORMAZIONI RENALI**

Le malformazioni del rene e delle vie urinarie sono causa comune e frequente di insufficienza renale cronica in età pediatrica , ma ancora ben poco è noto sui complessi meccanismi molecolari che sottendono tali anomalie di “programming” della nefrogenesi. E’ ormai noto, da numerosi modelli sperimentali, che qualsiasi evento di disturbo si trasforma in un segnale che stimola una risposta proliferativa da parte dell’epitelio metanefrico, con un concomitante blocco nella formazione di nuovi nefroni e apoptosi delle cellule precursori. Con l’attuale uso routinario dell’ecografia prenatale le malformazioni renali sono individuate sempre più precocemente, raggiungendo circa il 30% di tutte le malformazioni diagnosticate in epoca prenatale. Se alcune delle alterazioni hanno un significato clinico di minore importanza, altre possono richiedere un intervento terapeutico immediatamente dopo la nascita. Mentre le conoscenze dello sviluppo morfogenetico del rene in epoca embrionaria sono sempre maggiori, poco è ancora noto circa i meccanismi molecolari che ne sono alla base. La tappa fondamentale dell’intero processo di ontogenesi renale è costituita dalla formazione della gemma ureterale in cui sono coinvolte complesse interazioni tra due elementi determinanti: la gemma ureterale e il blastema metanefrico. In particolare sono gli eventi di induzione reciproca tra la gemma ureterale e il blastema metanefrico ad essere maggiormente coinvolti e non è sorprendente che un difetto primitivo di uno di essi porti inevitabilmente ad un alterato sviluppo dell’altro. E’ stato anche suggerito che il tempo e la posizione della gemma ureterale dal dotto di Wolff siano linearmente correlati con lo sbocco dell’orifizio ureterale nella parete vescicale. Per esempio se l’origine della gemma ureterale è anomala (precoce o tardiva, mediale o laterale, doppia o multipla etc.) il suo incontro con il blastema metanefrico non avviene con la necessaria precisione, per cui si determineranno malformazioni più o meno gravi del rene e delle vie urinarie superiori. Se ancora il processo di incorporazione della vescica primitiva avverrà per un tempo troppo breve o troppo lungo, si determineranno

malformazioni più o meno gravi della giunzione vescico-ureterale. Le basi molecolari dell'embriogenesi renale sono in gran parte ancora da individuare. E' noto, però che tale processo presuppone l'interazione di molecole come fattori di trascrizione, fattori di crescita, molecole di adesione cellulare, proteine della matrice extracellulare essenziali per il controllo del ciclo cellulare, della proliferazione, della differenziazione e della morfogenesi durante lo sviluppo embrionale. E' un processo complesso i cui eventi molecolari risiedono nell'interazione tra geni diversi, le cui alterazioni potrebbero spiegare sia i meccanismi che la familiarità di malformazioni renali. Durante lo sviluppo fisiologico il rene va incontro a numerose e specifiche variazioni morfo-funzionali e la varietà di tali tappe può essere disturbata da alterazioni spaziali-temporali di geni che controllano la nefrogenesi. Le cause che alterano tale processo sono diverse e comprendono mutazioni genetiche, agenti teratogeni chimici e farmaceutici, ostruzioni e malnutrizione materna. Il numero di geni interessati in questo processo è elevato e comprende: geni che codificano per proteine implicate nei processi di differenziazione e di trascrizione cellulare (molecole di segnale), di apoptosi (cellule di sopravvivenza) e fattori di crescita; geni strutturali e che regolano la matrice extracellulare, renina e AT2(17). I geni WT1 (Wilms tumor gene) e Sal-like (Sall1) espressi dal mesenchima metanefrico e dai suoi derivati, sono i maggiori regolatori della trasformazione mesenchimo-epiteliale e dello sviluppo dei dotti collettori e dei tubuli. Entrambi risultano ridotti nei casi di ostruzione, mentre l'assenza del GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor) e del suo recettore cRET, è responsabile di un ridotto sviluppo renale. Questi due maggiori sistemi che codificano " molecole di segnale", interagiscono con il sistema Pax2, che sembra regolare la presenza del GDNF nel mesenchima metanefrico prima della conversione in nefrone maturo.

### **Ipotesi patogenetiche**

Una teoria patogenetica di MSK dovrebbe consentire di giustificare il cointeresamento di distretti anatomici diversi (dotti collettori e papillari da una parte, nefrone dall'altra) che hanno origine embriologica diversa. Dovrebbe anche spiegare perché è così frequente l'associazione MSK-iperparatiroidismo. Pochi anni fa è stato pubblicato il caso di una paziente con carcinoma midollare della tiroide che aveva anche un concomitante iperparatiroidismo (il che consentiva di formulare la diagnosi di MEN- 2a) insieme ad MSK, e nella quale era presente una mutazione del gene proto-oncogenetico RET. Gli autori avanzarono l'ipotesi che l'associazione i MSK/mutazione RET fosse patogenetica (18).

L'idea di un meccanismo patogenetico comune alle due malattie è comunque intrigante poiché RET esercita un ruolo molto rilevante nello sviluppo embriologico del rene. Durante l'embriogenesi di questo organo, la produzione di molecole chemiotattiche ad esempio Glial- Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) da parte del blastema metanefrico stimola la gemmazione della gemma ureterale dal dotto mesonefrico di Wolff. La superficie apicale della gemma ureterale esprime il recettore del GDNF cioè il RET. Il legame tra i due è essenziale non solo per la corretta formazione dell'uretere e dei dotti collettori (entrambi di origine wolffiana) ma anche per l'induzione della nefrogenesi, e per la morfogenesi e crescita del rene. In particolare la transizione delle cellule mesenchimali del metanefro a cellule nefroniche, la corretta polarizzazione delle cellule tubulari renali e infine la specializzazione dei diversi segmenti tubulari del nefrone richiedono dei messaggi differenziativi a partire dall'interfaccia "gemma ureterale/blastema metanefrico" (19). Si è così ipotizzato che MSK sia la conseguenza di un disturbo di interfacciamento tra queste due strutture: ciò spiegherebbe la concomitanza di alterazioni nei dotti collettori e precaliceali con disturbi funzionali multipli nel tubulo nefronico (20).

Inoltre, se l'alterazione di tale interfacciamento dipendesse da qualche disturbo della funzione RET, questo potrebbe anche sostenere l'ipotesi che l'iperparatiroidismo ne sia la conseguenza visto il ruolo di RET nella proliferazione delle cellule paratiroidi e l'associazione di MSK con patologie epatiche in considerazione del possibile ruolo di RET nello sviluppo embrionale del sistema biliare. Tuttavia anche altri geni possono essere proposti per spiegare un'alterazione dello sviluppo embrionale renale del tipo osservato in MSK come WT1 che è coinvolto nell'induzione della gemma ureterale e molti altri quali Eya1, integrine, PAX2, laminina  $\alpha 5$ , AgtR2, FGFs, MT1, MMP, MMP9, TIMP2 tutti con ruolo nella nefrogenesi. Tuttavia poiché molti di essi continuano ad essere attivi anche dopo l'embriogenesi, è meno verosimile che loro mutazioni siano in gioco poiché i pazienti con MSK non presentano manifestazioni dovute a mutazioni di questi geni. L'abnorme interfacciamento tra gemma ureterale e blastema metanefrico potrebbe essere anche la conseguenza di fattori ambientali (farmaci, virus ecc) durante la gravidanza e questo spiegherebbe la sporadicità dei casi MSK. Tuttavia anche nell'ipotesi genetica è possibile giustificare la rarità dei casi familiari e l'apparente sporadicità della malattia nelle famiglie. Infatti mutazioni delle cellule germinali potrebbero causare forme apparentemente sporadiche di MSK con varie modalità:

- 1) penetranza incompleta;
- 2) con un fenomeno two-hit, quando cioè non basta la sola mutazione di RET (o GDNF) ma è necessaria anche una seconda mutazione per determinare MSK(21).

## 1.7 EMBRIOGENESI RENALE

La tappa fondamentale dell'ontogenesi renale è costituita dalla formazione della gemma ureterale in cui sono coinvolte complesse interazioni induttive tra due elementi determinanti:

dotto di Wolff – mesenchima metanefrico

a livello del dotto di Wolff è espresso GDNF che richiede per il suo pathways di segnale il recettore tirosin chinasi RET ed il co-recettore GFRa1, entrambi espressi dal mesenchima metanefrico (fig.3). Non è sorprendente che un difetto primitivo di uno di essi porti inevitabilmente ad un alterato sviluppo dell'altro (22).

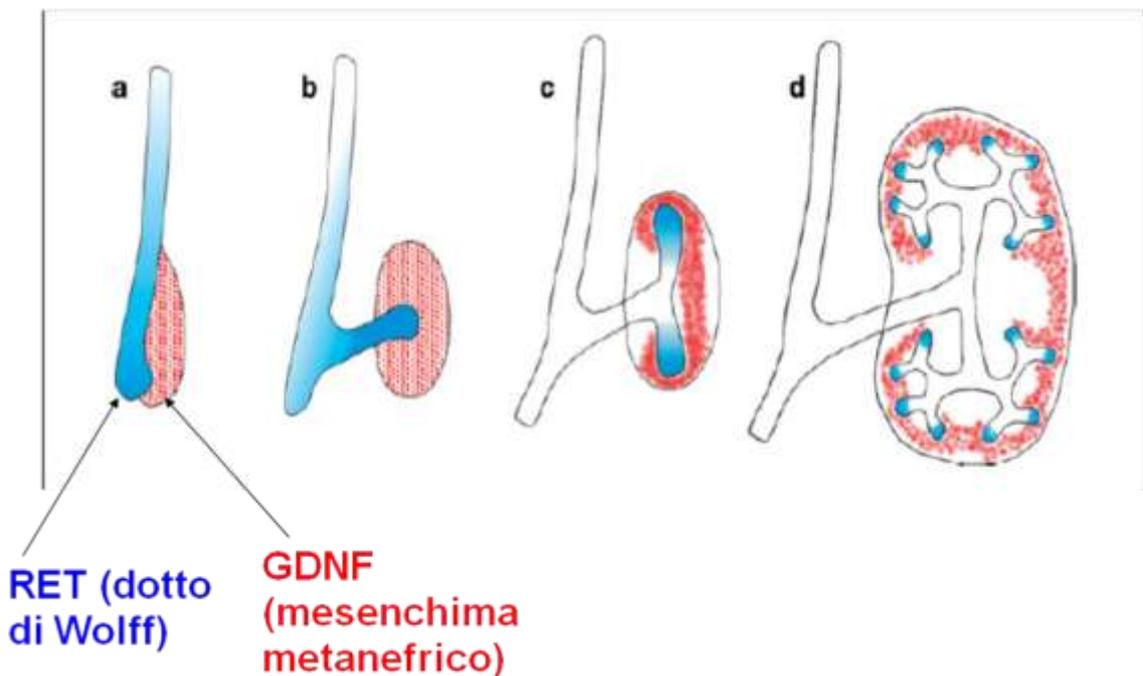
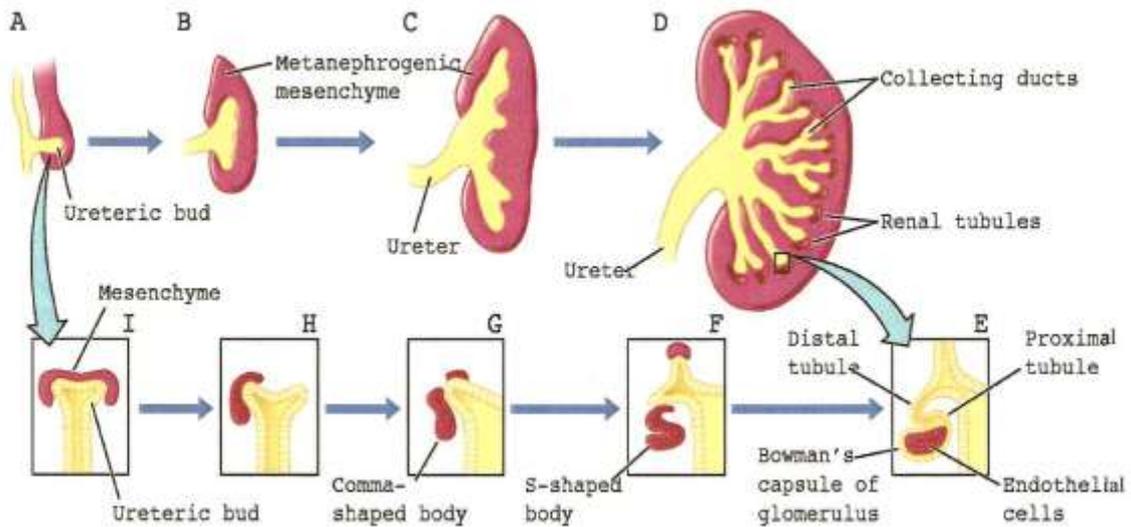


Figura 3. Espressione di GDNF e RET durante un normale sviluppo renale.

Ripercorrendo il processo di formazione del rene vediamo che nei mammiferi il rene si sviluppa in tre stadi: pronefro, mesonefro e metanefro che differenzia nel rene adulto. 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 ad alcuni segnali che originano da un cluster di cellule del mesoderma intermedio, noto come mesenchima metanefrico inizia lo sviluppo renale vero e proprio. Dall'estremità caudale del dotto di Wolff (mesonefro) viene indotta un'evaginazione chiamata abbozzo ureterale. La gemma ureterale in crescita si allunga, ramifica fino ad invadere il mesenchima metanefrico. La ramificazione della gemma ureterale avviene grazie a dei segnali mesenchimali derivati dal mesenchima metanefrico. E a sua volta la gemma ureterale secreta segnali che inducono le cellule mesenchimali a condensare e a generare aggregati pre-tubulari all'estremità dei rami dell'abbozzo ureterale. Gli aggregati vanno incontro a diversi stadi morfologici intermedi, che includono i corpi comma e S-shaped formando i tubuli metanefrici che maturano e diventano i tubuli prossimali e distali del responsabili della regolazione del trasporto di ioni e molecole organiche (tubulo genesi) e la componenti epiteliale glomerulare, addetta alla filtrazione (fig.4). Questo processo di epitelizzazione è noto come trasformazione mesenchimale-epiteliale (MET). Le strutture tubulari fonderanno alla fine per il nefrone, l'unità funzionale del rene. I nefroni in formazione attraggono le cellule endoteliali per rendere funzionali i glomeruli. In più vascolarizzazione e innervazione sono essenziali per la funzione renale (23).



**Figura 4. Morfogenesi renale dalla formazione della ramificazione dell'abbozzo ureterale fino alla formazione del nefrone:** crescita dell'abbozzo ureterale attraverso dei segnali che originano dal mesenchima metanefrico (A,B); allungamento e ramificazione dell'abbozzo (C, D); formazione dei corpi comma e S-shaped fino alla formazione del nefrone (E, F,G, H).

Per cui ricapitolando i vari steps della nefrogenesi abbiamo:

1. induzione dell'abbozzo ureterale;
1. 2.sviluppo del sistema collettore (uretere, calici e dotti corticali e midollari);
2. conversione del mesenchima metanefrico in epitelio, seguita dalla formazione dei tubuli;
3. glomerulogenesi.

Ogni step è complesso e richiede una precisa coordinazione spazio-temporale di una varietà di geni che codificano per fattori di crescita, recettori, molecole di adesione cellula- cellula, cellula-matrice, fattori di trascrizione. Il risultato di ciò sarà una corretta transizione delle cellule mesenchimali del metanefro a cellule del nefrone, una corretta polarizzazione delle cellule tubulari ed una specializzazione dei diversi segmenti tubulari del nefrone. I messaggi differenziativi di questa precisa coordinazione originano dall'interfaccia "abbozzo ureterale- mesenchima metanefrico".

### ***1.8 SEGNALE GDNF/RET: evidenza in vivo sulla sua importanza nello sviluppo renale***

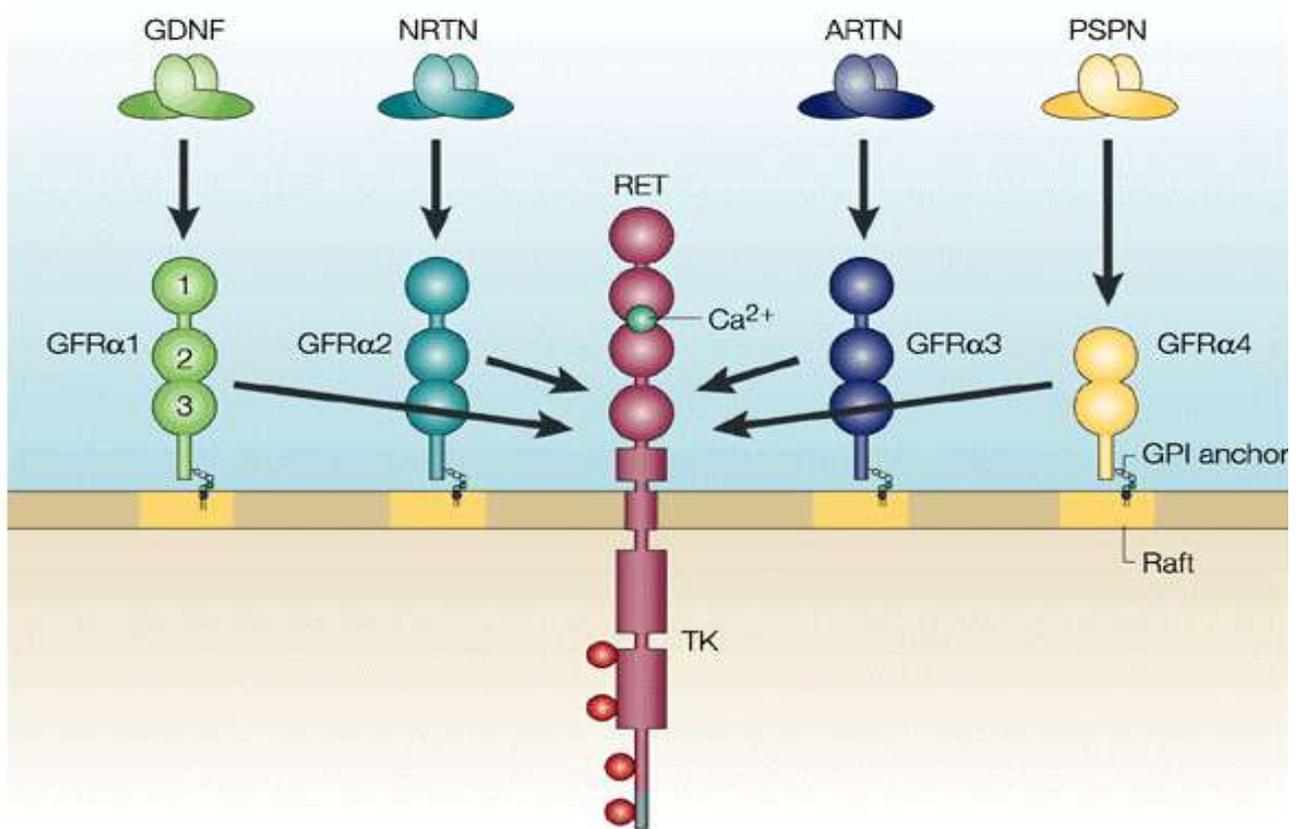
In letteratura sono riportati diversi esperimenti di inattivazione in vivo dei geni GDNF o RET condotti su animali transgenici o knockout. (24,25,26) In entrambi i casi il risultato è agenesia renale, dovuta ad una mancata evaginazione dell'abbozzo ureterale dal dotto di Wolff. Alcuni animali eterozigoti per un allele nullo di GDNF o RET mostrano invece agenesia renale unilaterale o ipoplasia. La penetranza è però variabile poiché una certa percentuale di mutanti presenta reni e apparato ureterale rudimentali, indice del fatto che vi sono 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 (27). 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 un'alterata espressione di GDNF. 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 (28,29).



## **2. GDNF**

### **2.1 FAMIGLIA DI GDNF**

GDNF è stato purificato e caratterizzato per la prima volta nel 1993 come un fattore di crescita che promuove la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici del mesencefalo, quelli che degenerano nella malattia di Parkinson e successivamente scoperto per avere pronunciati effetti sulle altre sottopopolazioni neuronali, creando molte aspettative come potente agente terapeutico per il trattamento di malattie degenerative. Esso appartiene alla famiglia GFLs (GDNF-family ligand) che comprende oltre a lui anche la Neurturina (NRTN), la Persefina (PSPS) e l'Artemina (ARTN) (fig.5). Il GDNF, la NRTN e l'ARTN sostengono la sopravvivenza di popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale, periferico ed autonomo; la PSPS supporta invece la sopravvivenza di popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale. Un recettore comune, RET, modula l'azione di questa famiglia ed un co-recettore, GFRa determina la specificità del RET. Le GFLs condividono solo il 40% di identità aminoacidica e sono imparentati con la superfamiglia del TGFb. Tutti appartengono alla famiglia delle cystine knot, che è un motivo strutturale che consiste di sei residui cisteinici legati da tre ponti di solfuro ed è coinvolto nella stabilizzazione della proteina. Tipicamente come per le proteine secrete le GFLs sono inizialmente sintetizzate come molecole inattive nella forma preproGFLs. La sequenza segnale pre è rimossa al momento della secrezione della proteina; la sequenza pro dopo la produzione attiva delle GFLs e attraverso un clivaggio proteolitico sulla superficie delle cellule target. Sebbene siano stati ampiamente studiati i siti di sintesi delle GFLs, la conoscenza sulla regolazione genica e i meccanismi di secrezione e attivazione è veramente limitata.



**Figura 5. Famiglia di GDNF.** Rappresentazione di tutti i membri della famiglia di GDNF con i loro rispettivi ligandi e l'interazione con il recettore comune RET.

Tutte le GFLs esercitano il loro segnale attraverso il recettore RET che è attivato solo se le GFLs sono legate ad una classe di proteine conosciute come GDNF-family receptor-a (GFRa) e che sono legati alla membrana plasmatica attraverso il glicosil fosfatidilinositolo (GPI). Sono stati individuati 4 differenti recettori GFRa, ognuno dei quali determina la specificità del complesso GFRa-RET:

- GDNF lega GFRa1;
- NTN lega GFRa2;
- ARTN lega GFRa3;
- PSPS lega GFRa4.

Le GFRa sono proteine attaccate alla membrana plasmatica attraverso il glicosil fosfatidilinositolo (GPI) e sono costituiti da tre domini globulari ricchi di cisteina ad eccezione di GFRa4 che ne ha solo 2. I fattori di crescita legano principalmente il secondo dominio globulare, il quale è poi cruciale per il legame con RET (30).

RET è una singola proteina transmembrana che contiene 4 caderine simili ripetute nel dominio extracellulare e un dominio tirosin chinasi intracellulare. Secondo il modello originale, un dimero di GDNF lega il suo GFRa; il complesso che si forma GDNF-GFRa1 interagisce così con due molecole di RET e induce l'omodimerizzazione e la fosforilazione della tirosina (fig.6). Mutanti per GDNF sono incapaci di legare GFRa e di attivare RET. Tuttavia la stechiometria nonché la cinetica della formazione del complesso ligando-recettore non sono ben conosciuti (31).

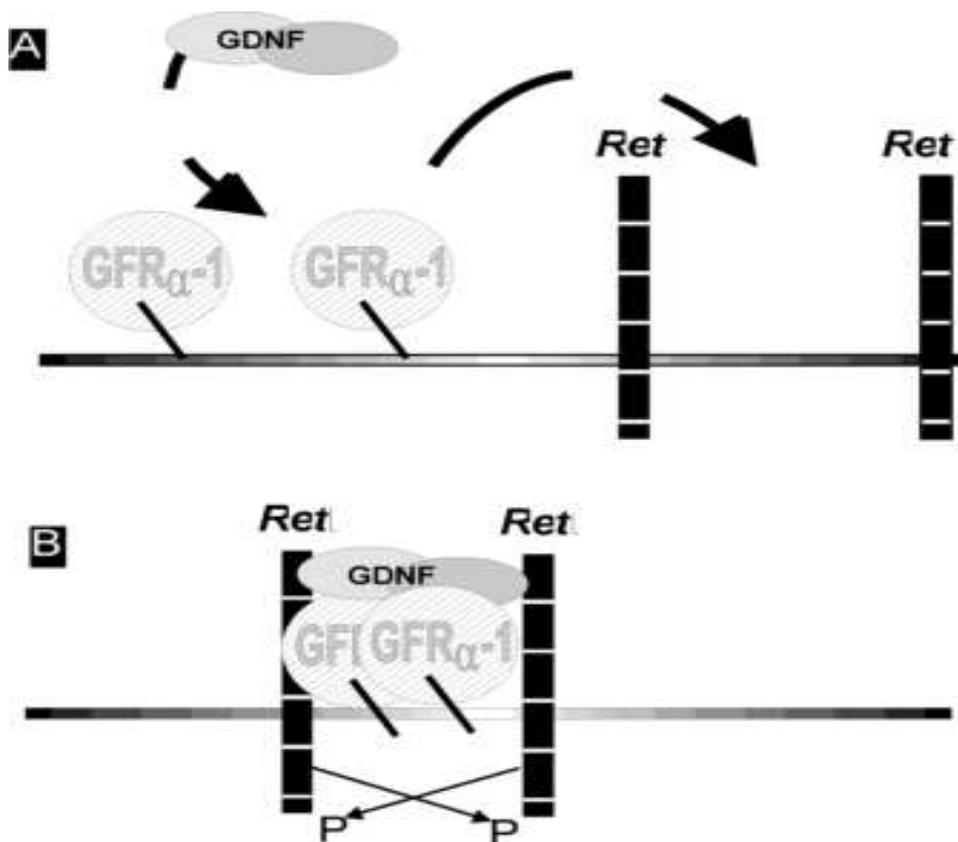


Figura 6. Meccanismo d'azione di GDNF e sua interazione con il recettore RET .

## 2.2 GDNF: contesto genomico

Il gene GDNF è mappato sul cromosoma 5 (area13.2p) e copre una regione cromosomica di 27kb (fig.7). La documentazione scientifica parla di una struttura relativamente semplice del GDNF, costituita da soli tre esoni. Ad oggi aggiornamenti dei vari database hanno portato a 5 il numero degli esoni.

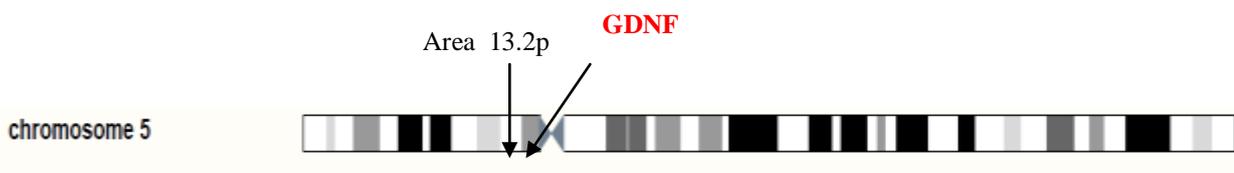


Figura 7. Localizzazione cromosomica di GDNF.

## 2.3 RET: contesto genomico

Per quanto riguarda il contesto genomico di RET, esso è mappato nel cromosoma 10 (area 11.21q). E' costituito da 20 esoni e copre una regione cromosomica di 53.28kb (fig.8).

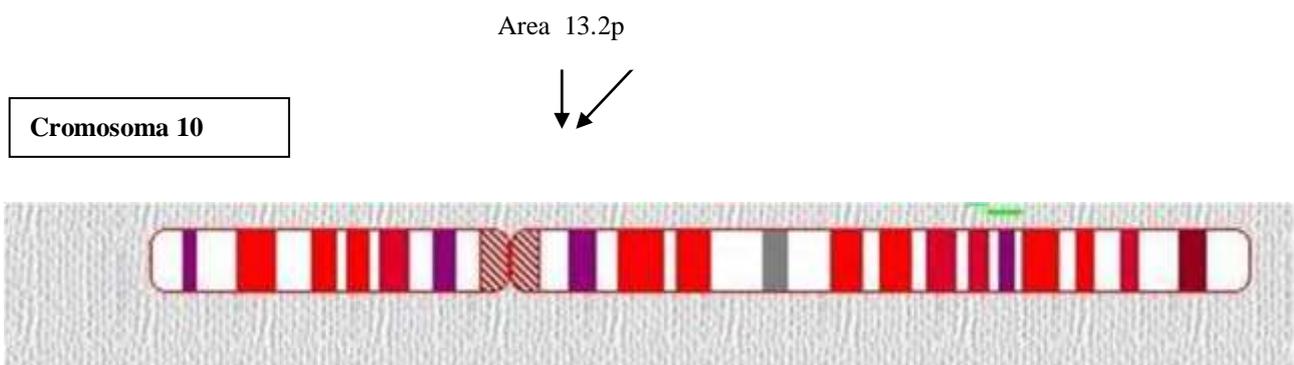


Figura 8. Localizzazione cromosomica di RET.

## **2.4 DETERMINAZIONE GENETICA DELLA NEFROGENESI: il network dei geni Pax/ Eya/ Six**

Lo sviluppo del rene serve come paradigma per comprendere il meccanismo sottostante alla formazione di un organo. Il primo segnale nello sviluppo del rene è l'interazione tra due tessuti derivati dal mesoderma intermedio, il mesenchima metanefrico e il dotto ureterale (o di Wolff). Molti dei geni che hanno un ruolo cruciale nello sviluppo renale come Pax 2, Eya1, Six1, Sall 1, Foxc1, Wt1 e Hox11 sono espressi nel mesenchima metanefrico e codificano per fattori di trascrizione che, fatte poche eccezioni, sono coinvolte nella regolazione del gene GDNF. Inoltre mutazioni in un certo numero di questi geni nell'uomo sono associate a malattie renali. Molti di questi geni che regolano lo sviluppo del rene e che si sono conservati in tutta l'evoluzione, sono anche coinvolti nella formazione degli occhi e dei muscoli nei mammiferi così come lo sviluppo degli occhi in *Drosophila*. Studi genetici e biochimici condotti in *Drosophila* e nel topo indicano che questi geni ed i loro rispettivi prodotti agiscono in un complesso network di interdipendenze e di feedback positivi e negativi. Lo sviluppo di un organo è particolarmente adatto per lo studio della funzione di un gene, dal momento che l'analisi delle conseguenze fenotipiche in relazione ad un disturbo dell'attività di un gene permette di analizzare quel gene in un determinato contesto. Lo sviluppo del rene metanefrico ha per diverse ragioni ricevuto molta attenzione. Primo, molti dei geni coinvolti nello sviluppo del rene sono conosciuti e molti di loro hanno generato topi transgenici e knockout. Secondo, da un punto di vista clinico le malattie renali sono un problema sanitario importante e molti dei regolatori dello sviluppo renale sono associate a malattie renali. Terzo, sebbene il rene sia un organo piuttosto complesso il suo sviluppo iniziale è abbastanza semplice. Due sono i tessuti principali che compongono il rene, il mesenchima metanefrico e l'epitelio ureterale che si

ramifica per formare il dotto ureterale o di Wolff. Dalla reciproca interazione tra questi due tessuti si forma il nefrone che è l'unità funzionale del rene (32).

### **2.5 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI GDNF**

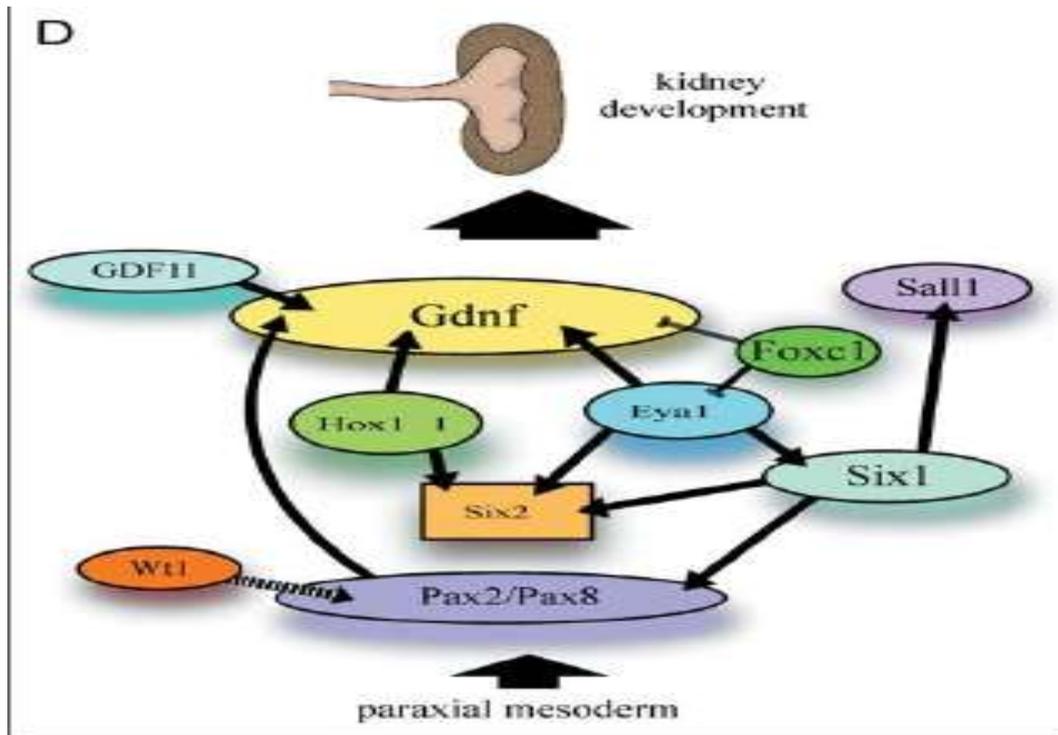
Esperimenti basati su geni knockout, hanno recentemente identificato dei fattori che regolano l'espressione di GDNF nel mesenchima renale. In tutti i casi, il fenotipo risultante per quanto riguarda lo sviluppo del metanefro è simile a quello degli animali in cui è nulla l'espressione di GDNF, in cui non si verifica l'iniziale interazione tra mesenchima metanefrogenico e dotto ureterale e le cellule mesenchimali vanno in apoptosi. Molti di questi regolatori sono fattori di trascrizione, sebbene la delezione di molecole segnale che codificano per geni come GDF11 (growth/differentiation factor 11) può anche risultare in una minore espressione di GDNF (33). L'importanza dei fattori di trascrizione in un corretto sviluppo renale è sottolineato dal fatto che mutazioni riscontrate nei rispettivi geni umani si associano a varie sindromi che comprendono tutte malformazioni renali.

Per esempio, una mutazioni nel fattore trascrizione Eya1, porta ad una sindrome branchio-oto-renale caratterizzata da anomalie cranio facciali, perdita dell'udito e difetti renali (34,35).

Topi Eya1 knockout mostrano una minore espressione di Gdnf (36). Tuttavia il fattore di trascrizione Eya1 da solo non può indurre la trascrizione ma ha bisogno di un membro della famiglia delle proteine Six per traslocare dal nucleo, per cui è improbabile che l'effetto di Eya1 su Gdnf sia diretto. Animali knockout per Eya1 mostrano anche una minore espressione di Six1 e Six2; su questa osservazione si potrebbe postulare una cascata Eya- Six- Gdnf nello sviluppo metanefrico. I geni Pax2 e Wt1 sono invece normalmente espressi nei reni mutati per Eya1, suggerendo che questi fattori agiscono o a monte o indipendentemente da Eya1. Data l'esistenza di una simile cascata in Drosophila, si è ipotizzato che anche nello sviluppo del rene adulto nei mammiferi vi sia un pathway regolatore Pax- Eya- Six. In topi knockout per Six1, che manifestano anch'essi "fallimento" nell'invasione

del dotto ureterale e successiva apoptosi del mesenchima, l'espressione di Pax2, Six2 e Sall 1 (Sall-like 1) è marcatamente ridotta mentre l'espressione di Eya1 è normale. Quest'osservazione potrebbe non essere sufficiente per invertire l'ordine del pathway regolatore Pax- Eya- Six ma è certamente punto che va nella stessa direzione dello sviluppo dell'occhio in *Drosophila*. L'idea di un pathway lineare e gerarchico è troppo semplicistico e si dovrebbe pensare a queste interazioni più in termini di un network di geni che interagiscono tra loro e di geni prodotti nei rispettivi tessuti competenti (fig.9).

In aggiunta a Eya/ Six, per GDNF sono stati identificati altri due regolatori. L'inattivazione di geni paraloghi Hoxa-11, Hoxc-11 e Hoxd-11 porta ad un arresto della differenziazione del mesenchima metanefrico e ad una minore espressione di Six2 e GDNF (37). L'espressione di Pax2, WT1 e Eya1 in questi animali è normale. In accordo al modello consistente con questi studi, le proteine Hox11 e Eya1 attivano nel mesenchima metanefrico l'espressione di Six2. Six2 a sua volta attiva GDNF sebbene la diretta evidenza di quest'attività non è ancora conosciuta. L'attivazione del complesso di GDNF può anche includere la proteina Pax2, dal momento che in animali knockout per Pax2 manca l'espressione di GDNF e Pax2 è stato recentemente indicato per attivare direttamente GDNF. Quindi secondo la conoscenza attuale, una combinazione delle proteine Pax2, Eya1, Six2 e Hox11 regola l'espressione di GDNF nel mesenchima metanefrico (metanefrogenico) (38).



**Figura 9. Network di fattori di trascrizione.** L'espressione localizzata di GDNF nel mesenchima metanefrico è assicurata da fattori di trascrizione attraverso dei meccanismi di regolazione positiva e negativa.

Ci sono degli organismi geneticamente modificati che mostrano per il rene lo stesso fenotipo simile a quello che si ha con l'inattivazione di GDNF o Eya1, sebbene possa essere osservata un'espressione di GDNF. Questo è il caso di Wt1, Sall1 e Six1. Tuttavia è stato dimostrato che lo sviluppo del rene è un processo che è veramente sensibile al dosaggio genico e animali eterozigoti per Eya1, GDNF e Six1 mostrano ipoplasia renale e agenesia unilaterale a vari gradi. E' quindi possibile che in animali knockout per WT1, Sall1 e Six1 vi sia un'espressione di GDNF ridotta in misura tale da non consentire lo sviluppo metanefrico. Non è ancora ben conosciuto se vi sono altri fattori assieme a GDNF, più o meno coinvolti nella regolazione della formazione della gemma ureterale. Tuttavia l'osservazione che molti di questi fattori di trascrizione con un ruolo in un corretto sviluppo renale regolano l'espressione di GDNF supporta il fondamentale ruolo di quest'ultimo nel mediare l'interazione tra il mesenchima metanefrico e il dotto ureterale (39).

## **2.6 RUOLO DI GDNF NEL RENE ADULTO**

Il ruolo di GDNF nello sviluppo renale è noto, poche sono le informazioni riguardo il rene adulto. Sappiamo che è espresso a bassi livelli nelle cellule tubulari (40), che si upregola nei reni displasici o cistici (41) e nei podociti glomerulari e nelle cellule mesangiali agisce come fattore autocrino di sopravvivenza. Tuttavia da alcuni articoli riportati in letteratura emerge che anche nel rene adulto GDNF possa avere un ruolo rilevante nell'ambito di alcune malattie renali. Interessante è quanto riportato dall'articolo di Tsui CC. del 2006 (42) che individua GDNF come un fattore adattativo di sopravvivenza per i podociti glomerulari nel processo della glomerulosclerosi. Recenti studi hanno identificato per i podociti glomerulari un importante ruolo nella patogenesi delle malattie proteinuriche. I podociti, cellule glomerulari epiteliali viscerali, sono cellule altamente differenziate e morfologicamente complesse che formano una barriera per impedire la perdita di proteine nel glomerulo. In risposta al danno i podociti secernono citochine, proteasi, ossidanti e proteine della matrice. Molti studi sperimentali e clinici puntano sull'importanza che la perdita dei podociti ha nello sviluppo e nella progressione della glomerulosclerosi a conferma di una relazione tra podocitemia (per apoptosi, distaccamento e mancata proliferazione) e proteinuria. Vien così da chiedersi se la progressione della glomerulosclerosi potrebbe essere ovviata prevenendo la perdita dei podociti nei glomeruli. Durante la situazione di danno c'è un processo di espressione genica, non ancora identificato, che determina se i podociti sopravvivono o vanno incontro ad apoptosi. E' stato postulato che in risposta al danno podocitario sono prodotti molti fattori di crescita che agiscono per impedire il danno podocitario. E ponendo una similarità tra i podociti e i neuroni è stato indagato se GDNF che è un fattore critico per lo sviluppo neuronale, possa rappresentare un fattore di sopravvivenza per i podociti danneggiati. Nel seguente lavoro sono stati fatti degli studi di espressione genica ed è stato visto che GDNF e il

suo recettore RET sono up-regolati durante il danno podocitario. L'up-regolazione di GDNF potrebbe indicare che esso faccia parte di un meccanismo di recupero adattativo al danno podocitario tuttavia ancora completamente sconosciuto. Questa osservazione potrebbe essere molto eccitante dal punto di vista della possibilità terapeutica poiché la somministrazione di GDNF in pazienti con malattie glomerulari (es. diabete, nefropatia membranosa e glomerulosclerosi focale) conduce alla prospettiva generale che fattori di crescita, come GDNF, possano guidare lo sviluppo renale ma anche avere un ruolo nei processi di rimodellamento nelle malattie adulte. Altro interessante articolo che evidenzia un ruolo di GDNF nel rene adulto è quello di Haikun Shi del 2007 (43) in cui gli autori dell'articolo si sono chiesti se GDNF in quanto fattore di crescita, possa essere indotto nel rene dopo stimoli lesivi, come nel caso di un'ischemia renale, e svolgere un ruolo renoprotettivo mediando l'espressione di nestina, recentemente proposta come un marker di cellule staminali mesenchimali. Esperimenti condotti su topi post-ischemici hanno confermato quanto ipotizzato e mostrato che nel danno d'ischemia l'espressione di GDNF è molto aumentata ed in maniera dose-dipendente è aumentata anche quella di nestina, con il risultato finale che i topi trattati con GDNF sono stati protetti dall'episodio ischemico. Il potenziale meccanismo della renoprotezione osservata e in vitro studiata, ha mostrato che GDNF ha accelerato la migrazione di cellule staminali mesenchimali nelle "zone del danno" e messo luce sul possibile contributo, con potenzialità terapeutiche, di GDNF sulla motilità e migliorata sopravvivenza delle cellule staminali mesenchimali (MSC) nel fenomeno reno-protettivo. Ultimo articolo che riporto è quello di Crazzolaro del 2000 (44). Diversi studi hanno dimostrato in molti modelli sperimentali umani e non, che il TGF $\beta$  ha un ruolo importante nella patogenesi di quelle malattie glomerulari caratterizzate da un'eccessiva deposizione di matrice extracellulare (mesangiale). L'osservazione di questo articolo è che incrementati livelli di GDNF plasmatici sono riportati in pazienti con malattie croniche renali come la nefropatia diabetica,

nefrosclerosi e la glomerulonefrite cronica. Si è pertanto ipotizzato che GDNF potesse avere un ruolo di crescita per le cellule mesangiali (HMC) e che potesse avere un coinvolgimento nella patogenesi della glomerulosclerosi così come è stato documentato per altri membri della superfamiglia del TGF $\beta$ . Gli esperimenti sono stati ottenuti dall'isolamento di glomeruli e dalla messa in coltura di cellule mesangiali umane ed è stato visto che sia GDNF sia i suoi recettori sono espressi nel rene adulto e nelle HMC. Ciò è a conferma del ruolo che GDNF ricopre non soltanto nel processo di nefrogenesi ma anche nella fisiologia/parafisiologia renale. Le cellule HMC sono state utilizzate come surrogato per lo sviluppo della glomerulosclerosi e gli autori dell'articolo hanno studiato gli effetti di GDNF sulla crescita delle HMC; la sintesi delle proteine cellulari come indice di ipertrofia (mediante l'incorporazione di  $H^3$  metionina); la sintesi di DNA (mediante l'incorporazione di  $H^3$  timidina); la proliferazione cellulare come indice di iperplasia; la sintesi di matrice extracellulare (mediante l'incorporazione di  $H^3$  prolina). È stato pertanto osservato che GDNF ha un effetto stimolatorio sulla HMC e induce un comportamento di crescita bifasica con una maggiore stimolazione a basse concentrazioni ma non ha effetti ad alte concentrazioni. La sintesi delle proteine cellulari e della matrice extracellulare è incrementata in maniera significativa e dose dipendente dal GDNF. Questi risultati suggeriscono che GDNF come gli altri membri della superfamiglia TGF $\beta$  potrebbe avere un ruolo come fattore di crescita per le cellule mesangiali e potrebbe rappresentare un fattore patogenetico per la glomerulosclerosi.

## **2.7 SIX1, SPRY1 E PAX2**

### **2.7.1 SIX1**

La famiglia delle proteine Sine Oculis Homeobox (SIX) è un gruppo di fattori di trascrizione di 6 membri (SIX 1-6), altamente conservati che sono state scoperte in molti organismi dai plattelmiti all'uomo. Questi fattori svolgono un ruolo importante nella formazione di vari organi quali: testa, retina, orecchio, naso, cervello, rene, muscoli e gonadi. Mutazioni per questi geni hanno diverse conseguenze sullo sviluppo di organi e tessuti (45). Le proteine SIX sono caratterizzate da due porzioni che si sono conservate nel corso dell'evoluzione: una regione homeodomain (homeobox nucleic acid recognition domain HD) per il riconoscimento e legame del DNA e una regione domain per l'interazione proteina-proteina. In generale le regioni HDs sono caratterizzate da 60 amminoacidi contenenti un motivo elica-giro-elica (helix-turn-helix HTH) e classificate in maniera diversa in base al loro riassetto. Adiacentemente alla regione HD vi è la regione SIX domain costituita da 146 amminoacidi e particolarmente critica nell'interazione proteina-proteina (46). Per quanto riguarda il loro meccanismo d'azione i membri della famiglia SIX, a seconda dei diversi complessi formati sono attivatori o regolatori della trascrizione genica. Per esempio nel legame con EYA sono attivatori mentre nel legame con DACH o GRO sono down-regolatori dell'espressione di alcuni geni target.

SIX1 in particolare è importante per lo sviluppo del rene, timo, orecchio interno, naso, ghiandole lacrimali e salivari.

E' fortemente espresso durante la nefrogenesi dove sembra avere un ruolo chiave nella proliferazione, migrazione e sopravvivenza cellulare. Sono poche le conoscenze sull'espressione di questo gene nei vari tessuti differenziati, anche se in alcuni tessuti dell'uomo adulto sembra essere silenziato.

Il gene SIX1 è localizzato sul cromosoma 14q23.1. E' composto da due esoni rispettivamente di 853 bp e 567 bp, separati da un singolo introne di 2000 bp circa.

L'esone 1 codifica per i due domini funzionali del gene, l'omeodominio (HD) e il dominio Six specifico (SD). L'esone 2 codifica per l'estremità C-terminale della proteina e comprende una lunga sequenza che specifica il 3'UTR. Nel database RefSeq di NCBI è riportato un solo trascritto (NM\_005982) del gene SIX1 nell'uomo. Il trascritto NM\_005982 traduce per una proteina nucleare dal peso molecolare di 32210 Dalton, di 284 aminoacidi e che appartiene alla categoria delle fosfoproteine. Questa proteina contiene i due domini tipici della famiglia Six: all'estremità N-terminale è presente un dominio Six-specifico (SD) di 115 aminoacidi, essenziale per mediare l'interazione proteina-proteina di SIX1 con i cofattori. Adiacente all'SD si trova un omeodominio (HD) che lega specificatamente il DNA, attivando la trascrizione dei geni target.

La proteina SIX1 può quindi agire da attivatore o da repressore della trascrizione genica a seconda del diverso cofattore reclutato. Nell'uomo, per esempio può avere un effetto sinergico con i co-attivatori della famiglia EYA nell'attivare i propri geni bersaglio. La proteina SIX1 interagisce con le proteine EYA (coinvolte nella crescita cellulare e nel signalling) e ne induce la traslocazione dal citoplasma al nucleo, condizione necessaria affinché le proteine EYA possano svolgere la funzione di cofattori (47).

In particolare, durante la nefrogenesi la proteina SIX1, si lega alla proteina codificata dal gene EYA1 che è dotata di attività fosfataseica e insieme alla proteina SIX1 regola positivamente i geni target. L'attività inibitoria di SIX1 viene invece espressa mediante il legame con la proteina codificata dal gene DACH1. Questo gene, che codifica per un fattore di trascrizione, è omologo del gene *Drosophila melanogaster* dachshund (DAC) ed è fortemente espresso durante la nefrogenesi umana.

Il complesso SIX1-DACH1 costituisce una struttura che inibisce la trascrizione di diversi geni. Tuttavia se a questo complesso si lega la proteina EYA1, la proteina codificata dal gene SIX1 modifica la sua funzione da repressore ad attivatore della

trascrizione (48,49). Sembra che la proteina Six1 legni il promotore di GDNF in un complesso con Eya1, suggerendo un ruolo diretto di Six1 nella regolazione di trascrizione di Gdnf (50).

In topi knockout per Six1 l'espressione renale dei geni Pax2, Six2 e Sall1 nel mesenchima metanefrico appare notevolmente ridotta, indicando che la loro regolazione dipende da Six1. L'espressione di Eya1 non appare invece modificata in quanto, probabilmente, Six1 non agisce direttamente sulla sua trascrizione, ma è necessario per traslocare la proteina Eya1 dal citoplasma al nucleo ove può svolgere la sua funzione trascrizionale. Eya1 è infatti un cofattore trascrizionale sia per Six1, sia per Pax2. Infatti nel complesso Eya1-Six1, Eya1 attiva la trascrizione di Pax2, mentre nel complesso Eya1-Pax2 attiva la trascrizione di Six2 e Gdnf. Possiamo quindi concludere dicendo che l'azione sinergica delle proteine codificate dai geni Six1, Eya1 e Pax2 porta all'up-regolazione di GDNF. I topi mutanti per Six1 mostrano un fenotipo molto simile ai topi mutanti per Eya1, indicando che questi due geni agiscono, probabilmente, in maniera ridondante per attivare l'espressione di Pax2/8, Six2, Sall1 e GDNF (51).

### **2.7.2 SPRY1**

Sprouty1 (Spry1) è una proteina che è stata originariamente descritta come una delle principali antagoniste del signalling di FGF (Fibroblast Growth Factor) durante il processo di formazione della trachea e dell'occhio in *Drosophila*. Studi successivi in vitro ed in vivo in animali hanno poi dimostrato che Spry1 agisce come modulatore della cascata di trasduzione del segnale di altri fattori di crescita come EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Plastrine Derived Growth Factor) o GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) (52).

Uno dei pathway cruciali nella regolazione della proliferazione, del differenziamento e della migrazione cellulare è la via delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), attivata dal legame tra un fattore di crescita ed un recettore tirosin chinasi (RTK). Ad oggi rimane tuttavia controverso l'esatto meccanismo di azione di Spry1 sulla via di attivazione della via delle ERK (extracellular signal-regulated kinase)/MAPK. Si pensa infatti, vi siano per Spry1 diversi meccanismi molecolari che dipenderebbero dal contesto cellulare e/o dal tipo di RTK (recettore tirosin chinasi) al quale si lega il fattore di crescita. Il gene SPRY1 sembra essere coinvolto anche nel processo di branching ureterale. E' ormai ben documentato, l'importante ruolo svolto da GDNF nel processo di organogenesi renale, che risulta attivo già dalle prime fasi fino alla terminazione dell'intero processo (53,54). La chemochina neurotrofica GDNF prodotta dal blastema metanefrico attraverso dei segnali induttivi prodotti promuove la gemmazione e la ramificazione della bozza ureterale attraverso l'interazione con i suoi rispettivi recettore-co-recettore sono cRET e GFR $\alpha$ -1. L'espressione di GDNF è fortemente regolata nel tempo e nello spazio per tutto il processo di organogenesi renale (55,56).

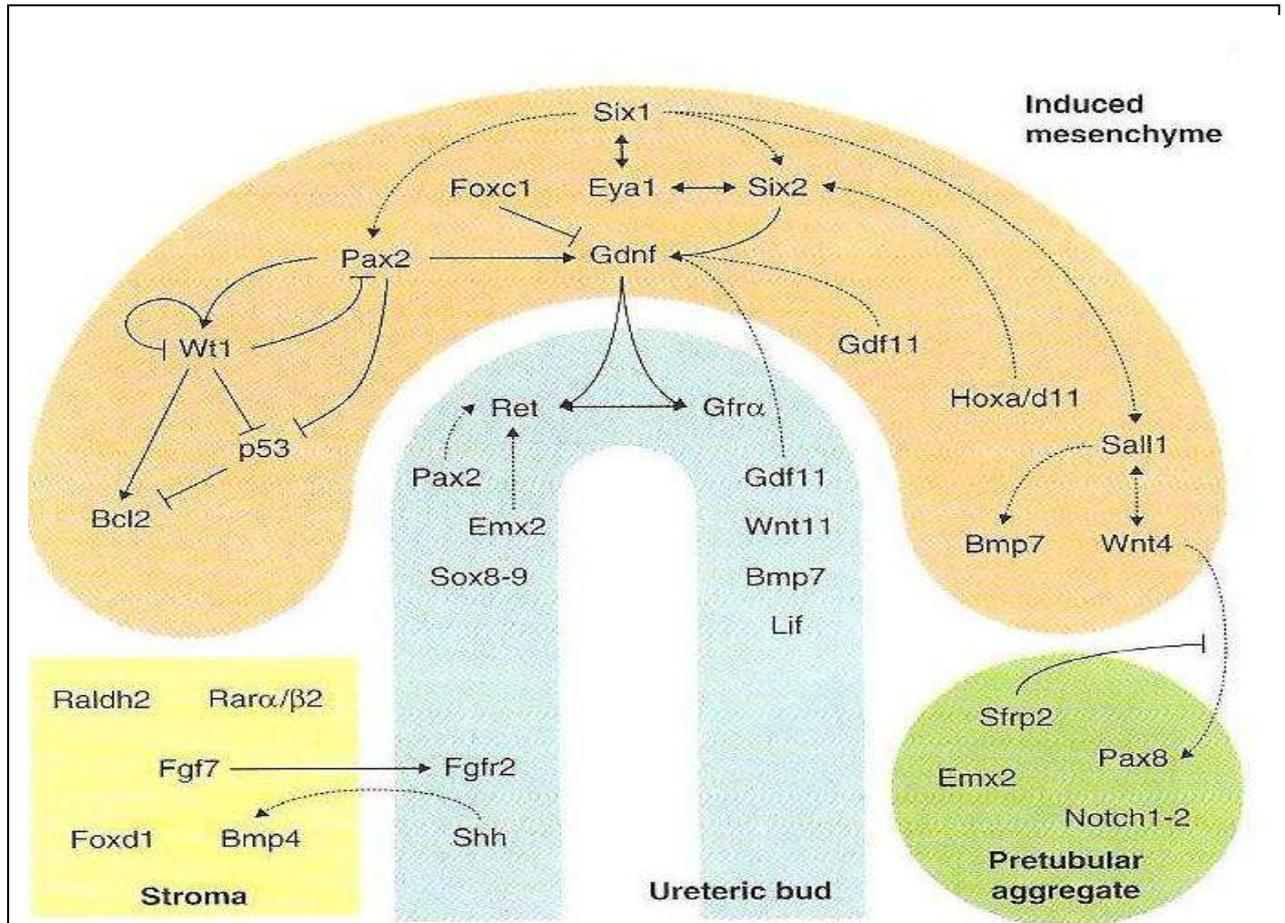
L'espressione di GDNF è fortemente regolata nel tempo e nello spazio per tutto il processo di organogenesi renale. Recenti studi su modelli murini, hanno dimostrato

che la proteina Sprouty1, codificata dal gene Spry1, agisce da critico regolatore del segnale di GDNF/RET poiché inibisce la responsività del dotto di Wolff a tale segnale ed assicura così, la formazione di un'unica gemma ureterale. Più precisamente la funzione di Spry 1 è quella di modulare il segnale GDNF/RET nel dotto di Wolff e di assicurare che l'induzione del rene sia ristretta ad un unico sito. E' importante in questo senso il feedback che esso esercita sul recettore tirosin chinasi durante l'induzione della gemma ureterale (o dotto di Wolff). Difetti nel controllo di questo feedback sono alla base di malformazioni renali che risultano nella formazione di dotti ureterali soprannumerari, nello sviluppo di ureteri e reni multipli (57,58).

Queste gemme ureterali contengono elevati livelli di proteine ERK-MAPK fosforilate, indicando che il pathway Ras-ERK MAPK è iperattivo anche se non vi sono evidenti prove evidenti che tale iperattività sia responsabile del fenotipo.

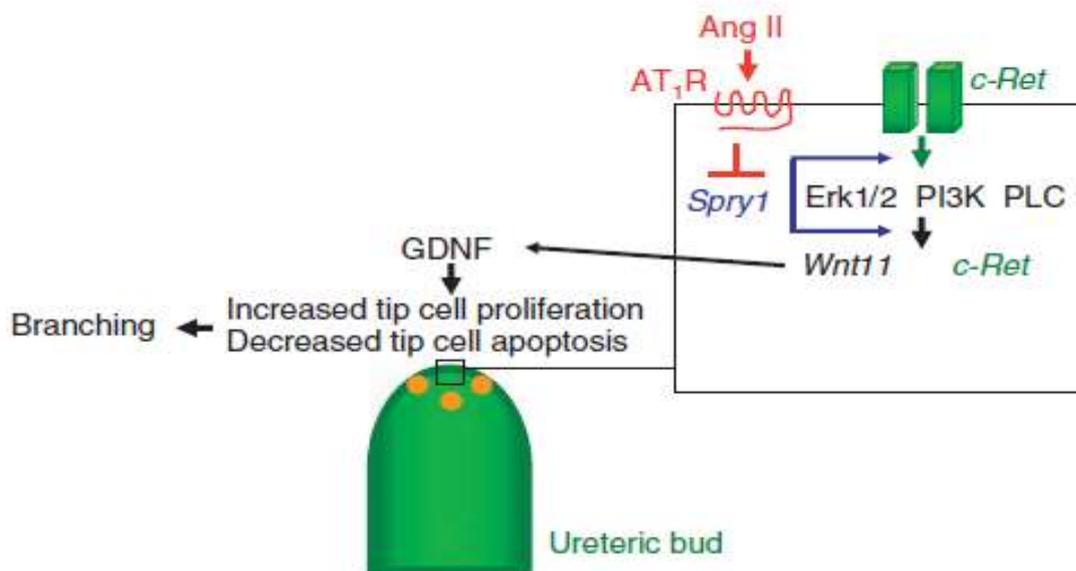
Sulla base di questi studi e dell'elevata omologia di sequenza con il gene murino, è stato ipotizzato che SPRY1 sia coinvolto, anche nell'uomo, nella determinazione di malattie da alterato sviluppo renale e delle vie urinarie.

Ricapitolando il pathway per questo meccanismo di regolazione positiva della ramificazione del dotto ureterale è GDNF/c-RET/Wnt11. GDNF rilasciato dal mesenchima metanefrico interagisce con il dotto ureterale per indurre la ramificazione. L'incontrollata attivazione del pathway è prevenuta da Sprouty (Spry1) che agisce come un inibitore intracellulare del recettore tirosin chinasi (fig.10). L'inattivazione genetica di Spry1 nel topo porta alla formazione di dotti ureterali ectopici al dotto di Wolff, all'incrementato numero di dotti ureterali e all'aumentata espressione di GDNF/c-RET e Wnt11.



**Figura.10. Schematica raffigurazione dei fattori di trascrizione e dei pathways di segnale coinvolti nel cross-talk molecolare tra i quattro compartimenti cellulari nel metanefro. SIX1 ha effetto sinergico con i co-attivatori della famiglia Eya nel regolare positivamente l'espressione di GDNF. Pax2 agisce sinergicamente a Six ed Eya nell'up-regolare GDNF. Spry1 esercita invece una down-regolazione attraverso il pathways GDNF/ cRET /Wnt11.**

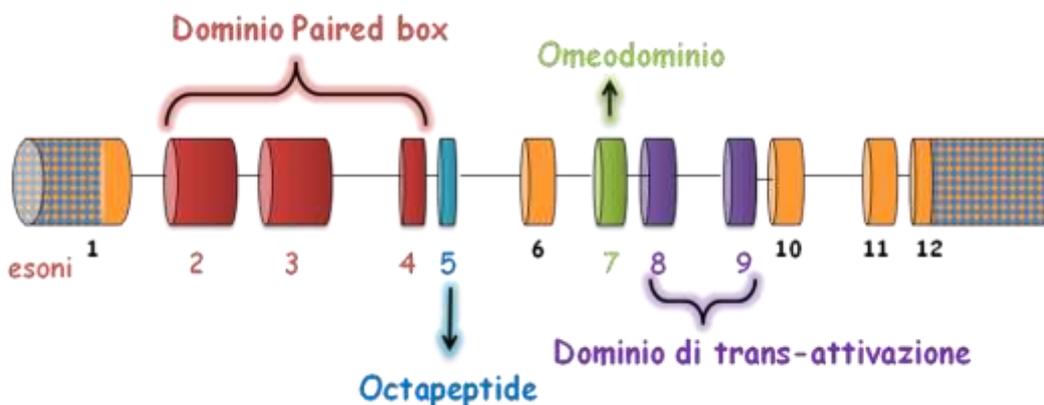
In un modello proposto da Yosypiv del 2008 (fig.11) ad essere coinvolta in tutto questo vi è anche l'azione dell'Angiotensina II che attraverso la via  $AT_1$  inibisce l'espressione di Spry1 con conseguente upregolazione di c-RET e Wnt-11. L'aumentata espressione di Wnt-11 induce l'espressione di GDNF nell'adiacente mesenchima e un'aumentata proliferazione cellulare all'apice del dotto ureterale. Viceversa l'inibizione del segnale  $AT_1R$  induce apoptosi sulle cellule che stanno sull'apice del dotto ureterale (59).



**Figura 11: Modello di induzione ureterale.** E' un modello di induzione ureterale proposto da Yosypiv (2008) in cui è coinvolta l' Angiotensina II .

### 2.7.3 PAX2

Un altro gene coinvolto nel processo di formazione del rene è Pax2 che nell'uomo è localizzato sul cromosoma 10q24-25 e codifica per l'omonimo fattore di trascrizione, appartenente alla famiglia di geni omeotici paired-box. Il gene Pax2 è costituito da 12 esoni che, conseguentemente a splicing alternativo, danno luogo a diverse isoforme di trascritti. Nei database ne sono riportate almeno 5, identificate come: **a**, **b**, **c**, **d**, **e**. L'isoforma **e** identifica il trascritto più lungo, infatti contiene tutti gli esoni tranne il 10. In generale, sia nell'uomo che nel topo, sono gli esoni 6 e 10 i più coinvolti nello splicing alternativo. Nell'animale modello *Xenopus leavis* sono stati identificati un maggior numero di splicing alternativi rispetto ai mammiferi. Sembra però che in questo animale la proteina Pax2 svolga funzioni che nelle altre specie sono deputate a Pax8. L'esatta funzione dei trascritti alternativi di Pax2 non è chiara (60).



**Figura 12. Struttura del gene PAX2.** Le regioni UTR sono rappresentate con colori a scacchi.

Nel gene PAX2 umano gli esoni 2, 3 e 4 codificano per il dominio altamente conservato paired box, l'esone 5 codifica per l'altro dominio altamente conservato, l'octapeptide, l'esone 7 invece per l'omeodominio ed infine esoni 8 e 9 per un dominio di trans-attivazione (fig.12).

Nell'uomo PAX2 è abbondantemente espresso durante lo sviluppo embrionale dell'occhio, orecchio, sistema nervoso centrale e tratto urogenitale. E' inoltre coinvolto nella regolazione di diversi geni come WT1, N-myc e p53, che sono up o down regolati in diverse forme tumorali (61).

Il ruolo di questo gene nello sviluppo di questi organi e/o tessuti, è molto critico ed è stato scoperto attraverso lo studio di topi knock-out per Pax2 murino che hanno evidenziato che delezioni in omozigosi per Pax2 portano a precoce morte post-natale del topo, per assenza di reni, ureteri e occhi (62).

Per quanto riguarda lo sviluppo renale, Pax2 gioca un ruolo fondamentale nei primi stadi di formazione del metanefro, con una forte espressione nel dotto di Wolff poiché anch'esso coinvolto nell'induzione e ramificazione della bozza ureterale. L'espressione di Pax2 nei reni adulti è molto ridotta rispetto ai reni fetali. Esso è principalmente espresso nel mesonefro ma la sua espressione si attenua via via a livello dello stadio S-shaped del metanefro cioè prima che i nefroni si siano completamente formati (63).

### **3.SCOPO**

Lo studio sul Rene con Midollare a Spugna (MSK) è stato condotto allo scopo di approfondire la genetica molecolare, l'epidemiologia e la patogenesi di questa patologia.

Vari elementi suggerivano che per MSK potesse esserci una componente genetica ma mai prima dell'interesse posto dal mio gruppo di ricerca era stato condotto uno studio genetico su questa patologia malformativa. La strategia con cui si è voluti procedere per indagare 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 stata quella del gene candidato. Dall'ipotesi che MSK abbia origine da una disregolazione della nefrogenesi, la scelta del gene candidato è caduta su GDNF e RET.

Su una prima casistica veneta ben selezionata di 55 pazienti, non imparentati tra loro, con nefrolitiasi e MSK bilaterale sporadico diagnosticato secondo stretti criteri urografici, sono stati analizzati i geni GDNF e RET in studi di associazione caso controllo. I risultati ottenuti che sono stati oggetto anche di una pubblicazione (64) hanno evidenziato che varianti rare di GDNF, mai precedentemente descritte e polimorfismi noti del gene RET sono significativamente associati a MSK, suggerendo che, almeno in un sottogruppo di pazienti, essi da soli o in sinergia potevano aver contribuito in maniera determinante alla patogenesi della malattia.

Uno degli obiettivi specifici del presente studio è stato quello di aumentare il numero dei casi MSK per confermare l'associazione trovata con le varianti rare di GDNF che ci sembravano avere caratteristiche di disease-causing mutations, almeno in un sottogruppo di pazienti, vista la loro rarità nella popolazione generale, il loro effetto fondatore, il loro significato funzionale predetto da analisi in silico e in

studi di espressione su tessuto renale e vista la loro segregazione con la malattia in 5 casi famigliari .

Un altro obiettivo dello presente studio, diretta conseguenza dei risultati ottenuti in quello precedente, è stato quello di indagare se i casi famigliari di MSK siano più frequenti del previsto e se in questi casi fossero più frequenti alterazioni di sequenza del gene GDNF o fossero presenti alterazioni ai geni Six1, Spry1 e Pax2, geni coinvolti nel processo di morfogenesi renale e con un ruolo rilevante nella regolazione di GDNF.

L'aver individuato delle varianti rare di GDNF associate in maniera quasi causativa alla malattia di MSK ci poneva di fronte la necessità di andare anche a valutare l'impatto che queste varianti avrebbero potuto avere sul gene e quindi ad approfondire il loro significato funzionale. Per una delle varianti rare di GDNF abbiamo avuto modo di osservare in cellule papillari provenienti da biopsia chirurgica di una donna con MSK e mutazione GDNF un fenomeno inaspettato di produzione di matrice ossea con assunzione da parte delle cellule di un fenotipo osteoblasto simile. Per questo motivo, l'ultimo obiettivo specifico del presente studio è stato quello di verificare in un sistema cellulare controllato se la down regolazione di GDNF in cellule renali possa essere causa o concausa di un processo di calcificazione come quello osservato in MSK. A questo fine abbiamo operato un silenziamento stabile di GDNF in cellule epiteliali renali (HK2) e abbiamo sottoposto le cellule ad induzione osteogenica. I risultati seppur preliminari verranno riportati.

## **4. Materiali e Metodi**

### **4.1 PAZIENTI MSK**

La casistica dello studio ha compreso un gruppo di 112 pazienti non imparentati tra 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 (65). 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 emi-ipertrofia somatica.

### **4.2 POPOLAZIONI DI CONTROLLO**

Sono stati utilizzati due tipi di popolazione di controllo per gli studi di frequenza e di associazione caso/controllo:

1. 125 campioni di sangue ricavato da cordone ombelicale da neonati consecutivi nati presso l'azienda Ospedaliera di Padova.
2. 85 campioni di sangue prelevato da pazienti adulti con nefrolitiasi calcica idiopatica non affetti da MSK.

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

### **4.3 ANALISI DI MUTAZIONE**

#### **4.3.1 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO**

Il DNA di ciascun paziente mediante il QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) è stato estratto da leucociti del sangue periferico seguendo il protocollo standard fornito dalla ditta. Purificato da proteine, nucleasi e altri contaminanti o inibitori il DNA è stato eluito in un buffer opportuno, quantificato al 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 µl. La miscela di reazione era costituita da: MgCl<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1mM o 1.5 mM a seconda della coppia di primers utilizzata, primers forward e reverse (Primm, Milano, Italia) 0.4 mM, dNTPs (Boehringer, Mannheim, Germania) 0.2 mM, JumpStart Taq DNA Polimerasi (Sigma) 0.04 U/ml, in un buffer (Sigma) 1X di KCl 50mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3). Per aumentare specificità ed efficienza della reazione di PCR è stata utilizzata la procedura 'hot start', per far 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 profilo di amplificazione era il seguente:

**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 45sec
	72 °C per 1 minuto

**3. Estensione finale**

- a. 72 °C per 7 minuti

**4. Rapida escursione termica a 4 °C**

### 4.3.2 PRIMERS GDNF

Le sequenze dei primers di GDNF che sono stati utilizzati nelle reazioni di PCR sono stati ordinati presso la PRIMM (Milano, Italia) e sono elencati nella tabella 1 assieme alle rispettive condizioni di amplificazione e alle dimensioni dell'amplicone.

Esone	Primer 5' → 3'	MgCl <sub>2</sub> (mM )	T annealing (°C)	N° cicli	Amplicone (bp)
1	<b>Fw</b> CAGCCCTCGCCCTGTTGG <b>Rw</b> CACCCGCTCCCTGCTCCC	1	66	36	257
2	<b>FW</b> GAGAAGCCAAACAGAGCC <b>Rw</b> TTCCCAAAGCACTGATTCCG	1.5	60	33	405
3	<b>Fw</b> ACTTTAAGAGGTGGGAGGAG <b>Rw</b> CAACCGGGCTTCTGGCTAGTC	1	58	36	219
4	<b>Fw</b> GTGCATTCTGCGGTTCTCTCC <b>Rw</b> GGGCTGGCTGCGGGTGGG	1	68	36	292
5.1	<b>Fw</b> CGGCTGATAGTTTTGCTGTGGG <b>Rw</b> CAGTTCCTCCTTGGTTTCATAGCC	1	60	30	390
5.2	<b>Fw</b> GGGTTGTGTCTTAACTGCAATAC <b>Rw</b> CGCCTCCTTGGTCCTCATCTT	1.5	60	30	399

**Tabella 1. Primers GDNF.** 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 mM) rispetto alle condizioni generali di amplificazione descritte.

#### 4.3.3 PRIMERS PER STUDIO DI: SIX1, Spry1 e Pax2

L'analisi mutazionale del gene SIX1 è stata eseguita, mediante sequenziamento diretto delle regioni codificanti ed introniche adiacenti.

	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	bps
Es 1.1	TTTGCAAAGCCTAAGGAGGA	CTCTCGTTCTTGTGCAGGTG	268
Es 1.2	GCCGTCGTTTGGCTTTAC	CTTCTCGGCCTCCACGTAAT	280
Es 1.3	GAGGAGAAAGGACGGCTTC	GCCTTGCTGCAGAACCTC	396
Es 2.1	GCCCTTTCCTCCTCCAG	AGCCCGGGAGAGAATAGTTT	300
Es 2.2	GGAATTCTCACCTCCCAAA	CGCAAACAACCTCCAGAAACA	320

**Tabella 2. Primers SIX1**

SEQUENZA UTR		
ESONE 1	Forward : 5' CGG AGG CGT GTC CT 3' Reverse : 5' CTT AGC TGG AAA GCA AGT TC 3'	300 bp
ESONE 2	Forward : 5' CCA CAG AGA GAG GGA GAA AGA AC 3' Reverse : 5' GCG CTC GGC ACA CTG 3'	401 bp
SEQUENZA CODIFICANTE (parte dell'esone3)		
SET1	Forward : 5' GAG GTC ATT ACT AGG CGG T 3' Reverse : 5' GAT CTG GTC TAA GGA CAA AAT A 3'	301 bp
SET2	Forward : 5' TTG TGA TCC AGC AGC C 3' Reverse : 5' GAT CTG CTC AAA ATG GG 3'	301 bp
SET3	Forward : 5' ATA ATA ACT ACG AGC ACA GAC ACA C 3' Reverse : 5' TTC CCA CAC TGT TCA CAA A 3'	301 bp
SET4	Forward : 5' TGA TTG TGG ATG ACT TGA 3' Reverse : 5' AGG TAT CTA GAG CAG CAG TG 3'	292 bp
SET5	Forward : 5' GCT CCA ATG ACG ACG AAG G 3' Reverse : 5' AGG AGG TAC AAC CCA CCT CC 3'	291 bp
SET6	Forward : 5' GCA GAT GTA AGA ACT CCA ACA CT 3' Reverse : 5' GTG CAG CTT CCC AGT CC 3'	274 bp

**Tabella 3. Primers SPRY1**

Si sono ottenuti 12 frammenti da amplificare mediante PCR , che sono stati utilizzati sia per l'analisi in HRM, sia per il sequenziamento.

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

**Tabella 4. Primers PAX2**

#### **4.3.4 PURIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL DNA AMPLIFICATO**

L'avvenuta reazione di amplificazione del DNA è stata verificata mediante Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) che è la simulazione di un'elettroforesi capillare. Il sistema Agilent, per l'analisi di campioni biologici utilizza la tecnologia microfluidica per mezzo di un chip miniaturizzato in vetro che contiene dei pozzetti interconnessi da una rete di canali. 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). Dopo valutazione in Agilent l'amplificato è stato purificato da primers, nucleotidi, polimerasi e sali mediante 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 dei prodotti di amplificazione aspecifici, per isolare il frammento di DNA specifico è stata condotta una corsa elettroforetica in gel di agarosio (3%) e buffer TBE 1X (90 mM Tris-borato, 0.2 mM EDTA; pH 8) ad un voltaggio di 100 V. Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il FX-174 digerito con l'enzima Hae III (frammenti da 72 a 1353 bp). Il prodotto ottenuto era visualizzato al trans illuminatore mediante un intercalante fluorescente che si lega al DNA (Green Loading Buffer ed Orange Loading Buffer – Jena Bioscience). Il DNA isolato dal gel è stato purificato seguendo il protocollo del MinElute™ Gel Extraction Kit (QIAGEN), che utilizza la stessa procedura a tre step descritta sopra. Il DNA purificato da gel è stato poi riquantificato in Agilent 2100 Bioanalyzer. Per l'allestimento della reazione di sequenziamento dei prodotti PCR ed è stata utilizzata una concentrazione di DNA di 6 ng/3µl.

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 20µl, che includeva 3µl di templatato DNA, 1µl 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 CENTRISEP™ 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'eluito 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/>)(66).

#### **4.4 ANALISI IN RFLP**

Le sostituzioni nucleotidiche puntiformi rilevate nello studio di sequenza sono state analizzate mediante restrizione enzimatica dei prodotti PCR opportuni (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP).

Gli enzimi di restrizione sono delle endonucleasi, che prendono il nome dai batteri dai quali vengono ricavati. Essi 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. 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 AVal (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 in Agilent 2100 Bioanalyzer. 5  $\mu$ l della reazione sono stati poi aggiunti ad una miscela contenente 1U di enzima, buffer 1X (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ditioeritritolo, a seconda dell'enzima utilizzato) e acqua q.b. per un volume finale totale di 15  $\mu$ l. Mnll 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  $\mu$ l del marcatore di peso molecolare FX-174 digerito con l'enzima Hae III, 2  $\mu$ l della reazione PCR non digerita addizionati di 2  $\mu$ l di loading buffer (0.25% BB, 0.25% XC, 30% glicerolo in H<sub>2</sub>O) e 3  $\mu$ l di acqua, 10  $\mu$ l della miscela di digestione enzimatica addizionati di 4  $\mu$ l 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.

Sequenza di riconoscimento di AVAI:

5'...CPyCGPu**G**...3' → 1 taglio, a 158 pb dal 5' dell'amplicone  
3'...GPuGCPyC...5'

Sequenza di riconoscimento di MnlI:

5'...C**CTC**... 3' → 2 tagli, a 128 pb e 172 pb dal 5' dell'amplicone  
3'...GGAG...5'

Sequenza di riconoscimento di BlnI:

5'...CCT**AGG**...3' → 1 taglio, a 192 pb dal 5' dell'amplicone  
3'...GGATCC...5'

**Figura13 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.

#### **4.4.1 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.(67) che sfrutta la precipitazione degli ioni  $\text{Ag}^{++}$  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  $\text{HNO}_3$  all'1%, il gel è stato lavato in acqua deionizzata e trasferito in una soluzione impregnante costituita da  $\text{AgNO}_3$  12 mM per 20 minuti. Dopo un breve risciacquo in acqua deionizzata per rimuovere l'eccesso di argento dalla superficie, il gel è stato immerso nella soluzione di sviluppo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  280 mM addizionato di formaldeide 0.019%). All'apparire delle prime bande, il gel è stato 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 sono stati eseguiti mantenendo il gel in agitazione. Dopo risciacquo in acqua deionizzata, il gel è stato posto in glicerolo al 10% per almeno 24 ore a 4°C e poi lasciato ad essiccare.

#### **4.4.2 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, 4µl del DNA digerito sono stati utilizzati in una seconda miscela di reazione, sempre di 15 µl totali, che conteneva l'enzima MnlI. La digestione (13µl addizionati di 5µl di loading buffer) è stata poi caricata in gel di poliacrilamide e visualizzata mediante colorazione in argento come indicato nei paragrafi precedenti. Previo studio dell'esatto pattern di restrizione 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.

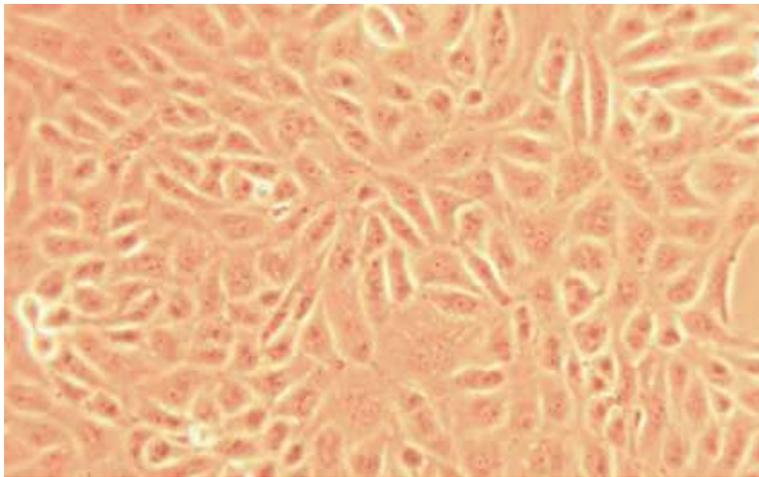
#### **4.5 ANALISI STATISTICA DEI DATI**

E' stato utilizzato il test chi-quadrato per confrontare la distribuzione delle diverse varianti di sequenza identificate nel gene GDNF, SPRY e PAX2 tra gli individui affetti e il gruppo rappresentativo di controllo. Il livello di significatività considerato nella procedura statistica era del 5% ( $p < 0.05$ ).

## **4.6 STUDIO FUNZIONALE DI GDNF**

### **4.6.1 COLTURE CELLULARI DI HK2**

Per lo studio funzionale di GDNF sono state utilizzate delle linee cellulari di HK2 (Human Kidney 2)(fig.14). La linea cellulare HK2 è una linea immortalizzata di cellule epiteliali del tubulo prossimale ottenuta dalla trasfezione dei geni E6/E7 di HPV16. Le cellule HK2 mostrano il fenotipo di cellule epiteliali del tubulo prossimale differenziate in quanto sono positive per l'espressione di fosfatasi alcalina, gamma glutamiltranspeptidasi, leucina-aminopeptidasi, fosfatasi acida, citocheratina , alfa 3 beta 1 integrina, fibronectina (Ryan et al. 1994). Le cellule sono coltivate in DMEM-F12 (EuroClone, Pavia, Italy)(17.5mM glucosio) con 10% di siero fetale bovino (Sigma, Aldrich, Milano), 2 mM L-glutamina, penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml). Le cellule sono mantenute in incubatore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> e 95% di umidità.



**Figura 14 Immagine al microscopio ottico delle cellule HK2**

#### 4.6.2 TRASFEZIONE DI PLASMIDI *shRNA* PER *GNF*

L'*RNA interference* (dall'inglese *interferenza dell'RNA*, abbreviata comunemente come **RNAi**) è un meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA a doppio filamento sono in grado di interferire (e *spegnere*) l'espressione genica. L'utilizzo dell'inattivazione genica mediante RNA interference ha reso disponibile un approccio alternativo e conveniente per studiare la funzione di uno specifico gene.

##### Processo Molecolare

La RNAi è un processo specifico e potente portato avanti dalla cellula. Sebbene non tutti i dettagli del processo stesso siano ancora chiari, sembra che il cosiddetto *macchinario dell'RNAi*, una volta individuata una molecola di RNA a doppio filamento (dsRNA), sia in grado di avviare il meccanismo della RNAi:

1. Attraverso un enzima (chiamato *Dicer*), la sequenza di dsRNA è tagliata in frammenti di lunghezza minore (19-21 paia di basi) che mostrano ad ogni estremità due basi aggiuntive non appaiate.
2. Il breve frammento di dsRNA (chiamato *short interfering RNA*, o siRNA) si associa ad un complesso enzimatico denominato RISC (dall'inglese *RNA-interference silencing complex*, *complesso silenziatore della RNAi*).
3. L'RNA a doppio filamento viene *aperto*, probabilmente da una elicasi: solo il filamento di RNA antisenso rimane associato a RISC, mentre il filamento *senso* viene degradato.
4. La RISC è ora attiva: è in grado di scansire molti mRNA presenti nel citosol fino a trovarne uno complementare al frammento di RNA antisenso associato al complesso stesso.
5. Se l'appaiamento tra siRNA e mRNA è perfetto (o quasi perfetto), una componente della RISC (detta *argonaute protein* o *Argo*) è in grado di operare un taglio sull'mRNA. I due frammenti di mRNA risultanti, privo di cappuccio al

5' uno e di coda di poliA al 3' l'altro, vengono così rapidamente degradati dalle RNAsi della cellula stessa. Se l'appaiamento, invece, non è perfetto, si pensa che la RISC sia comunque in grado di inibire la traduzione del gene. Sebbene il meccanismo di questo secondo evento non sia chiaro, sembra che possa essere molto diffuso negli animali (68).

Al fine di ottenere una linea cellulare in cui il gene GDNF fosse stabilmente silenziato è stata utilizzata la tecnica degli short hairping (shRNA). Sono stati utilizzati cinque plasmidi codificanti cinque shRNA antisenso al gene umano GDNF (NM-000514) forniti commercialmente (SIGMA Aldrich)(tab.5).

shRNA	sequenza :
shRNA1	CCGGGTGTCTTAACTGCAATACATTCTCGAGAATGTATTGCAGTTAAGACACTTTTTG
shRNA2	CCGGCGCTGAGCAGTGACTCAAATACTCGAGTATTTGAGTCACTGCTCAGCGTTTTTG
shRNA3	CCGGGCTGAGACAACGTACGACAACTCGAGTTTGTCTGACGTTGTCTCAGCTTTTTG
shRNA4	CCGGGAAACCAAGGAGGAACTGATTCTCGAGAATCAGTTCCTCCTTGGTTTCTTTTTG
shRNA5	CCGGGTTTCGATGATGTCATGGATTCTCGAGAAATCCATGACATCATCGAACTTTTTG

Tabella 5 Sequenza shRNA utilizzati.

Oltre a questi plasmidi codificanti gli shRNA è stato utilizzato come controllo negativo un plasmide vuoto, pRS plasmid (TR20003), senza shRNA. I plasmidi liofilizzati sono stati ricostituiti con 50 µl di acqua RNase-Free (Gibco, Invitrogen) ottenendo una soluzione a 100 ng/µl.

È stata effettuata una reazione di trasfezione per ciascuno dei plasmidi e una in cui tutti e cinque i plasmidi codificanti gli shRNA effettivi sono stati trasfettati contemporaneamente (fig.15).

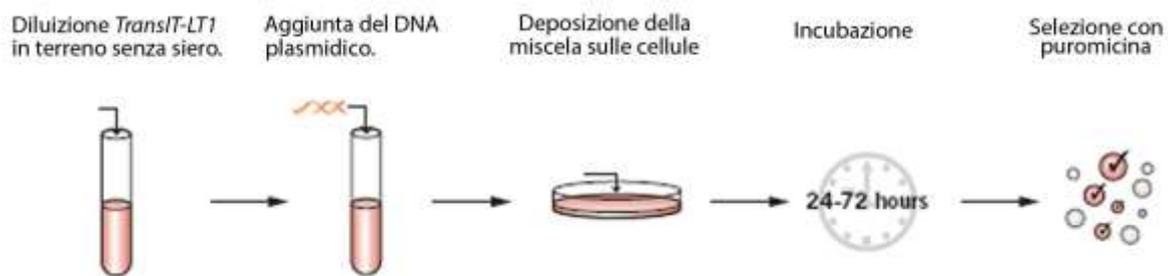


**Figura 15 Schema di trasfezione sulle HK2**

In ogni pozzetto utilizzando una piastra da 6 pozzetti sono state seminate  $3 \times 10^5$  cellule HK2 (come da schema) in modo tale che dopo 24 ore fossero già al al 70 - 80% di confluenza. Il terreno di coltura è stato così rimosso e sostituito con 2 ml/pozzetto di terreno completo. Per ogni trasfezione è stata preparata una soluzione costituita da 188 ml di terreno senza siero e 12ml di reagente di trasfezione TransIT-LT1(Mirus, Madison, WI) che è stata vortexata ed incubata per 20 minuti a temperatura ambiente. Il reagente di trasfezione è una miscela di istoni e lipidi cationici che assicurano un' alta efficienza di trasfezione su cellule che crescono in adesione e in terreno con siero. Questo reagente inoltre mostra una minima tossicità cellulare. Alla soluzione sono stati aggiunti 3 mg di DNA plasmidico,

il tutto è stato mantenuto a temperatura ambiente per altri 20 minuti quindi la soluzione è stata aggiunta goccia a goccia sulle cellule. La stessa quantità di reagente di trasfezione TransIT-LT1 è stata utilizzata per le cellule di controllo.

Le cellule vengono lasciate in coltura per 48 ore in modo che possano esprimere le proteine codificate dal DNA plasmidico inserito. Fra queste c'è anche una proteina che conferisce la resistenza alla puromicina. In alcune cellule il DNA plasmidico viene integrato nel DNA cromosomale e viene replicato insieme ad esso e questo permette il mantenimento della resistenza all'antibiotico. Dopo 48 ore le cellule sono quindi state poste in selezione con 0.75 µg/ml di puromicina (Sigma). Il processo di selezione dura qualche settimana e il terreno deve essere cambiato a giorni alterni per rimuovere le cellule morte. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che 0.75 µg/ml è la minima concentrazione efficace per selezionare le cellule che sono state efficacemente trasfettate e quindi ne esprimono la resistenza. Con questo procedimento abbiamo ottenuto i cloni resistenti all'antibiotico che sono stati usati per i successivi esperimenti (fig.16).



**Figura. 16** Processo di trasfezione e selezione su HK2

#### **4.6.3 STIMOLAZIONE OSTEOGENICA**

Per gli esperimenti di stimolazione osteogenica le cellule HK2 silenziate (3D) e il controllo negativo (CN<sub>c</sub>) sono state seminate in piastre ad una densità di  $3 \times 10^4$ /pozzetto per 15gg con due terreni di stimolazione osteogenica forniti commercialmente (NH OsteoDiff Medium MACS Miltenyi Biotec ed Euromed Osteogenic Differentiation EuroClone). Di contro per un controllo di riferimento interno è stata fatta una semina in terreno base, DMEM F12 10%FCS (fig.28). Ogni 3 gg i rispettivi terreni utilizzati sono stati rimossi e sostituiti con terreno fresco. Per l'analisi citochimica con la colorazione von Kossa e l'analisi SEM le cellule sono invece state seminate in delle chamber slide a due diverse densità:  $1^4 \times 10$  (high-density) e  $2.5 \times 10^3$  (low-density).

#### **4.6.4 ESTRAZIONE DELL'RNA**

L'estrazione dell'RNA dalle cellule è stata effettuata mediante il protocollo del kit commerciale RNeasy Micro Handbook (Quiagen). Questo metodo prevede l'uso di membrane di silice in formato spin column alle quali gli acidi nucleici, in presenza di sali caotropici, si legano in modo specifico.

L'RNA totale è stato estratto sia dai cloni HK2 silenzati per GDNF, sia dal controllo negativo (cellule HK2 in cui è stato inserito il plasmide vuoto TR20003) e sia dalle cellule HK2 wilde type. L'RNeasy Micro Handbook prevede un numero di cellule non superiore a  $5 \times 10^5$ . Il buffer di lisi contenente guanidina-isotiocianato ed etanolo viene aggiunto alla sospensione di cellule dopo tripsinizzazione, per creare le condizioni che promuovono il legame selettivo dell'RNA con la membrana. Il campione viene quindi trasferito nella colonnina e mediante l'uso di buffer e centrifugazioni, l'RNA si lega alla membrana. Durante questi passaggi anche il DNA può legarsi erroneamente alla membrana per cui per rimuoverne eventuali tracce si procede con la sua digestione tramite l'uso dell'enzima DNase RNase free nella spin

column. DNasi ed eventuali contaminanti (sali, proteine) vengono rimossi mediante una serie di lavaggi in buffer e l'RNA eluito in H<sub>2</sub>O RNasi-free (30µl). L'RNA estratto viene conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

#### **4.6.5 QUANTIFICAZIONE DELL'RNA**

I campioni di RNA totale così ottenuti sono stati quantificati utilizzando lo spettrofotometro Nano Drop ND-1000.

Il NanoDrop è uno Spettrofotometro UV-Visibile capace di lavorare con microvolumi di campione, fino a 1 µl. Sfrutta una tecnologia, basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine. In tal modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, e può essere analizzata in modo semplice e veloce. Per ogni campione di RNA eluito in H<sub>2</sub>O RNasi-free 1 µl è stato utilizzato per la lettura al Nanodrop.

La purezza dell'RNA è assicurata da un rapporto spettrofotometrico  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ , dove  $A_{260}$  è l'assorbanza in nanometri relativa agli acidi nucleici, mentre  $A_{280}$  (l'assorbanza negli UV) è indice della contaminazione proteica. I campioni estratti avevano una purezza dell'ordine di 1,7-1,9.

#### **4.6.6 VERIFICA DELL'INTEGRITA' DELL' RNA**

L'integrità è stata valutata mediante elettroforesi capillare su chip in Agilent 2100Bioanalyzer (Agilent Technology), osservando visivamente le due distinte bande ribosomiali 28S e 18S e considerando il rapporto 28S/18S (che dovrebbe essere approssimativamente 2). La quantità di RNA totale caricata per ogni campione nel chip è stato di 1 µl.

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, ecco perchè per vederne l'integrità ci basiamo sull'analisi degli RNA ribosomiali 28S e 18S.

#### **4.6.7 RETROTRASCRIZIONE (RT)**

In seguito al controllo e alla quantificazione dell'RNA si procede con una reazione di RT/PCR. La reazione di retrotrascrizione prevede la sintesi di DNA copia (cDNA) a partire da stampi di RNA 120 ng di RNA totale estratto da tessuto e 100 ng di RNA totale estratto da cellule sono stati retrotrascritti in un volume finale di 20µl. La miscela di reazione è costituita da 4 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Sigma), 2µl dNTPs 10 µM (Roche), 1µl esameri random 50 µM (Applied Biosystem), 1µl inibitore delle RNAsi 20 U/ µl (Applied Biosystem) e 1µl trascrittasi inversa MuLV 50 U/ µl (Applied Biosystem), 2µl Buffer 10X (Sigma) costituito da KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3) e acqua milliQ per arrivare al volume finale. 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 di

RT prevede, 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, eseguito nel termociclatore iCycler (BioRad): incubazione a 42 °C per 30 minuti, denaturazione a 99 °C per 5 minuti ed infine raffreddamento a 5 °C per 5 minuti. Il cDNA così ottenuto viene denaturato a 95 °C per 5 minuti prima di venire utilizzato nelle reazioni di PCR e Real Time PCR.

#### **4.6.8 REAL TIME PCR**

Per valutare l'espressione di GDNF è stato utilizzato un approccio semiquantitativo comparativo mediante Real-time PCR. Per normalizzare i dati è stato utilizzato come controllo interno la gliceraldeide- 3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH, ditta MWG) che è un gene housekeeping, ossia non soggetto a modulazioni di espressione a livello renale (69). La Real time PCR (RT- PCR) è un metodo enzimatico per l'amplificazione in vitro di sequenze di RNA partendo da campioni iniziali di varie dimensioni comprese singole cellule. Essa rappresenta una tecnica sensibile e flessibile che può essere utilizzata per confrontare i livelli di RNA messaggero tra campioni cellulari differenti, per caratterizzare il quadro di espressione genica oppure per discriminare molecole di RNA diverse tra loro. La chimica di reazione è analoga a quella della reazione standard di PCR. E' necessario quindi allestire una miscela di reazione in cui siano presenti i seguenti componenti: RNA o cDNA come template, una coppia di primers specifici per il target di interesse, i deossinucleotidi e il corrispondente tampone. Ciascuno di questi componenti svolge un ruolo cruciale durante lo svolgimento della reazione e per tale motivo la loro concentrazione di utilizzo deve essere opportunamente ottimizzata al fine di ottenere i risultati attesi. La real time PCR dà la possibilità di rilevare e quantificare l'RNA presente durante lo svolgimento della reazione stessa. La quantificazione del gene target, a differenza della reazione standard di PCR, non viene effettuata nei cicli finali di amplificazione ma nel momento in cui la curva entra nella fase di amplificazione esponenziale: questo

punto è definito ciclo soglia (Cycle threshold o Ct) ed è il punto in cui la curva primaria interseca la linea di base della fluorescenza. Questo punto specifico che varia da campione è direttamente proporzionale al numero di copie iniziale di DNA. La metodica di rilevazione scelta per analizzare la Real-Time PCR prevede l'utilizzo del SYBR Green come marcatore di amplificazione. Il SYBR Green è un intercalante del DNA che si lega alle molecole di DNA prodotte durante le reazioni di amplificazione. Si lega ogni 12 paia di basi nel solco minore del doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda di 488nm ed emette luce verde a 522nm di lunghezza d'onda. Il risultato è un aumento dell'intensità di fluorescenza proporzionale alla quantità dell'amplificato di PCR ad ogni fase di appaiamento-estensione. Per questo motivo, tramite Real-Time PCR, è possibile monitorare la progressione delle reazioni di amplificazione, ovvero l'aumento di fluorescenza ad ogni ciclo piuttosto che misurare la quantità del prodotto che si accumula al termine dei cicli.

Il profilo di amplificazione utilizzato in real time PCR è il seguente:

Cycle 1	95 °C	10:00	step 1	
Cycle 2	95 °C	00:10	step 1	} 45 ×
	64 °C	00:45	step2	
Cycle 3	95 °C	01:00	step1	
Cycle 4	68 °C	01:00	step1	
Cycle 5	60 °C	00:10	step 1	} 80 ×

<i>Primer</i>	<i>Sequenza</i>	<i>T<sub>A</sub></i>	<i>MgCl<sub>2</sub></i>	<i>Ditta</i>
GAPDH Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	60 °C	3 mM	MVG
GAPDH Rw	TGGCAACAATATCCACTTTACCA			
GDNG Fw	GGCTATGAAACCAAGGAGGAACTG	60 °C	1,5 mM	MVG
GDNF Rw	TCCACCACCCTGTTGCTGTA			

**Tabella 6: Primers di GDNF e GAPDH utilizzati in Real Time PCR**

I livelli di espressione sono stati determinati con una quantificazione relativa mediante il metodo di comparazione dei cicli soglia ( $\Delta\Delta Ct$ ) e sono stati normalizzati con il gene housekeeping GAPDH. La quantificazione relativa di ogni campione rispetto al controllo è stata calcolata con la seguente formula:  $2^{-DDCt}$ .

#### 4.6.9 IMMUNOCITOCHIMICA PER LO STUDIO DELLA PROTEINA GDNF

L'espressione di GDNF a livello proteico è stata valutata mediante una seduta in immunocitochimica utilizzando per GDNF un anticorpo policlonale in rabbit (Santa Cruz Biotechnology). Le cellule sono state seminate in delle chamber slide a partire da una densità di 10.000 cellule per pozzetto e successivamente fissate in acetone. La seduta è stata fatta con i seguenti passaggi:

- Lavaggio in PBS 15' a T ambiente
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% 15'a T ambiente
- 2 lavaggi in PBS per 5'
- Blocco dei siti specifici con siero normale di goat al 2% 30' a T ambiente
- Incubazione con Ab I° per GDNF overnight a 4C°

Il giorno dopo :

- Ambientazione 30' a T ambiente
- Lavaggio in PBS
- Incubazione con Ab II° (DakoCytomation EnVision+Peroxidase) per 30' a T ambiente
- Lavaggio in PBS
- Trattamento con DAB
- Contro colorazione con ematossilina
- Montaggio del vetrino in gelatina glicerata.
- Osservazione del preparato con il microscopio ottico Orthoplan LEITZ

#### **4.6.10 METODO COLORIMETRICO PER LA VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE.**

I Cloni HK2 silenziati per GDNF e utilizzati per gli esperimenti sono stati seminati alla concentrazione di 50.000 cell/ml in piastre da 12 pozzetti in terreno DMEM F12 10%FBS . La densità di semina dipende dalle dimensioni delle cellule e dalla velocità di crescita in vitro. Ai tempi stabiliti (5tempi) il sopranatante è stato scartato mediante aspirazione, le cellule sono state lavate con PBS e fissate in metanolo assoluto freddo e conservate al buio a 4°C. Dopo alcuni giorni è stata fatta la lettura, procedendo con l'aspirazione del mezzo e con la colorazione con una soluzione di blù di metilene 1% in tampone borato 0.01M, pH 8.5 (500-800µl/pozzetto da 12 well) per 30 minuti. Dopo abbondante lavaggio con tampone 0.01 M (2-3volte) il colorante fissato viene eluito con etanolo assoluto/HCL 0.1 N nel rapporto 1:1, 2 ml. La lettura è stata effettuata utilizzando 1.0ml di colorante eluito in cuvetta a 650nm. Ogni condizione è stata testata in triplicato allo spettrofotometro ( Bio Rad Model 3550 Microplate Reader) (70).

#### **4.6.11 COLORAZIONE CON IL REAGENTE VON KOSSA.**

Questa metodica è stata utilizzata per rilevare la deposizione di calcio nelle cellule in coltura. Il reagente di Von Kossa è una soluzione al 5% di nitrato d'argento che colora le zone mineralizzate in nero. La colorazione nera è dovuta alla deposizione dell'argento in forma metallica che si va a sostituire al calcio ridotto dalla luce forte. Ciò che ci si aspetta da questa colorazione sono i depositi di calcio in nero o marrone scuro e i nuclei delle cellule in rosso. Le cellule HK2 prima di essere colorati con il reagente von Kossa sono stati fissati in formalina. La metodica è stata poi effettuata mediante i seguenti passaggi:

- Idratazione delle sezioni (vetrini) mediante diversi lavaggi in acqua distillata.
- Incubazione delle cellule in una soluzione di nitrato d'argento 5% (Sigma-Aldrich) ed esposizione per circa 1h alla luce solare all'interno di una vaschetta trasparente.
- Lavaggi post incubazione in acqua distillata.
- Rimozione dell'argento che non si è legato mediante incubazione per 5 minuti delle cellule in sodio tiosolfato 5% (Sigma-Aldrich).
- Abbondante lavaggio prima con acqua di fonte e successivamente con quella distillata.
- Contro-colorazione mediante colorazione con soluzione di rosso neutro (Sigma-Aldrich) per 1 minuto.
- Lavaggio in acqua distillata e dei vetrini per rimuovere l'eccesso del rosso neutro.
- Disidratazione e montaggio del vetrino in Eukitt.
- Osservazione al microscopio ottico.

#### 4.6.12 SCANNING ELECTRON MICROSCOPE (SEM)

L'analisi in SEM è stata utilizzata per la valutazione della composizione sulle cellule dei depositi minerali. Il microscopio elettronico è un tipo di microscopio che non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni ma un fascio di elettroni. Nel microscopio elettronico a scansione (SEM-Scanning Electron Microscope) il preparato, adeguatamente preparato, viene attraversato da un fascio molto sottile di elettroni, detti primari, che viene focalizzato su una piccola area e deflesso lungo traiettorie che formano un tracciato che esplora tutta l'area. Dal campione vengono emesse numerose particelle fra le quali gli elettroni secondari i quali vengono raccolti da uno speciale rivelatore e convertiti in impulsi elettrici. Il segnale degli elettroni secondari viene inviato ad un monitor fornendo un ingrandimento finale dell'oggetto. Ogni punto del campione analizzato corrisponde a un pixel dello schermo televisivo, cosicchè, man mano che il fascio elettronico scorre sul campione, sullo schermo si costruisce un'immagine completa. Il potere di risoluzione di un normale microscopio elettronico SEM si aggira intorno ai 5 nm. L'immagine SEM ha un'elevata profondità di campo. Il campione è sotto alto vuoto (10<sup>-5</sup> Torr) poichè l'aria impedirebbe la produzione del fascio (data la bassa energia degli elettroni), e deve essere conduttivo (oppure metallizzato), altrimenti produce cariche elettrostatiche che disturbano la rivelazione dei secondari. I campioni vengono trattati inizialmente con una soluzione di gluteraldeide 3% in un tampone fosfato e in seguito disidratati mediante una serie crescenti di alcoli. I campioni in alcol assoluto sono poi posti all'interno dello strumento fino al raggiungimento del *critical point* che permette il passaggio da liquido a gas.

L'alcol assoluto viene sostituito con CO<sub>2</sub> liquido del *critical point*, il campione seccato, colorato mediante l'utilizzo di metalli (solitamente l'oro) e osservato. Il microscopio ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) si presenta come una naturale evoluzione della microscopia elettronica a scansione dal punto di vista

elettronico ed informatico che consente di superare il vincolo di operare in condizioni di vuoto elevato imposto dai microscopi elettronici convenzionali. Il diverso funzionamento si basa sull'esistenza di una colonna che può lavorare, oltre che in modalità convenzionale (vuoto elevato in tutta la colonna), anche in modalità controllata di vuoto differenziale, elevato nella zona della colonna vera e propria, minore in prossimità del diaframma finale e decisamente più basso nella camera vera e propria ove viene posto il campione, pur mantenendo la risoluzione del SEM convenzionale. I campioni sono stati analizzati presso il centro CUGAS dell'Università di Padova.

## ***RISULTATI E DISCUSSIONE***

La patogenesi di MSK, come già anticipato, non è stata ancora completamente chiarita, ma la maggior parte degli autori concorda che si tratta di una patologia congenita con espressione ritardata. Che la causa di MSK potesse essere di natura genetica era suggerito dalla descrizione di alcuni casi familiari, dall'appartenenza di MSK al gruppo delle patologie malformative e dalla sua associazione con altre malattie ereditarie. La scoperta del gene/i responsabile della patologia è stato negli ultimi anni obiettivo del nostro gruppo di lavoro ed in particolare del mio lavoro di dottorato. L'ipotesi che ha dato inizio al tutto è che MSK sia la conseguenza di un disturbo durante lo sviluppo renale dell'interfaccia "gemma ureterale-blastema metanefrico" a causa di mutazioni/polimorfismi dei geni RET e/o GDNF. Le considerazioni che ci hanno portato alla scelta di GDNF come gene candidato sono state di natura eminentemente patogenetica ed embriogenetica. MSK si accompagna spesso a nefrocalinosi, calcoli renali e disfunzioni del tubulo nefronico. La sua patogenesi deve perciò rendere conto di alterazioni di distretti anatomici di origine embriologica diversa, il tubulo nefronico e i dotti collettori. Durante l'embriogenesi renale, il mesenchima metanefrico, tramite la sintesi della chemochina neurotrofica GDNF, promuove la gemmazione del dotto mesonefrico di Wolf della gemma ureterale che si allunga fino ad invadere il mesenchima. La gemma ureterale esprime sul suo apice il recettore RET di GDNF. Il legame RET/GDNF è cruciale non solo per lo sviluppo corretto degli ureteri e dei dotti collettori ma anche per lo sviluppo dei tubuli renali. E proprio in base a queste considerazioni abbiamo ipotizzato che MSK sia la conseguenza di un disturbo dell'interfaccia "gemma ureterale-mesenchima metanefrico" .

## **STUDIO DI MUTAZIONE DI GDNF**

Lo studio su MSK è già stato oggetto di un precedente lavoro di dottorato che ha considerato una casistica di 55 pazienti MSK i cui risultati sono stati recentemente pubblicati (71).

Lo studio è stato successivamente esteso ad altri 57 pazienti reclutati per MSK ed i risultati qui riportati sono riferiti all'intera popolazione di MSK di 112 pazienti.

L'Analisi mutazionale del gene GDNF eseguita mediante allineamento delle sequenze ottenute dai prodotti di amplificazione degli esoni e delle regioni di giunzione esone-introne con la sequenza di riferimento **ENSG00000168621** ha permesso di identificare nella casistica complessiva di MSK composta da 112 pazienti affetti, la presenza di 5 diverse sostituzioni nucleotidiche puntiformi di cui 4 negli esoni non tradotti della regione 5' UTR (esoni 1-3) e 1 nella regione codificante (esone 5) (tab.7,8).

<u>ESONE :</u>	<u>TIPO SOSTITUZIONE:</u>	<u>IDENTIFICATIVO:</u>
Esoni 1	<b>A/G</b>	<b><u>rs2973033</u></b>
<i>Esoni 3</i>	<b>A/G</b>	<b><u>rs45455796</u></b>
<i>Esoni 5</i>	<b>277 C/T</b>	<b><u>R93W</u></b>

**Tabella 7. Varianti note di GDNF**

<u>ESONE :</u>	<u>TIPO SOSTITUZIONE:</u>	<u>IDENTIFICATIVO:</u>
<i>Esoni 3</i>	<b>[-27+18G&gt;A]</b>	<b><u>Variante intronica</u></b>
<i>Esoni 3</i>	<b>[-27+18G&gt;A]+[-45G&gt;C]</b>	<b><u>Allele complesso</u></b>

**Tabella 8. Varianti non note di GDNF**

La variante A/G dell'esone 1, è stata rilevata in 23 pazienti con MSK sia in eterozigosi sia in omozigosi. Tale sostituzione viene descritta in NCBI SNP Database e Ensembl come polimorfismo a singolo nucleotide e corrisponde al numero di riferimento **rs2973033**. La frequenza di questo polimorfismo nella popolazione MSK risulta così essere di 0.10, frequenza statisticamente significativa rispetto a quella della popolazione generale, sia quella locale, 125 cordoni ombelicali, ( $p=0.000$ ) sia quella riportata in NCBI SNP Database ( $p=0.000$ ). Ci proponiamo di condurre lo studio di associazione caso-controllo anche per questo polimorfismo noto.

La variante A/G dell'esone 3, è stata riscontrata in una sola paziente nella forma eterozigote. Tale sostituzione viene descritta in NCBI SNP Database e Ensemble e corrisponde al numero di riferimento **rs45455796**. La frequenza di tale polimorfismo è di 0.0044 nella popolazione MSK e 0.033 nella popolazione generale riportata su NCBI, differenza non statisticamente significativa. Si tratta vista la sua frequenza di una variante rara.

La variante R93W è stata rilevata nella regione codificante del gene GDNF ed è stata riscontrata in una sola paziente nella forma eterozigote. E' una transizione C-T nel codone 93 dell'esone 5 che genera una mutazione missense causando la sostituzione di un residuo di arginina con l'amminoacido triptofano (**R93W**). Questa variante è già stata descritta in pazienti con altre patologie, quali la malattia di Hirschsprung, la sindrome da ipoventilazione centrale congenita e il feocromocitoma (72,73,74).

Tra le varianti non note da noi identificate per la prima volta, vi sono due sostituzioni nucleotidiche puntiformi, trovate in eterozigosi, rispettivamente nella regione 5' UTR dell'esone 3 (**-45G>C**) e nella regione intronica subito a valle (**-27+18G>A**). Queste due sostituzioni sono state trovate nella forma concomitante dell'allele complesso [-27+18G>A]+[-45G>C] o della sola variante intronica

(-27+18G>A)(fig.17).Non è mai stata trovata da sola la variante esonica -45G>C.  
(fig.18).

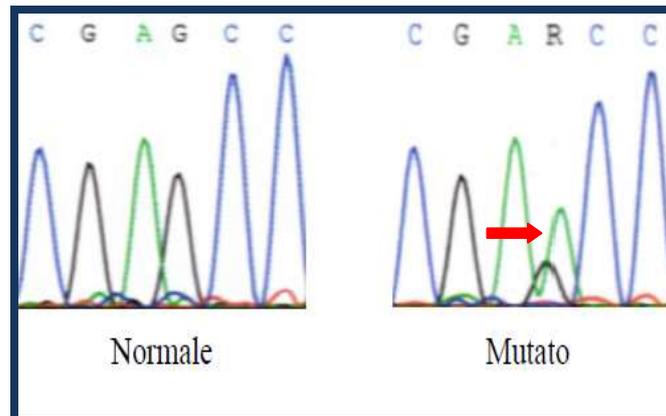


Figura 17 Identificazione della sostituzione nucleotidica (-27+18G>A) mediante sequenziamento dell'introne 3 del gene GDNF.

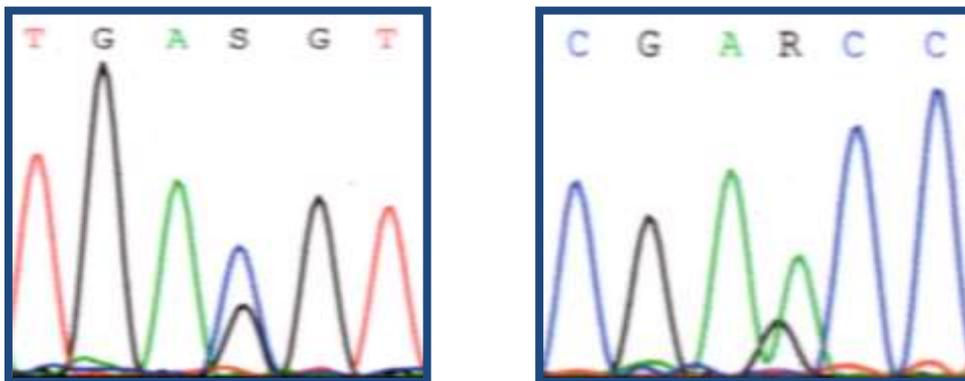


Figura 18 Identificazione delle due varianti - 45G>C (dx) e -27+ 18 G>A (sx) nella forma dell'allele complesso mediante sequenziamento dell'esone 3 di GDNF

Le sostituzioni nucleotidiche puntiformi non note rilevate dalla sequenza genica sono state analizzate anche mediante restrizione enzimatica (RFLP) dei prodotti PCR opportuni. Mediante il software Webcutter ([http://rna.lundberg.gu.se/cutter 2/](http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/)) sono stati cercati degli enzimi di restrizione (AVA I, Bln I, Mnl I) i cui siti di taglio contenevano i nucleotidi sostituiti nella sequenza genica.

Mediante colorazione in argento è stato così possibile visualizzare i frammenti di DNA e studiare il pattern di restrizione che si sarebbe dovuto ottenere in assenza o in presenza della sostituzione nucleotidica in questione. In particolare una doppia digestione, prima con AVA I e poi con Mnl I ci ha permesso di valutare se le due nuove varianti si trovavano nello stesso allele e quindi definire l'allele complesso. Per verificare che si trattava di varianti causa di malattia, sempre mediante RFLP, sono stati eseguiti degli studi di frequenza con 250 cromosomi provenienti da cordone ombelicale della popolazione veneta.

La frequenza allelica delle varianti non note di GDNF è risultata essere sia per l'allele complesso che per la variante intronica di 0.008. Questo è indice del fatto che si tratta di varianti rare poiché decorrono nella popolazione con una frequenza compresa tra lo 0.1 e lo 0.01 e sono usualmente specifiche di determinate popolazioni a causa dell'effetto fondatore che le ha determinate .

L'approccio allo studio della componente genetica nelle malattie multifattoriali si basa sulla ricerca di varianti genetiche che influenzano la suscettibilità di un individuo ad ammalare di una determinata malattia. Esse sono usualmente piccole sostituzioni nucleotidiche o SNPs e, come più recentemente trovato, variazioni del numero di copie (delezioni o duplicazioni di tratti del genoma di grandezza compresa tra poche kilobasi a megabasi) o CNV (Copy Number Variation) che decorrono nella popolazione come comuni polimorfismi con una frequenza compresa fra 1% e 5%. Gli studi di associazione "whole genome" (WGAS Whole Genome Association Study) hanno permesso di accumulare un'enorme quantità di dati sull'associazione dei polimorfismi genetici con malattie comuni. Il limite di

questi studi è la necessità che essi siano condotti su un numero molto elevato di casi affinché sia raggiunta una significatività statistica e possano essere replicati.

Un approccio alternativo ai WGAS si basa sulla “rare variant hypothesis” (75) che propone che una porzione significativa della suscettibilità genetica ad una malattia multifattoriale possa essere dovuta alla somma degli effetti di varianti genetiche rare che agiscono indipendentemente e in maniera dominante, ciascuna delle quali è in grado di conferire un modesto ma facilmente identificabile aumento del rischio relativo. Le varianti genetiche rare decorrono nella popolazione con una frequenza compresa fra 0,1% e 1% e sono usualmente specifiche di determinate popolazioni a causa dell’effetto fondatore che le ha determinate. La strategia di elezione per trovare queste varianti genetiche rare è l’approccio dei geni candidati che prevede, in prima istanza, il sequenziamento di questi nella popolazione di pazienti affetti e, successivamente, la stima della loro frequenza in una popolazione di controllo. Le varianti rare trovate significativamente associate alla malattia devono essere poi valutate per il loro impatto sulla funzione del gene in questione. Punti critici di questa strategia sono la scelta del gene o geni candidati, la scelta dei casi ben selezionati e soprattutto dei controlli. In questi deve essere accertata l’assenza della malattia e devono appartenere alla stessa popolazione o area geografica dei casi. L’approccio da noi utilizzato per lo studio delle basi genetiche di MSK rientra a pieno titolo in questa strategia.

Per verificare l’ipotesi che potesse trattarsi di varianti associate alla patologia del rene con midollare a spugna (MSK) è stato condotto uno studio caso-controllo dove l’accurata scelta dei casi e soprattutto dei controlli è stato un punto importante di questa strategia. Pertanto la popolazione caso e la popolazione controllo sono state individuate da una stessa popolazione, caratterizzata da nefrolitiasi calcica recidivante di origine veneta, reclutata presso la Divisione di Nefrologia di Verona.

## STUDIO DI ASSOCIAZIONE CASO-CONTROLLO

Popolazione caso: costituita da 112 pazienti con MSK bilaterale diagnosticato sulla base di stretti criteri urografici e selezionati secondo quanto già riportato nei materiali e metodi.

Popolazione controllo: costituita da 85 pazienti di età e sesso comparabile a quella dei casi, e caratterizzati dall'esclusione di MSK anche parziale.

### GENOTIPI

Popolazione	N individui	Allele complesso <u>eterozigote</u>	Variante intronica <u>eterozigote</u>	Eterozigote composto	RW93 <u>eterozigote</u>
Caso	112	3	8	1	1
Controllo	85	0	0	0	0

Tabella 9 Genotipi popolazione MSK

### FREQUENZE ALLELICHE

Popolazione	Allele complesso	Variante intronica	R93W	Frequenza totale varianti rare	N cromosomi
<u>Caso</u>	<b>0.017</b> <b>4/224</b>	<b>0.04</b> <b>9/224</b>	<b>0.004</b> <b>1/224</b>	<b>0.058</b> <b>13/224</b>	224
<u>Controllo</u>	0	0	0	0	170
	X <sup>2</sup> = 1.507 P=0.220	X <sup>2</sup> = 5.064 P=0.024	X <sup>2</sup> = 0.020 P=0.888	X <sup>2</sup> = 7.940 P=0.005	

Tabella 10 Frequenze alleliche popolazione MSK

Nella popolazione Caso sono stati trovati 13 individui che portavano le varianti non note e la mutazione R93W in eterozigosi (tab.9). Nessuna di queste sostituzioni è stata individuata nella popolazione di controllo. La frequenza allelica per l'allele complesso è risultata essere di 0.017 mentre quella della variante intronica di 0.04. Rispetto ai risultati del precedente lavoro su un campione meno numeroso di pazienti MSK, nei risultati attuali viene ancora confermata una differenza statisticamente significativa per la variante intronica mentre viene persa quella dell'allele complesso. Tuttavia il complesso delle varianti individuate (allele complesso, variante intronica e mutazione esonica) ha portato ad una differenza statisticamente significativa nella frequenza allelica di GDNF tra le due popolazioni ( $\chi^2 = 7.940$   $p = 0.005$ )(tab.10). Il fatto che 11 casi sporadici presentassero la stessa mutazione o nella variante intronica o nella variante dell'allele complesso ci ha messo di fronte all'evidenza della presenza di un chiaro effetto fondatore poiché più pazienti portano la stessa mutazione.

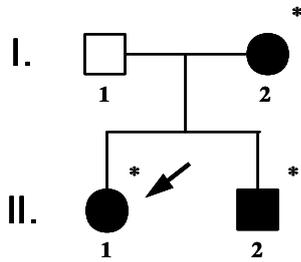
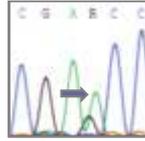
Sulle varianti rare individuate è stato successivamente anche indagato il loro significato funzionale. Per la variante esonica -45G/C è stato utilizzato un approccio "in silico" attraverso l'utilizzo di software in grado di predire l'effetto delle varianti sulla proteina o sull'RNA messaggero. E tre differenti software (Automated Splice Site Analyses, ESEfinder, RESCUE-ESE) concordano nel prevedere che la variante causava un'alterazione della struttura del messaggero per l'attivazione di un sito criptico di splicing. Questa variante come già detto, non è mai stata trovata da sola né nei pazienti né nei controlli; ciò suggerisce che potrebbe rappresentare una mutazione deleteria che non ha effetti letali quando associata alla mutazione intronica -27+18G/A. Per la mutazione intronica invece, abbiamo potuto dimostrare che, nella papilla renale di una paziente con MSK e mutazione GDNF, l'espressione genica di GDNF era upregolata rispetto al tessuto renale di controllo.

Un'altra considerazione ci permetteva di rafforzare quanto trovato sull'effetto delle due mutazioni nuove sulla trascrizione di GDNF: la regione in cui insistono le due

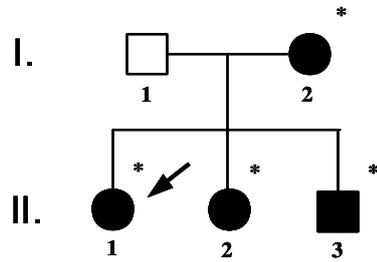
varianti costituisce un dominio di legame con il fattore di trascrizione PAX2, fattore cruciale per il differenziamento dei tubuli renali, per cui abbiamo ipotizzato che un' alterata risposta di GDNF a PAX2 possa portare a un disturbo di quei messaggi differenziativi necessari non solo per lo sviluppo dei dotti collettori ma anche per una corretta nefrogenesi, e quindi ad una corretta polarizzazione delle cellule tubulari. L'effetto ultimo di questa disregolazione potrebbe essere un alterato assetto dei trasportatori coinvolti nell'acidificazione o nell'handling degli ioni. Infatti ipercalciuria, elevato ph urinario e ipocitraturia caratterizzano il profilo urinario dei nostri pazienti con MSK soprattutto di quelli con mutazione GDNF.

MSK è sempre stata considerata una malattia sporadica. In letteratura sono stati riportati pochissimi casi (76). Su 6 dei 13 pazienti è stato possibile condurre uno studio familiare ed in 5 di loro è stato visto che la variante era presente e che si associava anche nei familiari al fenotipo MSK. Nella figura 19 sono rappresentati i 5 alberi genealogici dove è possibile vedere la segregazione delle varianti rare con il fenotipo MSK sia nella forma intronica sia nella forma dell'allele complesso.

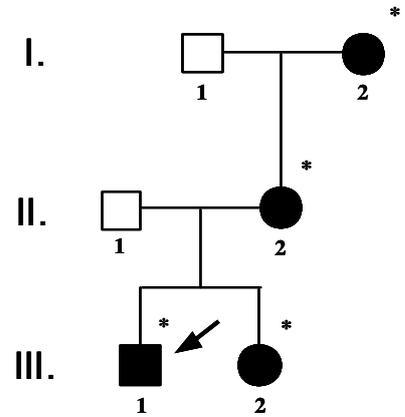
\* c.[-27+18G>A]+[=]



**A**

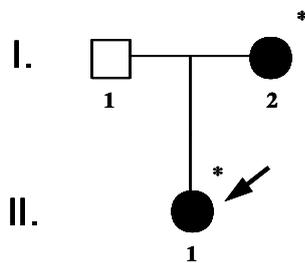
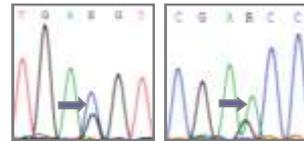


**B**

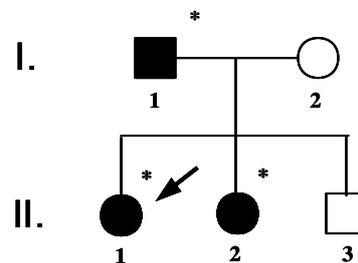


**C**

\* c.[-45G>C; -27+18G>A]+[=]



**D**



**E**

Figura 19. Segregazione delle varianti rare con il fenotipo MSK sia nella variante intronica -27+18 G>A sia nella variante dell'allele complesso [ -27+18G>A ; -45G>C ]

### **STUDIO DEI CASI FAMILIARI DI MSK**

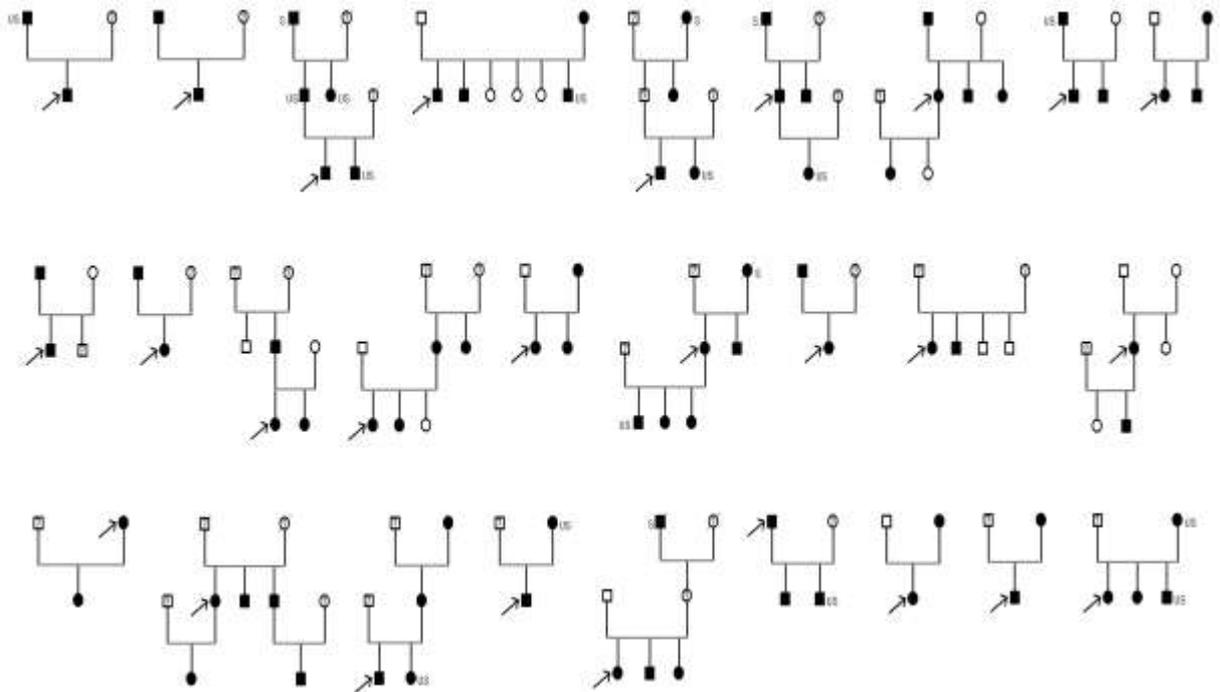
In merito all'osservazione che le varianti rare di GDNF riscontrate in 5 famiglie segregavano con MSK, e soprattutto che questi casi di MSK familiare sarebbero rimasti misconosciuti se non avessimo fatto l'indagine genetica, abbiamo posto l'attenzione sullo scoprire se ci fosse familiarità in casi apparentemente sporadici di MSK. Lo studio è stato fatto in collaborazione con la Clinica Nefrologica di Verona (77).

Sono stati indagati 50 gruppi familiari scelti random dalla coorte di 112 pazienti con MSK. L'analisi mediante ecografia e/o Uro-TC è stata estesa ai consanguinei della stessa generazione, e di 1, se possibile, 2 generazioni precedenti e/o successive. Nel probando e nei familiari affetti e non affetti sono stati determinati gli elettroliti plasmatici, il GFR, PTH, 25(OH) Vit.D, il volume urinario con l'escrezione di Ca, Ox, Acido Urico, le proteine, nonché il pH urinario.

Sono stati individuati 27 casi in cui oltre al probando vi era almeno un altro parente con riscontro radiologico di malattia. I risultati hanno messo in luce che:

- Il 75% dei familiari affetti da MSK presentavano MSK bilaterale.
- In media i probandi erano di dieci anni più giovani dei parenti affetti della stessa generazione, che nella maggior parte dei casi avevano una malattia poco sintomatica, o alcuni nessuna manifestazione clinica. In particolare il PH urinario, il volume urinario e la calciuria nei probandi erano più elevati rispetto agli altri familiari affetti. Questo da un lato potrebbe spiegare i pochi casi di MSK familiari riportati in letteratura e potrebbe indicare che la malattia è sotto diagnosticata e avere nella popolazione una prevalenza maggiore di quanto stimato.

- Nel 92% famiglie vi era una trasmissione della malattia da genitore a figlio con una modalità autosomica dominante ma nel restante vi era comunque una trasmissione verticale con salto di generazione d'altronde tipica delle malattie autosomiche dominanti (penetranza incompleta) (fig.20).



**Figura 20. Alberi genealogici delle 27 famiglie MSK.** Famiglie con una o più generazioni in cui è possibile osservare la “segregazione” del fenotipo MSK con una modalità di tipo autosomico dominante.

Nelle 23 famiglie rimanenti non è stata trovata nessuna manifestazione della malattia nei parenti di primo grado. Non possiamo escludere che questi casi possano essere anch'essi familiari perché non è stata utilizzata la tecnica uro TAC che è considerata l'indagine di riferimento per MSK. Tuttavia questa spiegazione sembra essere improbabile perché l'ecografia nelle nostre mani è stata in grado di rilevare il 100% di casi MSK diagnosticati mediante urografia o uro-TAC e perché nessun'altra manifestazione clinica con episodi di calcolosi è stata trovata nei parenti dei probandi con MSK. L'affermazione che questi casi sporadici possano essere nuove mutazioni, nell'ipotesi di una malattia autosomica dominante non può essere esclusa anche se un tasso di mutazione del 50% non è così frequente nei disordini mendeliani. Penetranza incompleta ed espressività variabile d'altronde spiegano la presenza di casi sporadici nelle malattie dominanti.

Dai nostri dati risulta che più del 50% dei casi di MSK sono familiari, contrariamente a quanto riportato finora in letteratura.

Il passo successivo dello studio genetico dei casi familiari di MSK è stato quello di andare a vedere se GDNF fosse alterato anche in questi casi familiari. Sui casi familiari è stato inizialmente fatto lo screening per le varianti rare e successivamente l'analisi è stata estesa a tutti gli esoni di GDNF. Infine in collaborazione con il laboratorio di Nefrologia del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova, è stato fatto lo screening dei geni Pax2, Six1 e Spry1 che sono coinvolti nel processo di organogenesi renale. Lo screening di questi tre geni è esteso anche ai 6 casi familiari con le varianti rare di GDNF per un totale di 19 famiglie.

Dai risultati ottenuti sullo studio dei casi familiari di MSK è emerso che:

- L'analisi mutazionale del gene **GDNF** eseguita mediante sequenziamento diretto delle regioni codificanti e regioni introniche adiacenti non ha evidenziato la presenza delle varianti rare né di altre sostituzioni nucleotidiche. Si ipotizza la presenza di eterogeneità genetica, d'altronde già riscontrata anche nello studio dei casi sporadici.
- L'analisi mutazionale del gene **Six1** eseguita mediante allineamento delle sequenze con la sequenza di riferimento non ha evidenziato nessuna mutazione causativa.
- L'analisi mutazionale del gene **Pax2** eseguita sia mediante HRM (High resolution melting) sia mediante sequenziamento diretto non ha evidenziato alcuna mutazione causativa (tab.11). Sono stati invece individuati per in 18 probandi 5 polimorfismi già noti che non hanno riportato una differenza statisticamente significativa tra la nostra popolazione e quella di riferimento riportata dalle banche dati:

1. rs4472867G/C (esone 1.4)
2. rs4405241C/A (esone 1.4)
3. rs1800897C/T (esone8)
4. rs1800898 A/C (esone 8)
5. rs 11190717G/A (esone 10)

- L'analisi mutazionale del gene *Spry1* eseguita sia mediante HRM sia mediante sequenziamento diretto non ha evidenziato nessuna mutazione causativa.(tab.12) Allo stesso modo in 11 probandi dei casi familiari di MSK sono stati individuati dei polimorfismi già noti le cui frequenze alleliche confrontate con quelle di riferimento non hanno riportato delle differenze statisticamente significative:

1. rs 74448744 A/C
2. rs 300568 T/G
3. rs 300572 G/A
4. rs300573 A/C
5. rs 300574 C/T
6. rs500575 G/C

Polimorfismo	Frequenza Allelica	Frequenza Allelica
	Popolazione MSK	Popolazione Controllo
rs4472867C/G	C=0.78 G= 0.22	C=0.83 G= 0.17 Chr371
rs4405241C/A	C= 0.60 A=0.40	C= 0.52 A=0.48 Chr1065
rs1800897C/T	C =0.97 T=0.03	C=0.87 T= 0.13 Chr290
rs1800898A/C	A= 0.79 C=0.21	A=0.67 C=0.33 Chr733
rs11190717G/A	G= 0.87 A=0.13	G= 0.89 A= 0.11 Chr251

**Tabella 11** Frequenze alleliche dei polimorfismi di Pax2 trovati nei probandi dei casi famigliari di MSK

Polimorfismo	Frequenza Allelica		Frequenza Allelica		
	Popolazione MSK		Popolazione Controllo		
rs74448744A/C	A=0.89	C=0.11	A=0.86	C=0.14	50chr
rs300568T/G	T=0.78	G=0.22	T=0.85	G=0.15	72chr
rs300572G/A	G=0.71	A=0.29	G=0.74	A=0.36	120chr
rs300573A/C	A=0.76	C=0.24	A= 0.62	C= 0.38	120chr
rs300574 C/T	C=0.74	T=0.26	C=0.59	T=0.41	22chr
rs300575G/C	G=0.89	C=0.1	G=0.98	C=0.02	58chr

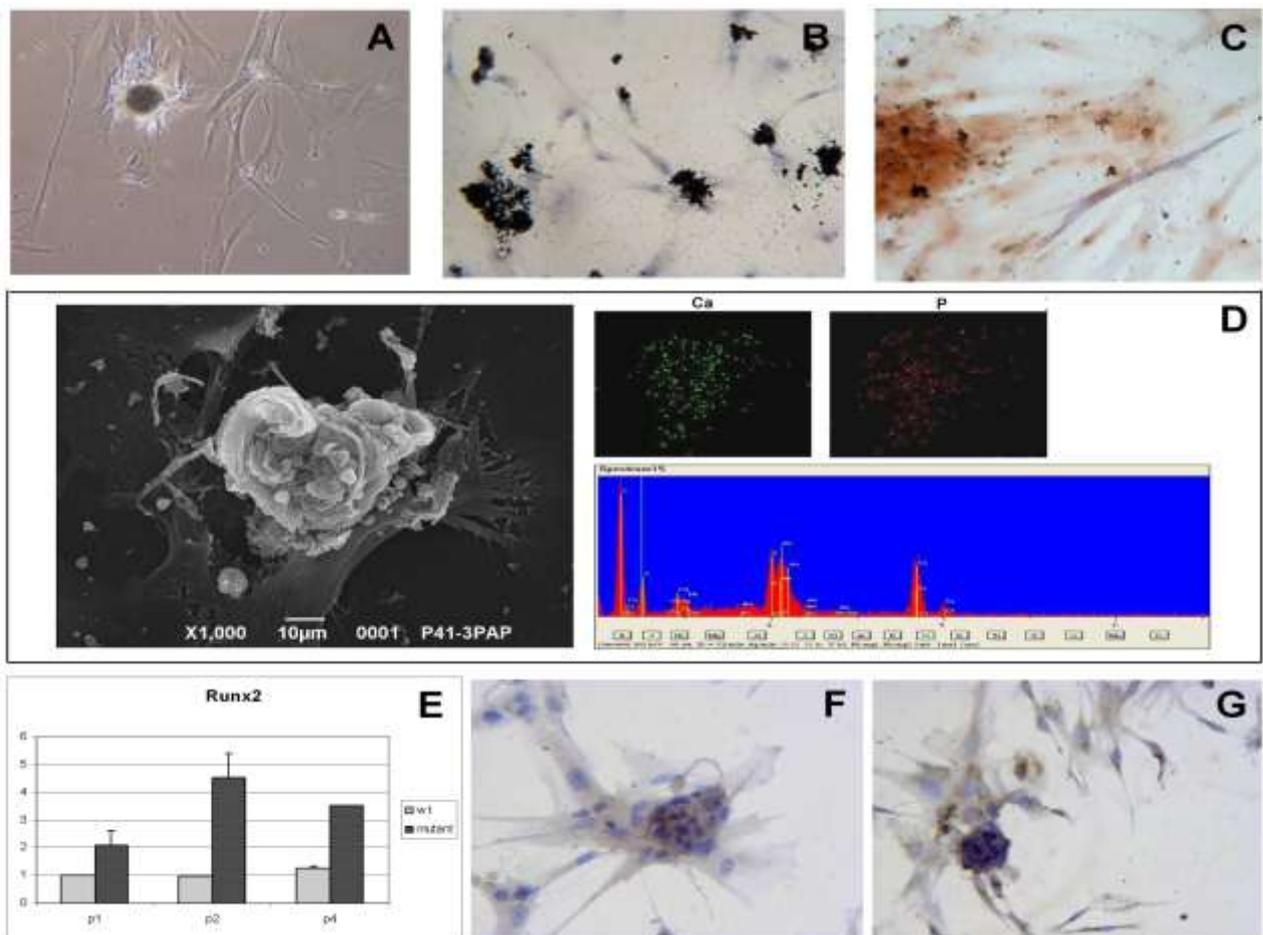
**Tabella 12** Frequenze alleliche dei polimorfismi di *Spry1* trovati nei probandi dei casi famigliari di MSK

Dai risultati ottenuti per lo screening dei geni sopra indicati non è stato possibile individuare delle differenze statisticamente significative tra le frequenze alleliche della popolazione MSK con quelle della popolazione di controllo riportate da vari database di riferimento (NCBI).

La prospettiva di allargare l'analisi alle restanti 14 famiglie delle 27 sopra menzionate, si spera possa dimostrare una significatività, mediante studi di associazione caso-controllo, per il polimorfismo del gene *SPRY* rs300575G/C. Si tratta di una variante rara (frequenza allele C=0.02), che nella popolazione MSK si presenta con una frequenza dello 0.1, superiore anche se non in maniera significativa a quella della popolazione generale.

## **STUDIO FUNZIONALE DI GDNF**

Ultima parte del mio lavoro di Dottorato è uno studio funzionale di GDNF mediante silenziamento genico in linee cellulari stabilizzate di cellule renali tubulari umane (HK2). L'idea prende corpo da un precedente lavoro di Dottorato *“ Nefrocalcinosi e placche di Randall: un processo di biomineralizzazione a livello renale? Studio cellulare e molecolare di un processo di calcificazione spontanea di cellule papillari in vitro”* condotto sempre presso il nostro laboratorio, e qui sommariamente riporto: l'asportazione di un carcinoma renale in una paziente affetta da MSK e mutazione GDNF (variazione intronica -27+18G/A) ha permesso di allestire delle colture primarie di cellule provenienti appunto da biopsia chirurgica di tessuto papillare prelevato da polo indenne. Le cellule in coltura già dal primo passaggio hanno mostrato una modalità di crescita quanto mai particolare organizzandosi in noduli mineralizzati, dove la colorazione von Kossa e l'analisi SEM ha dimostrato la presenza di depositi di fosfato di calcio e l'analisi immunohistochimica la presenza di marcatori osteogenici come osteocalcina, osteonectina e fosfatasi alcalina. Mediante RT-PCR semiquantitativa erano stati studiati i livelli di espressione di GDNF che sono risultati maggiori nelle cellule di controllo rispetto a quelle di MSK, in cui i livelli di espressione erano risultati quasi assenti (fig.21).



**Figura 21. Quadro riassuntivo di quanto era stato osservato nel precedente lavoro di dottorato** . (A) crescita in noduli mineralizzati; (B, C) depositi di fosfati di calcio messe in evidenza dalla colorazione von Kossa; (D) depositi di fosfati di calcio all'analisi SEM; (E,F,G) analisi dei marcatori osteogenici in immunocitochimica e RT-PCR.

Si era così ipotizzato che la differenza significativa di espressione di GDNF tra le cellule MSK e le cellule di controllo poteva essere dovuta al fatto che una sostituzione nucleotidica nella regione del promotore, avrebbe potuto influenzare i livelli di espressione del gene portando quindi ad una sua disregolazione. La differenziazione osteogenica osservata nelle cellule MSK sembrava suggerire un ruolo per la mutazione di GDNF e mettere così luce ad un meccanismo patogenetico nuovo per la nefrocalcosi in MSK.

Se il ruolo di GDNF nello sviluppo renale è noto, poche sono le informazioni riguardo il rene adulto. Sappiamo che è espresso a bassi livelli nelle cellule tubulari (78) che si upregola nei reni displasici o cistici (79) e nei podociti glomerulari e nelle cellule mesangiali agisce come fattore autocrino di sopravvivenza (80). Partendo da queste nozioni abbiamo ipotizzato che la down regolazione di GDNF osservata nelle cellule renali che in coltura hanno prodotto noduli di fosfato di calcio, possa essere stata la causa di un aumento dell'apoptosi nelle cellule che, incapaci di rispondere alle condizioni di coltura mettendo in moto una risposta adattativa di sopravvivenza, nel nostro caso rappresentata dall'up-regolazione di GDNF, hanno invece attivato il programma di morte cellulare. Sappiamo anche che nei fenomeni di calcificazione vascolare che sono oggetto di studi cellulari e molecolari approfonditi la generazione di vescicole apoptotiche possa essere uno degli eventi scatenanti il processo di calcificazione (81). Allo scopo di verificare se la down regolazione di GDNF fosse in grado di indurre la formazione di calcio fosfato in cellule renali umane, attraverso meccanismi patogenetici tutti da scoprire, tra cui ipotizziamo l'apoptosi possa avere un ruolo chiave, è stato condotto mediante RNA interference uno studio di silenziamento genico per GDNF su cellule HK2 in collaborazione il laboratorio di Biologia Sperimentale, Dipartimento di Scienze Biomediche e Sperimentali dell'Università di Padova.

Sono stati utilizzati 5 plasmidi codificanti gli shRNA forniti commercialmente e in cui l'analisi delle loro sequenze mostra complementarità con diversi tratti diversi dell'RNA messaggero (fig.22). Più precisamente i shRNA si appaiano nel cDNA a livello della regione codificante dell'esone 5 (fig.22). La tecnica dell'interference permette il silenziamento stabile del gene mediante l'integrazione delle sequenze trasfettate nel genoma cellulare. Tutti i plasmidi, anche quelli dei controlli negativi, codificano anche per la resistenza alla puromicina per cui mediante l'aggiunta al

terreno di coltura dell' antibiotico puromicina è stato possibile selezionare le cellule efficacemente trasfettate.

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che le cellule HK2 wt sono sensibili alla puromicina anche dopo 24 ore. Già alla concentrazione più bassa testata ovvero 0.125mM la puromicina causa una certa tossicità cellulare. La puromicina è stata utilizzata alla concentrazione di 0.75mM che è risultata essere la minima concentrazione efficace per determinare la morte di più del 95% delle cellule dopo 24 ore di incubazione. Dopo circa una settimana di selezione con puromicina 0.75μM sono stati ottenuti i primi cloni che avevano integrato gli shRNA di nostro interesse ed i primi cloni che avevano integrato il plasmide di controllo.

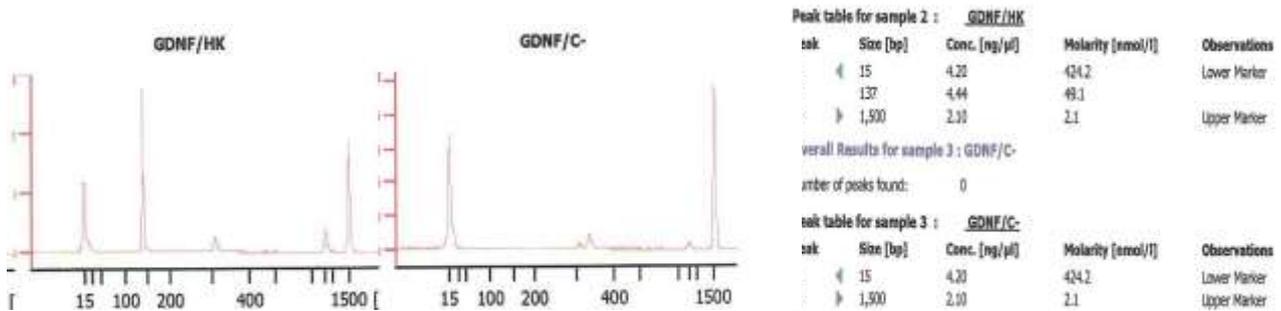
Dopo tre settimane i cloni hanno generato delle linee che crescevano similmente alle HK2 wt e che rispetto a queste non mostravano sostanziali differenze fenotipiche apprezzabili all'osservazione al microscopio.

pGDNF-1 pGDNF-2 pGDNF-3 pGDNF-4 pGDNF-5

CACTCAGTATTCCAGATGAAGGTAGCCATAGTGGAAAGGCCTCAGTTTTTACCCTCTAA  
 GACGGTGTCTCTCAAAGTTTAGTGCGTGGATCTTTGGTGTGTGGATCTTTTACATTAGAA  
 TTCCTTGAGGCTTGTAGAAATGCAGATTCCTTGGTCCCTCCCCAGACCAAATGACTCAT  
 TGTCTCCAAGGGTAGGGCCAAGAATCTGCATGGTAGTCAATATCCAGGGTATTTTCTGC  
 ATATTCACATTTGAGAACCACTACTCTAGGTTGTGTGACTAGGCAAGAAAAATGCCCTA  
 GAAGATTGGCCAGCTCACAGCAAGCTCTGCATGGACTTGTTAAAAATGGTGAATGTTATT  
 CAAATGAAAATATGCTTCTAAGGATTTGTTTTCTTCGAGAAAGTATGTCACCACCACAT  
 TAGTCTCTCTTCCAATAATCATCTTTCTTCTGTGCATTTTTGCCTCTGTTTTGGGG  
 ATTACAGTGGTCTATAGCTTAATCGGCTGATAGTTTTGCTGTGGGTCCAATTTTTGCTG  
 ACTTAGGGGGGCACCTTGATCTTGAAGACGGCTTGAATGATCATTTTGTCTCATGTGC  
 CATTTTCTCTTTCTTTTGAACAGCAAATATGTCAGAGGATTATCCTGATCAGTTTCGAT  
 GATGTCATGATTTTTATTCAAGCCACCATTAAGAACTGAAAAGGTCACCAGATAAACAA  
 ATGGCAGTGCTTCTAGAAGAGAGCGGAATCGGCAGGCTGCAGCTGCCAACCCAGAGAAT  
 TCCAGAGGAAAAGGTCGGAGAGGCCAGAGGGGCAAAAACCGGGTTGTGTCTTAAGTCA  
 ATACATTTAAATGCACTGACTTGGGTCTGGGCTATGAAACCAAGGAGGAAGTATTTTT  
 AGGTACTGCAGCGGCTTTCGATGCACTGAGACAACGTACGACAAAAATTGAAAAAC  
 TTATCCAGAAATAGAAGGCTGGTGAGTGACAAAGTAGGGCAGGCATGTTGCAGACCCATC  
 GCCTTTGATGATGACCTGTCGTTTTAGATGATAACCTGGTTTACCATATTCTAAGAAAG  
 CATTCCGCTAAAAGGTGTGGATGTATCTGACTCCGGCTCCAGAGACTGCTGTGATTGCA  
 TTCCTGTACAGTGCAAAGAAAGGGACCAAGGTTCCAGGAAATGTTTGCCAGAATGGA  
 AGATGAGGACCAAGGAGGCGGAGGAGGAAGAAGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 AGGAGGAGGAGGAAGGCAGCCATCATGGGAGCCTGGTAGAGGGAGATCCAGCTACAGACA  
 ACTGGACAGGAGAGAGAGAAAAACAGCCCTCTGGATTCTCAGGATGGCAGCCGATGTAC  
 TAGAAGCTCAGGGCTGATGTTCTGTTGGCTATTGCCACCATTTAGCTGATACAGTCC  
 ACCACTACTGATTACCGGCGCGTTGCGGTGGATGCACTTGAACCAAACAGTGTATCTC  
 CTGTGATTTGTTTTCATGTGTCCGAAGACACCAGGGAAACAGAGATCCTGGTGTGTTCC  
 TTGTTATTACGTTTTACTGCTGAAAGTAAGAGGTTTTATTTTCTGTCAGTCAAGTGGAGAC  
 ATACCCTGGAAAGGAGAGGGGAAAAAAAAAAGCAAAGATACAAGAGATAATCACCTTTGCA  
 TTTGAAAGTTGAGGCCGAGGTTACTACAACCAGCATTGTTGCAACGGTTGGTGATTG  
 ATTTCCATCACGGTGTGTGGGTGGGAAGAAGTTGGCTAGGAACCAAAAAGGCTGTGCTC  
 ATGATTAACACAAACCTGAAGTATTTCTTTATGTCCTTGAAACAGGAAACGAGTTG  
 TGGTTTTCGCCAGCATTCTGTAGGAGAGAATCGGGGAAGGCCCGAACTGCCCCGGGC  
 AGGGAGAGCCCCTCAGGCCTGTTGGTTACAGAGAGACAGATGTTACATAACCAGCTCCG  
 TTGATGCGTGGTCACCAGTGACCAGAGAAGCTACTCGATGCAATGCATCTGTTTCAGATA  
 CAGAAATATAGAGAAGATATTTATTGAAATTAAGTTATTGTTATTTATTACCGTTCACT.....

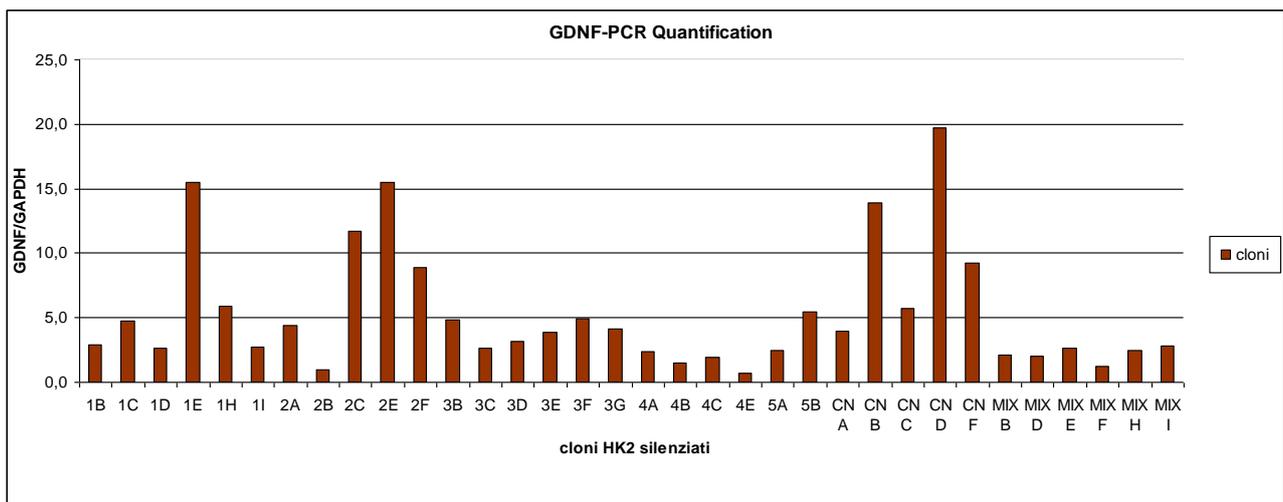
**Figura. 22 Sequenza di cDNA di GDNF.** Le sequenze evidenziate con i cinque colori diversi corrispondono alle sequenze degli shRNA utilizzate per il silenziamento di GDNF. Gli shRNA utilizzati bastano nella regione codificante dell'esone 5 di GDNF.

L'analisi di espressione ha dimostrato che le cellule HK2 wilde type esprimevano costitutivamente il GDNF (fig.23).



**Figura 23** Espressione di GDNF in cellule HK2 wilde type in Agilent 2110 Bioanalyzer

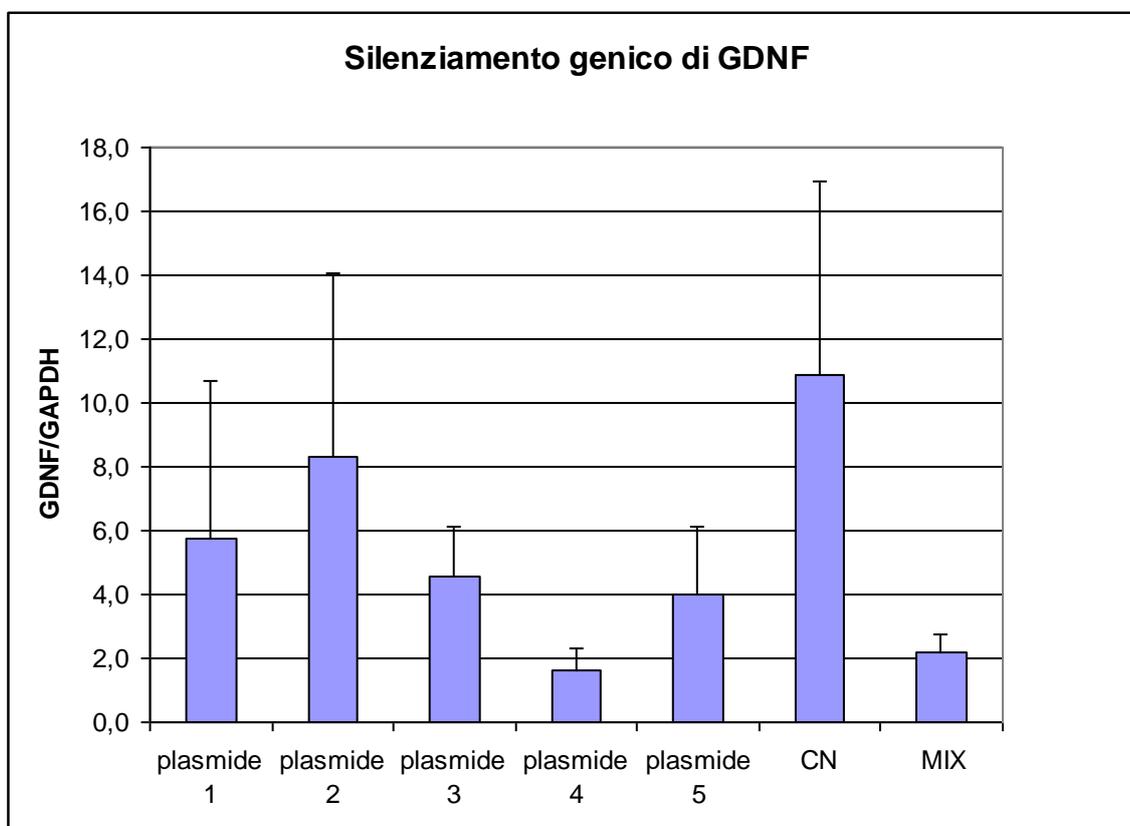
Per ogni tipo di plasmide utilizzato è stato possibile isolare più cloni. I cloni originati dalla trasfezione con i plasmidi codificanti gli shRNA antisense sono stati analizzati in real time PCR e hanno mostrato una significativa riduzione dell'espressione di GDNF seppur variabile nei diversi cloni anche appartenenti ad uno stesso plasmide (fig.24).



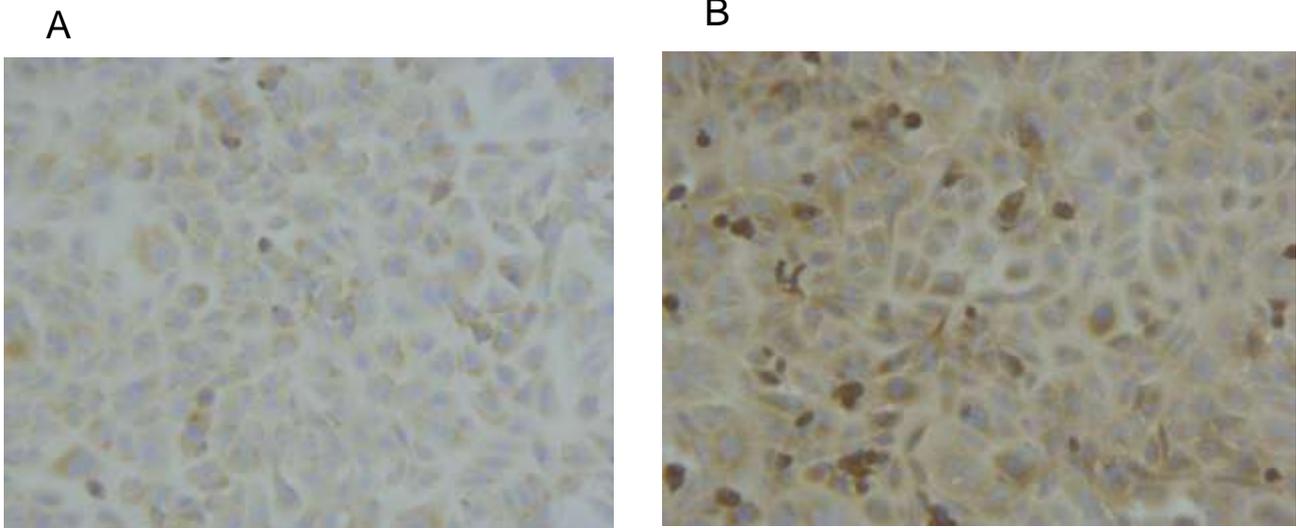
**Figura 24.** Espressione di GDNF nei cloni originati dalla trasfezione con shRNA. Più cloni sono stati isolati per ogni tipo di plasmide utilizzato. La percentuale di silenziamento ottenuta varia nei diversi cloni : cloni 1B-I plasmide 1, cloni 2 A- F plasmide 2, cloni 3 B-G plasmide 3, cloni 4 A- E plasmide 4, cloni 5 A-B plasmide 5, cloni CN A-F plasmide vuoto, cloni mix B-I tutti plasmidi.

La percentuale di silenziamento ottenuta, che varia nei diversi plasmidi, è risultata essere nel complesso superiore al 50% con un silenziamento anche dell'80% per il plasmide 4 e Mix .

L'avvenuto silenziamento è stato verificato anche a livello proteico mediante immunocitochimica con anticorpo anti GDNF. L'analisi è stata condotta sui cloni 4E, 2B, 3D, CN<sub>C</sub>. Da questa analisi è risultato che il clone maggiormente silenziato a livello proteico risultava essere il 3D (fig.26).

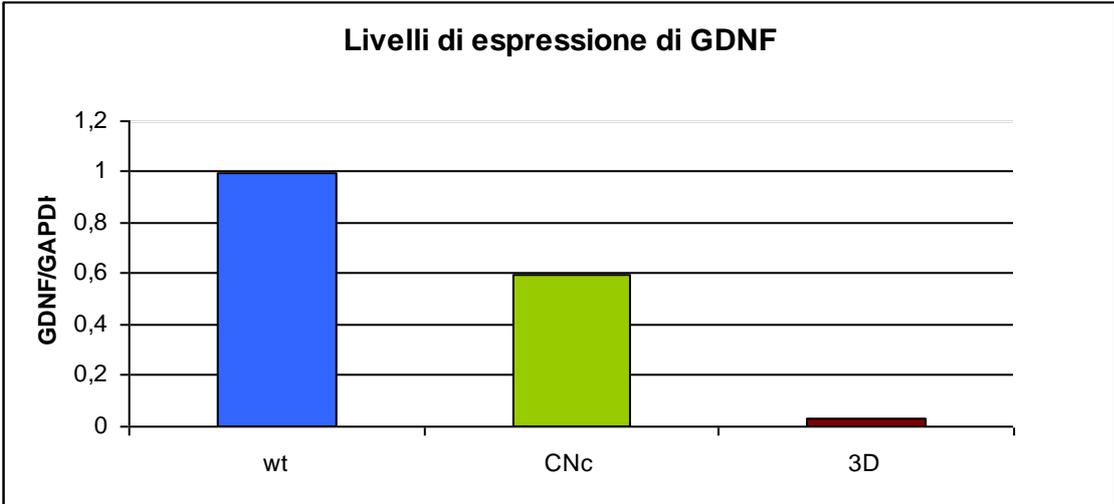


**Figura 25. Livello di espressione di GDNF ottenuto per i diversi plasmidi.**



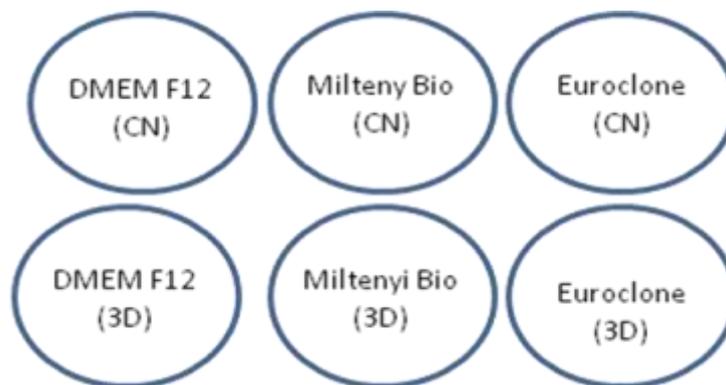
**Figura. 26 Studio immunocitochimico per la proteina GDNF.** Diversa espressione di GDNF tra il clone 3D (A) e il controllo negativo (CNC)

Per gli esperimenti successivi di stimolazione osteogenica è stato quindi scelto il clone 3D silenziato e il clone di controllo CNC. Il livello di espressione di GDNF nel clone silenziato e in quello di controllo è stata di nuovo verificato mediante Real time PCR e normalizzato con il gene housekeeping GAPDH (fig.27).



**Figura. 27 Espressione di GDNF nel clone 3D.** HK2 wilde type (wt); controllo negativo (CNC) e clone 3D

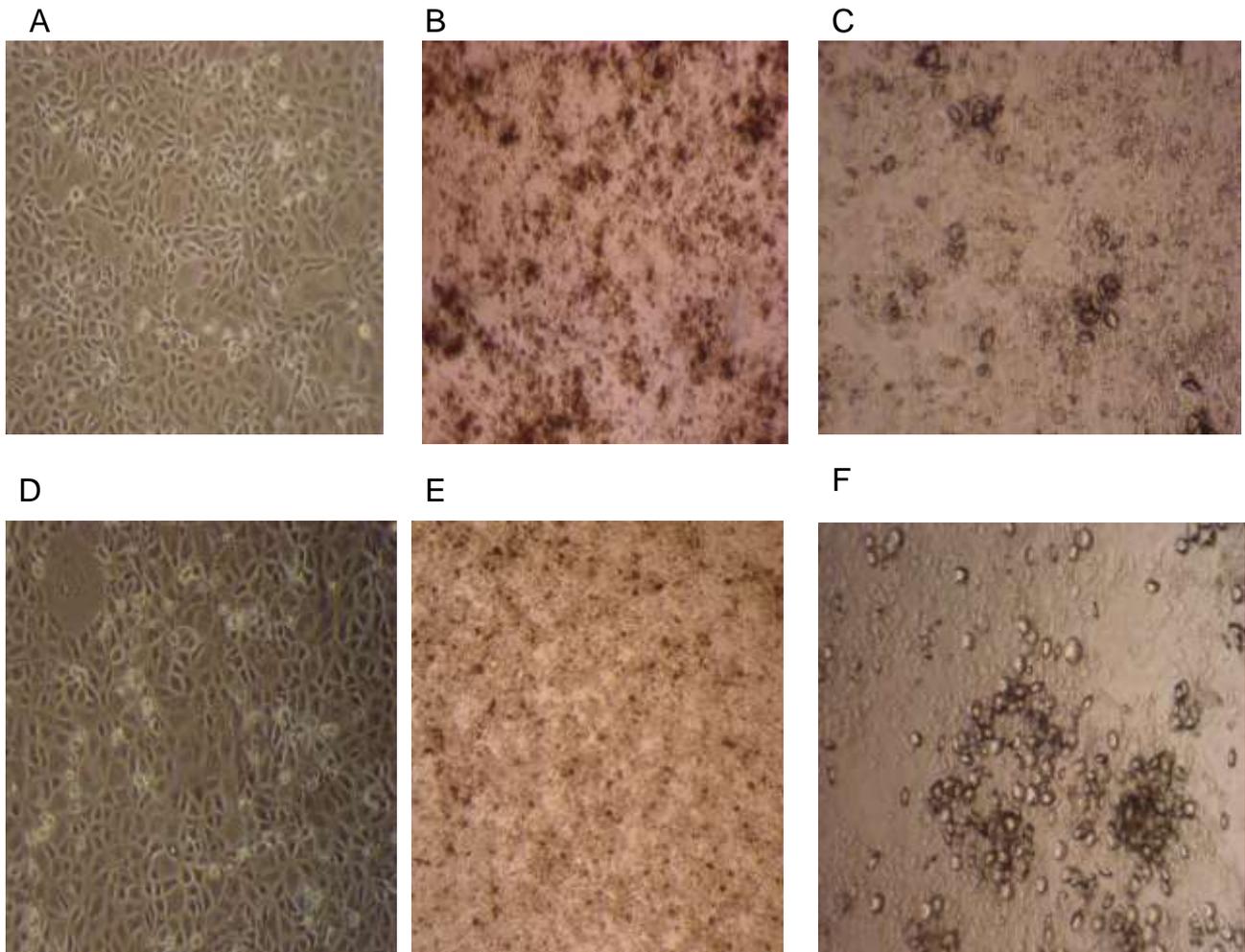
Quindi le cellule HK2 silenziate (3D) e il controllo negativo (CN<sub>C</sub>) sono state seminate in piastre ad una densità di  $3 \times 10^4$ /pozzetto per 15gg i terreni di stimolazione osteogenica Miltenyi ed EuroClone. Di contro per un controllo di riferimento interno è stata fatta una semina in terreno base, DMEM F12 10%FCS (fig.28).



**Figura. 28 Organizzazione piastra per esperimento di stimolazione osteogenica.** Le cellule HK2 utilizzate sono state seminate in terreno di base (DMEM-F12 10%FCS) ; in terreno di stimolazione osteogenica (Miltenyi Biotech) e in terreno di stimolazione osteogenica (Euroclone).

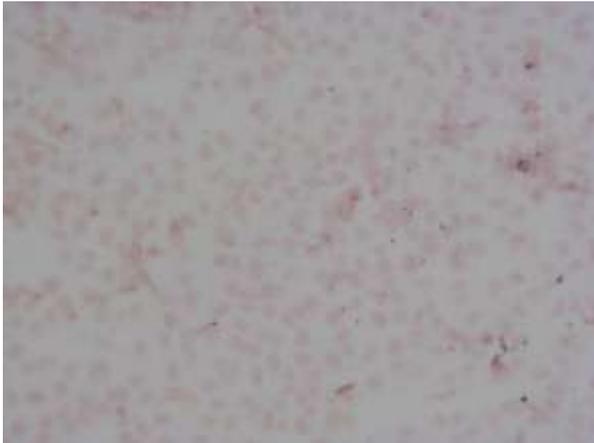
I dati preliminari di questi esperimenti hanno mostrato in condizione di stimolazione osteogenica

- in entrambi i terreni una crescita in multistrato con formazione di ammassi cellulari con nuclei picnotici, molto più evidente nel clone silenzioso e nel terreno Miltenyi (fig 29).
- la presenza in uno dei due terreni utilizzati (Miltenyi), di aggregati di fosfato di calcio. La deposizione di calcio è stata rilevata dalla colorazione von Kossa e di fosfato di calcio dall'analisi SEM (fig.30 ,31).
- la presenza nel secondo terreno utilizzato (Euroclone) di cristalli di calcio come rilevato dalla colorazione Von Kossa e dall'analisi SEM di carbonato di calcio (fig.30,31).

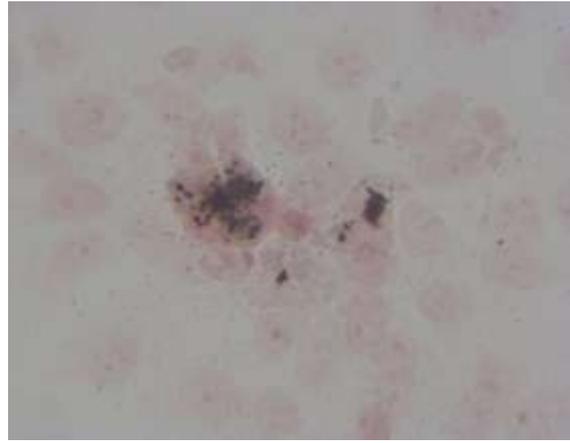


**Figura 29** Analisi della stimolazione osteogenica al microscopio ottico invertito. Clone silenziato (3D) in DMEM F12 10% FCS, **A**; in terreno Miltenyi Biotech, **B**; in terreno Euroclone, **C**. Controllo CNC In DMEM F12 10%FCS,**D**; in terreno Miltenyi, **E**; in terreno Euroclone, **F**.

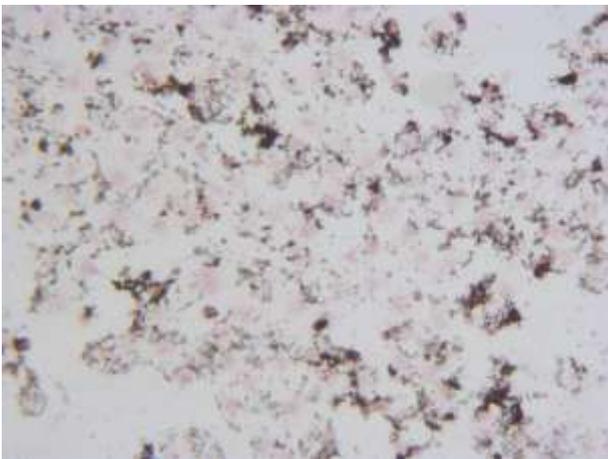
A



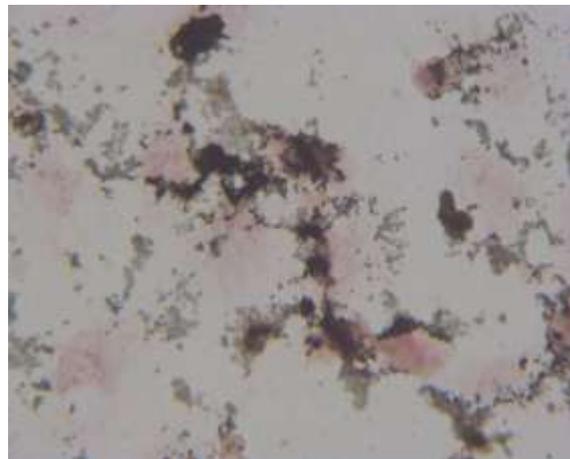
B



C



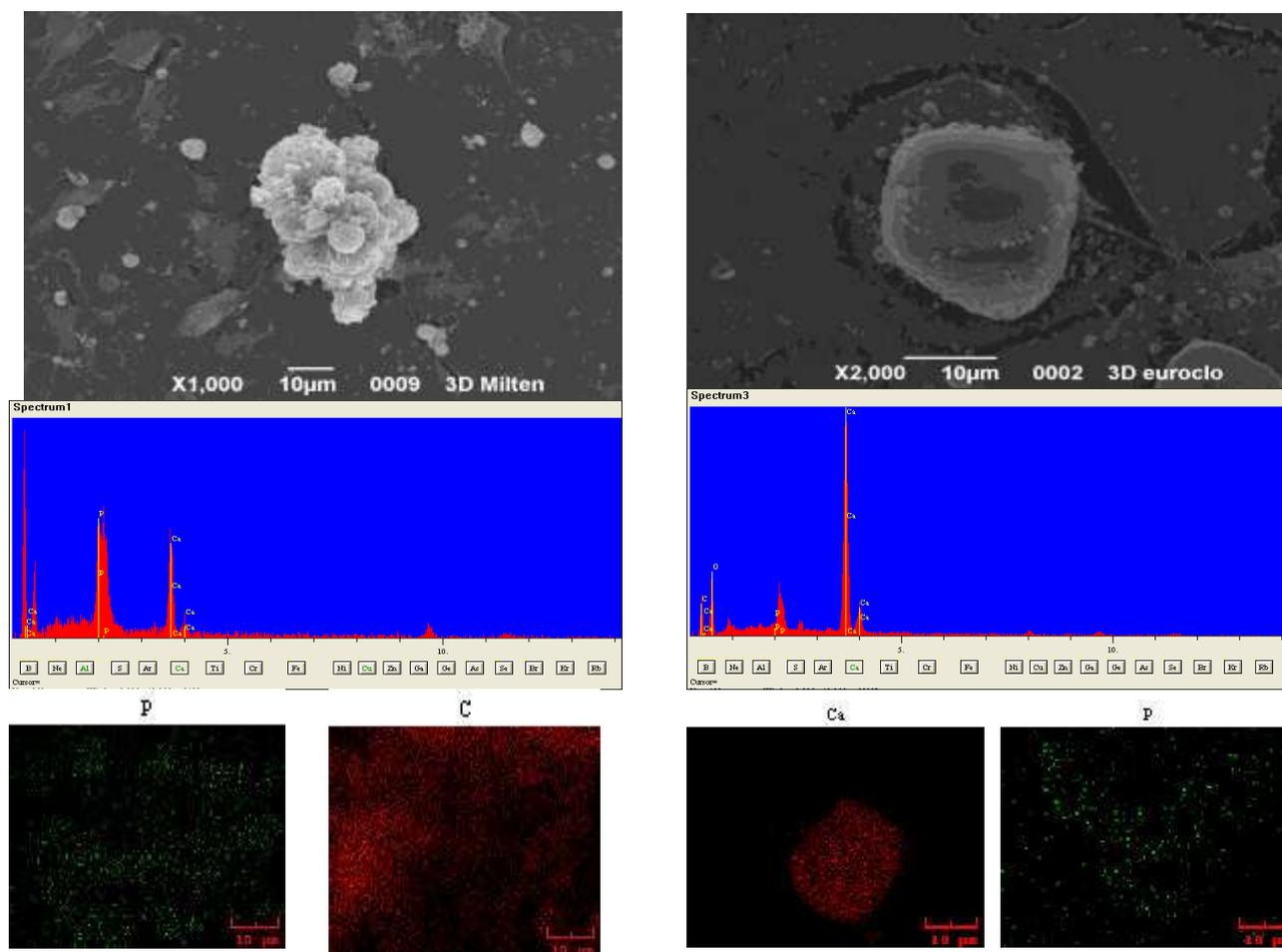
D



**Figura 30 Colorazione von Kossa al microscopio ottico . E' possibile apprezzare la differenza di deposizione di calcio tra i due cloni. Controllo negativo CNC (20X),A; controllo negativo CNC (10X) B; clone 3D (20x),C; clone 3D (10X), D.**

### Clone 3D

### Clone CNc



**Figura 31 . Analisi al microscopio elettronico (SEM) dei depositi di fosfato di calcio per il clone 3D rilevati dopo stimolazione osteogenica (Miltényi Biotec) e dei depositi di carbonato di calcio per il clone 3D rilevati dopo stimolazione osteogenica (Euroclone). In basso sono riportate le relative mappe di distribuzione del fosfato (verde) e calcio (rosso) in cui si nota la co-localizzazione in 3D miltényi ed una non co-localizzazione in 3D euroclone.**

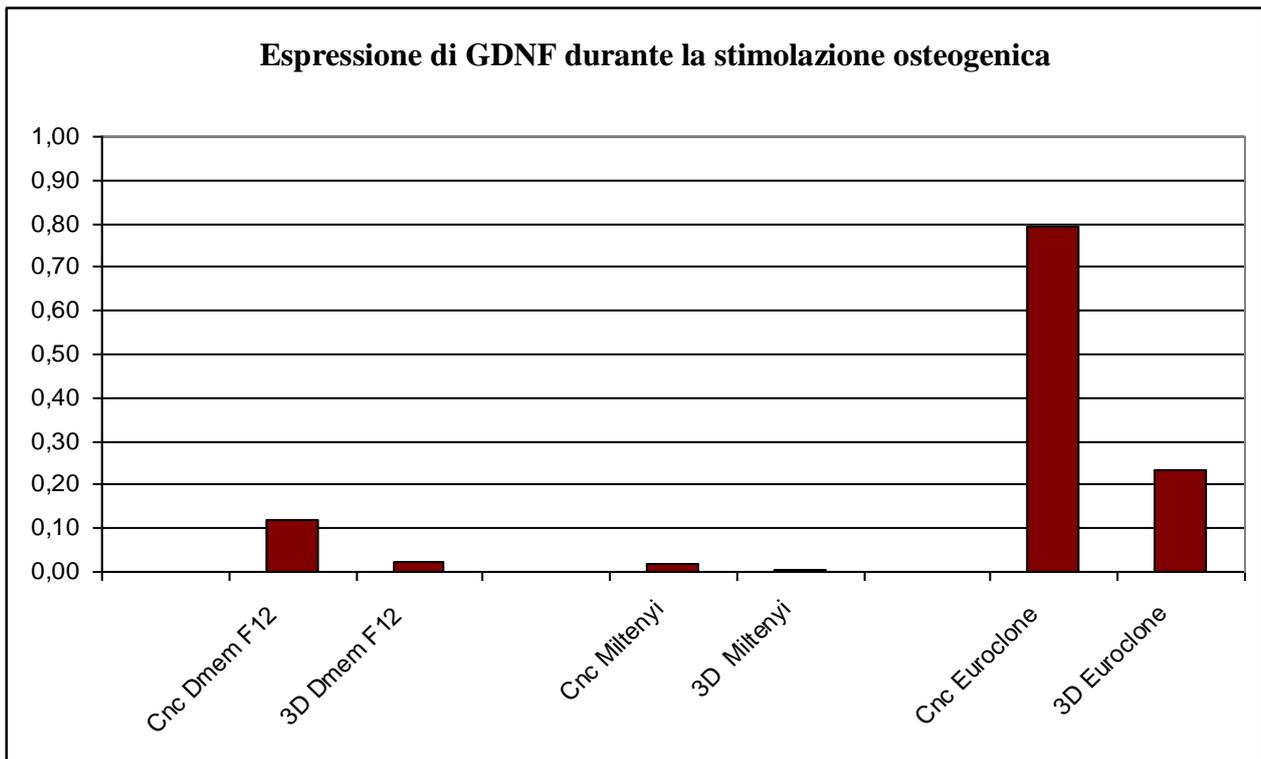
I depositi di fosfato di calcio non sono stati osservati nelle cellule cresciute in condizioni normali, mentre nel controllo negativo in condizioni di stimolazione osteogenica la deposizione dei fosfati di calcio era presente seppur in quantità significativamente inferiore a quella osservata nel clone silenziato. Anche la deposizione di carbonato di calcio era presente nel controllo negativo, ma questa

volta in misura maggiore che nel clone silenziato. I risultati sono stati confermati in tre esperimenti indipendenti.

Se la deposizione di fosfato di calcio sia avvenuta attraverso un processo di osteogenesi, simile a quella osservate nelle cellule MSK in coltura è tutto da verificare. Il nostro passo successivo sarà quello di analizzare mediante immunocitochimica e RT/PCR la presenza di marcatori osteogenici quali RUNX2, Osteonectina, Osteopontina e osteocalcina, nonché la presenza della fosfatasi alcalina.

Sui cloni utilizzati per gli esperimenti di stimolazione e sulle cellule wt è stato fatto il test per la proliferazione cellulare secondo il metodo colorimetrico riportato nei materiali e metodi. Le cellule HK2 del clone 3D, le cellule del controllo negativo e le HK2 wilde type sono state rispettivamente seminate alla densità di  $4 \times 10^4$ / pozzetto e per ogni clone sono state organizzate 5 piastre corrispondenti ai diversi giorni di osservazione (0, 1g, 2g, 3g, 4g). Ai tempi stabiliti le cellule sono state fissate in metanolo assoluto freddo e successivamente colorate con una soluzione blu di metilene. La crescita cellulare è stata valutata mediante lettura allo spettrofotometro e i risultati ottenuti (in triplicato per ogni tempo di osservazione di ogni clone) sono stati graficati mediante analisi statistica di base. Secondo quanto emerge dal grafico le cellule HK2 wt e le cellule di controllo CN<sub>c</sub> hanno mostrato un andamento di crescita sovrapponibile (fig. 33). Andamento diverso per il clone silenziato 3D in cui già a 2gg sembra subire un rallentamento nella crescita cellulare.

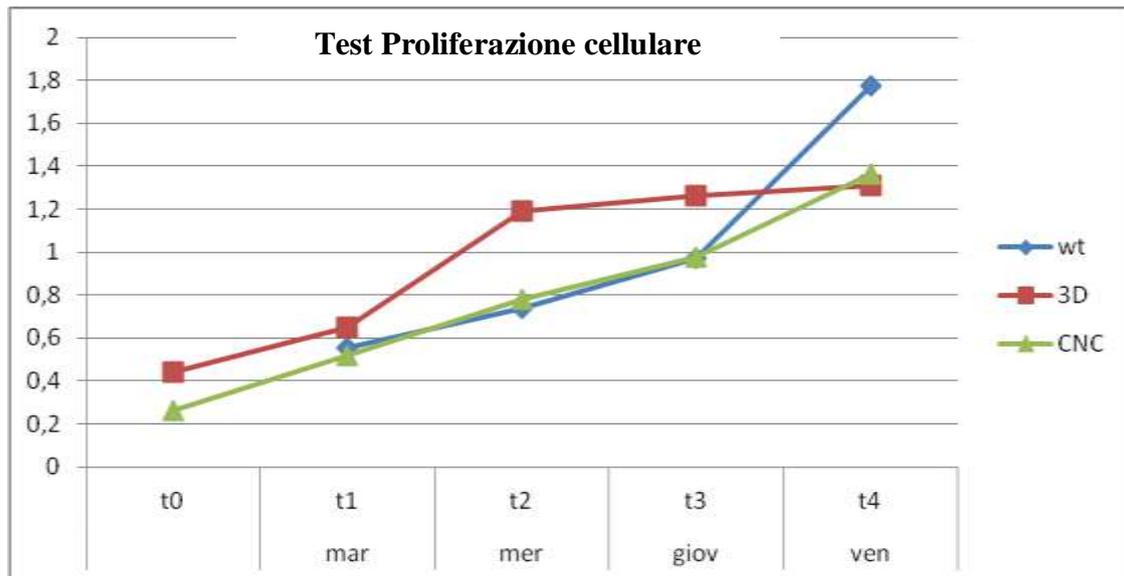
I livelli di espressione di GDNF sono stati monitorati nell'esperimento di induzione osteogenica. Dalla figura emerge che il clone 3D continua, nelle diverse condizioni di coltura continua a mantenere livelli di espressione di GDNF inferiori a quelli del clone di controllo (fig. 32).



**Figura 32** Espressione di GDNF durante la stimolazione osteogenica. I cloni CNC e 3D con i due rispettivi terreni (Miltenyi ed Euroclone).

Si è ipotizzato pertanto che la down regolazione osservata per GDNF nelle cellule HK2 possa aver favorito la deposizione di fosfati di calcio attraverso un meccanismo non ancora identificato.

Da questi risultati assolutamente preliminari emergono, tuttavia, delle evidenze indirette che l'apoptosi possa avere avuto un ruolo nel fenomeno osservato. La presenza di ammassi cellulari con nuclei picnotici e il rallentamento già a 2 giorni, in terreno standard, della proliferazione sembra attribuibile ad un processo di apoptosi in corso. E' quello che ci proponiamo di approfondire in successivi esperimenti.



**Figura 33** Risultati del test fatto per la valutazione della proliferazione cellulare delle cellule wt, del controllo negativo (CNC) e del clone silenziato 3D.

Sebbene preliminari il risultato di questi esperimenti di silenziamento si ricollegano a quanto osservato in precedenza in cui le cellule papillari renali da biopsia chirurgica di una paziente affetta da MSK e con mutazione GDNF avevano spontaneamente calcificato. La down regolazione di GDNF potrebbe avere un ruolo in questo fenomeno. Questo suggerisce un possibile meccanismo patogenetico per MSK e potrebbe mettere alla luce un nuovo concetto di nefrocalcinosi.



## **CONCLUSIONI**

*Le basi molecolari dell'embriogenesi renale sono in gran parte ancora da individuare. L'embriogenesi renale è un processo complesso i cui eventi molecolari risiedono nell'interazione di geni diversi, le cui alterazioni potrebbero spiegare sia i meccanismi che la familiarità di malformazioni renali. La comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono a tali anomalie potrebbe dare in futuro, maggiori possibilità per una loro diagnosi, prevenzione e cura. Tra le malattie malformative renali rientra il Rene con Midollare a Spugna (MSK). Per MSK, prima dell'interesse posto dal mio gruppo di ricerca non sono stati mai stati condotti studi genetici. L'aver identificato delle varianti rare del gene GDNF associate in maniera quasi causativa alla malattia ci ha permesso di rafforzare per MSK l'ipotesi di una componente genetica già suggerita dalla descrizione di alcuni casi familiari, dall'appartenenza al gruppo delle patologie malformative e dalla sua associazione con altre malattie ereditarie. In questi anni di lavoro di dottorato la casistica di MSK è stata incrementata fino a 112 pazienti e il coinvolgimento di GDNF sulla patologia si è ulteriormente rafforzato, almeno in un sottogruppo di pazienti. L'attenzione per MSK è stata posta riguardo anche la necessità di approfondire l'ereditarietà di questa patologia. Dal nostro studio è emerso che, contrariamente a quanto riportato in letteratura con i pochi casi famigliari di MSK descritti, la familiarità in MSK è più che frequente,*

*poiché nel 54% dei casi vi erano famiglie in cui almeno un altro parente, oltre al probando, presentava riscontro radiologico di malattia che segregava nella modalità autosomica dominante. Alla luce di quanto osservato, questo potrebbe indicare che la malattia sia sotto diagnostica e avere nella popolazione una prevalenza maggiore di quanto stimato.*

*Infine la possibilità di studiare l'aspetto funzionale delle alterazioni geniche trovate ci ha permesso di individuare per GDNF un ruolo quanto mai nuovo nell'ambito della nefrocalcinosi in MSK o della nefrocalcinosi in generale. La down regolazione di GDNF precedentemente osservata in cellule MSK che avevano spontaneamente calcificato , e la down regolazione di GDNF da noi indotta mediante RNA interference, in cellule HK2 che ha portato alla deposizione di calcio fosfato in condizioni di stimolazione osteogenica, sembra rappresentare un fattore che non può essere trascurato per il processo di calcificazione osservato. Se la down regolazione di GDNF in cellule epiteliali normali possa essere causa o concausa del processo di calcificazione come quello osservato in MSK sicuramente avrà bisogno di ulteriori conferme ma l'aver individuato nel fenomeno appena indicato il coinvolgimento di GDNF potrebbe porre luce su un nuovo concetto di nefrocalcinosi non soltanto come puro squilibrio chimico-fisico ma anche come un meccanismo che, a fianco ad uno sbilanciamento ionico dell'ambiente, vede attivamente coinvolte cellule del tessuto renale, protagoniste di deposizione di materiale minerale. I meccanismi molecolari di questo nuovo processo di nefrocalcinosi non sono stati identificati. Nel sostenere in questo senso il*

*coinvolgimento di GDNF ipotizziamo che GDNF potrebbe rappresentare per le cellule epiteliali tubulari renali, come per i podociti, un fattore adattativo di sopravvivenza, e la sua down regolazione potrebbe indurre apoptosi in cellule in coltura. La formazione di corpi apoptotici è per alcune cellule, come per le cellule muscolari lisce vascolari, un fattore d'inizio di calcificazione ectopiche in particolari condizioni. Questo potrebbe valere anche per le cellule tubulari renali. Se l'apoptosi dovesse dimostrarsi un importante evento nella patogenesi della nefrocalcinosi, allora noi dovremmo assumere che qualsiasi danno, che induce uno sbilanciamento del rapporto sopravvivenza/apoptosi a favore dell'apoptosi, potrebbe portare al fenomeno della biomineralizzazione dell'interstizio renale in associazione a particolari condizioni locali del tessuto renale.*





## **BIBLIOGRAFIA**

- 1. Gambaro G**, Feltrin GP, Lupo A et al. *Medullary sponge kidney (Lenarduzzi- Cacchi- Ricci disease): A Padua Medical School discovery in the 1930s*. *Kidney Intern.* 69: 663-70; 2006.
- 2. Maschio G**, Tessitore N, D'Angelo A et al. *Medullary sponge kidney and hyperpara thyroidism- a puzzling association*. *Am J Nephrol* 2:77-84;1982.
- 3. Dablal PW**, Jordan RM, Dorfman SG et al. *Medullary sponge kidney and renal -leak hypercalciuria. A link to the development of parathyroid adenoma?* *JAMA* 241: 1490-91; 1979.
- 4. Pesce C**, Colombo B, Nicolini E et all. [*Medullary sponge kidney with severe renal function impairment: a casa report*]. *Pediatria Med Chir* 17: 65-67; 1995.
- 5. Kinoshita H**. [*Clinical studies on medullary sponge kidney evaluated from urolithiasis*]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi Japan J Urol* 81: 372-379; 1990.
- 6. Dell'Adami G**, Meneghini C. *Il rene a spugna : prima osservazione in consanguinei*. *Arch Ital Urol* 27 :81-83;1954.
- 7. Copping GA**. *Medullary sponge kidney in three generations*. *NY State J Med* 71: 2665-2669; 1971.

8. **Patriquin HB**, S O'Regan. *Medullary sponge kidney in childhood*. AJR 145:315-19;1985.
9. **Toyoda K**, Y Miyamoto, Ida M et al. Hyperchoic medulla of the kidneys. Radiology 173: 431-34; 1989.
10. **Schepens D**, Kuypers G, Vanrenterghem Y. *Renal cortical nephrocalcinosis*. Nephrol Dial Transplant 15: 1080-82;2000.
11. **Choyke PL**, Siegel MJ, Oz O et al. *Non malignant*
12. *renal disease in pediatric patients with Beckwith-Wiedemann syndrome*. Am J Roentgen 171:733-37;1998.
13. **Goldman M**, Shuman C, Weksberg R et al. *Hypercalciuria in Beckwith-Wiedemann syndrome*. J Pediat 142: 206-8; 2003.
14. **Chesney W**, R Kaufman, Stapleton FB. *Association of medullary sponge kidney and medullary dysplasia in Beckwith-Wiedemann syndrome*. J Pediatrics 115: 761-4;1989.
15. **Kerr D**, Warrick C, Hart- Mercer J. *Paternal uniparental disomy in monozygotic twins discordant for hemihypertropy*. J Med Genet 40:223-6;2003.
16. **Schedl A**, Hastie ND. *Cross-talk in kidney development*. Curr Opin Genet Develop 10: 543-9; 2000.

17. **3°CONVEGNO PEDIATRICO: Anomalie Congenite Renali;**  
<http://www.msitalia.it/altre/manuale/sez19/2612385d.html>
18. **Wolf AS.** Embriology of the kidney. *Pediatr Nephrology* 19;1999.
19. Salomon R, Attiè T, Pelet A et al. Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 14(3):345-7; 1996.
20. **Schedl A,** Hastie ND. *Cross-talk in kidney development.* *Curr Opin Genet Develop* 10: 543-9; 2000.
21. **Gambaro G,** Fabris F, Citron L et al. *An usual association of controlateral congenital small kidney, reduced renal function and hyperparathyroidism in sponge kidney patients: on the track of the molecular basis.* *Nephrol Dial Transplant* 20: 1042-7;2005.
22. **Gambaro G,** Citron L, Romano P. *Rene con midollare a spugna.* *Giornale di tecniche nefrologiche e dialitiche.* N4 Anno XVII;2005.
23. **Costantini F** and Shakya R. *GDNF/ RET signaling and the development of the kidney.* *BioEssays (Reviews)* 28.2: 117-127; 2006.

24. **Sampogna R V** and Nigam S K. *Implications of gene networks for under standing resilience and vulnerabilit  in the kidney branching program.* Physiology (Reviews) 19:339-347, 2004.
25. **Schuchardt A**, D'Agati V, Larsson-Blomberg et al. *Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret.* Nature 367(6461):380-3;1994.
26. **Sanchez MP**, Silos-Santiago I, Fris n J et al. *Renal genesi and the absence of enteric in mice lacking GDNF.*Nature 382(6586):70-3,1996.
27. **Moore MW**, Klein RD, Farinas I et al. *Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF.* Nature 382(6586):76-9;1996
28. **Srinivas S**, Wu Z, Chen CM et al. *Dominant effects of RET receptor misexpression and ligand-independent RET signaling on ureteric bud development.*Development 126(7): 1375-86; 1999.
29. **Pichel JG**, Shen L, Sheng HZ et al. *Defects in enteric innervations and kidney development in mice lacking GDNF.* Nature 382 (6586): 73-6;1996.
30. **Liapis H.** Biology of congenital obstructive nephrology. Nephron Exp Nephrology; 93:e 87-91;2002.
31. **Matti S**, Airaksinen, Saarma M. *The GDNF Family: signalling, biological functions and therapeutic value.* Nature Rewiews; vol 3 383-393; 2002.

32. **Eketjall S**, Fanzilber M, Murray-Rust J et al. *Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRa1 and activation on the GFRa1-c RETreceptor*. EMBO J 18:5901-5910; 1999.
33. **Brodbeck S**, Englert C. Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/SIX gene network. *Pediatr Nephrol* 19:249-255;2004.
34. **Esquela AF**, Lee SJ. *Regulation of metanephric kidney development by growth/ differentiation factor 11*. Dev. Biol 257:356-370; 2006.
35. **Rodriguez- Soriano J**, Vallo A, Bilbao JR et al. *Branchio-oto-renal syndrome: identification of a novel mutation in the EYA1 gene*. Pediatric Nephrol 16:550-553; 2001.
36. **Buller C**, Xu X, Marquis V et al. *Molecular effects of Eya1 domains mutations causing organ defects in BOR syndrome*. Human Mol Genet 10: 2775-2781; 2001.
37. **Xu PX**, Adams J, Peters H et al. *Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia*. Nat. Genet 23:113-117;1999.
38. **Wellik DM**, Hawkes PJ, Capecchi MR. *Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction*. Genes Dev 16: 1423-1432; 2002.

39. **Brophy PD**, Ostrom L, Lang KM et al. *Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene*. Development 128: 4727-4756;2001.
40. **Torres M**, Gomez-Pardo E, Dresser GR et al. *Pax-2 controls multiple steps of urogenital development*. Development. 121: 4057-4065;1995.
41. **Bouchard M**. *Transcriptional control of the kidney development*. Differentiation 72(7):295-306;2004.
42. **Ellemich HL**, Kos L, Cho ES et al. *Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggest multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interaction*. Mech Dev. 54(1):95-105;1996.
43. **Tsui CC**, Shankland SJ, Pierchala BA. *Glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors reti s a novel ligand-receptor complex critical for survival response during podocyte injury*. J Am Soc Nephrol. 17(6):1543-46;2006.
44. **Shi H**, Patchan D, Dietz G. P.H. *Glial cell line derived neurotrophic growth factor increases motility and serviva of cultured mesenchymal stem cells and ameliorates acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol 294:F229-F235;2008.
45. **Orth R**, Ritz E and Crazzolara C.S. *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is espressed in the human kidney and is a growth factor for human mesangial cells*. Nephrol Dial Transplant 15:589-595,2000.

46. **Kumar JP.** *The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease.* Cell. Mol. Life Sci. 66; 565-583, 2009.
47. **Kawakami K, Ohto H, Ikeda K et al.** *Structure, function and expression of a murine homeobox protein arec3, a homologue of Drosophila sine oculis gene product, and implication in development.* Nucleic Acids Res. 24; 303-310, 1996.
48. **Ohto H, Kamada S, Tago K.** *Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya.* Mol Cell Biol; 19(10):6816-24. 1999.
49. **Ikeda et al.** *Molecular interaction and synergistic activation of promoter by Six, Eya and Dach proteins mediated through CREB binding protein.* Mol Cell Biol, 22(19):6759-66;2002.
50. **Self M, Lagutin O V, Bowling B.** *Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney.* EMBO journal 25,5214-5228; 2006.
51. **Brodbeck S, Besenbeck B, Englert C et al.,** *The transcription factor Six2 activates expression of the GDNF as well as its own promoter.* Mech Dev; 121(10): 1211-22; 2004.
52. **Xu PX, Zheng W, Huang L et al.** *Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney.* Develop 130: 3085-3094, 2003.

53. **Mason M J**, Morrison, D J, Basson M A *Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptors tyrosine kinase signaling*. Review Cell Biol.16 (1):45-54.2006.
54. **Miyazaki Y**, Ichikawa I. *Ontogeny of congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. CAKUT. Pediatr. Int; 45(5): 598-604,2003.
55. **Sanio K**, Suvanti P, Davies J et al. *Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium*. Devel; 124(20): 4077-87;1997.
56. **Costantini F**, Shakya R. *GDNF/RET signaling and the development of the kidney*. Review Bioessays :28 (2):117-127;2006.
57. **Popsueva A**, Poteryaev D, Arighi E et al. *GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase*. J Cell Biol: 161(1): 119-129:2003.
58. **Basson MA**, Akbulut S, Watson-Johnson J et al. *Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction*. Dev Cell: 8(2):229-239;2005.
59. **Basson MA**, Watson-Johnson J, SHAKYA R. et al. *Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty 1*. Dev. Biol; 299(2):466-477;2006.

**60. Yosypiv I V.** *Downregulation of Spry1, an inhibitor of GDNF/Ret, as a mechanism for angiotensin II-induced ureteric bud branching.* *Kid. Int;* 74(10):1287-1293,2008.

**61. Woolf AS,** Winyard PJ. *Molecular mechanism of human embryogenesis: developmental pathogenesis of renal tract malformations.* Review. *Pediatr. Dev. Pathol* 5(2):108-129;2002.

**62. Pohl M,** Bhatnagar V, Mendoza SK et al. *Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract.* Review *Kidney Int* 61(1):10-19;2002.

**63. Fletcher J,** Hu M, Berman Y et al. *Multicystic dysplastic kidney and variable phenotype in a family with a novel deletion mutation of Pax2.* *J Am Soc Nephrol* 16(9): 2754-2761;2005.

**63 Torregrossa R,** Anglani F, Fabris A et al. *Identifications of GDNF Gene Sequence Variations in Patients with Medullary Sponge Kidney Disease.* *Clin J Am Soc Nephrol* 5:1205-10;2010.

**64. Ginalski JM,** Speigel T, Jaeger P. *Use of low-osmolality contrast medium does not increase prevalence of medullary sponge kidney.* *Radiology* 182(2).311-14:1992

**65. Den Dunnen JT,** Antonarakis SE. *Mutation Nomenclature Extension and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion.* *Human Mutat.* 15:7-12;2000.

**66. Merrill CR,** Goldman D, Sedman SA et al. *Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid protein.* *Science* 211:1437-8;1981.

**67.** *RNA interference* Enciclopedia libera Wikipedia

**68. Del Prete D**, Forino M, Gambaro G et al. *A comparative kinetic RT/PCR strategy for the quantification of mRNAs in microdissected human renal biopsy specimens.* Exp Nephrol 6(6):563-7;1998

**69 Oliver M H**, Harrison N K, Bishop J E. *A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: applications for assessment of growth factors.* Journal of Cell Science 92, 513-518; 1989

**70. Cappellari A**, Furlan C, Cardellini P et al *Morphologic analysis of serous effusion cells by scanning electron microscopy.* Tumori 78(1):10-12. 1992.

**71. Angrist M**, Bolk S, Halushka M et al. *Germiline mutations in glial cell line – derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in Hirschsprung disease patient.* Nat. Genet. 14(3):341-344; 1996.

**72. Ivanchuck SM**, Myers SM, Eng C et al. *De novo mutation of GDNF, ligand for the RET/GDNFR-alpha receptor complex, in Hirschsprung disease.* Hum. Mol. Genet :5(12):2023-26; 1996.

**73. Woodward ER**, Eng C, McMahon R et al. *Genetic predisposition to pheochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET, and VHL.* Hum Mol Genet.: 6(7):1051-6; 1197.

**74. Bodmer W**, Bonilla C. *Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common disease.* Nat Genet 40(6):695-701;2008.

**75. Anglani F**, Fabris A, Torregrossa R. *Varianti rare del genoma e suscettibilità alle malattie multifattoriali. L'esempio del Rene con Midollare a Spugna.* G Ita Nefrol 28(3)132-34:2011.

- 76. Kuiper JJ.** *Medullary sponge kidney in three generations.* N Y State J Med 71:2665-9;1971.
- 77. Fabris A,** Lupo A, Ferraro P M et al. *Inheritance of the Medullary Sponge Kidney: a sistemi analysis of a large cohort.* Abstract World Congress Vancouver 2011
- 78. Bouchard M.** *Transcriptional control of the kidney development.* Differentiation 72(7):295-306;2004.
- 79. Ellemich HL,** Kos L, Cho ES et al. *Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggest multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interaction.* Mech Dev. 54(1):95-105;1996.
- 80. Tsui CC,** Shankland SJ, Pierchala BA. *Glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors reti s a novel ligand-receptor complex critical for survival response during podocyte injury.* J Am Soc Nephrol. 17(6):1543-46;2006.
- 81. Jono S,** Shioi A, Ikari Y et al. *Vascular calcification in chronic kidney disease.* J Bone Miner. Metab. 24:176-181;2002.

## ATTIVITA' SEMINARIALE PER IL SEGUENTE LAVORO DI DOTTORATO

- *RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA (MSK): MUTAZIONI DEL FATTORE DI CRESCITA GDNF FUNZIONALMENTE RILEVANTI PER L' INSORGENZA DELLA NEFROPATIA.*  
Dr.ssa Rosalba Cristofaro; 2 Luglio 2010 Policlinico di Padova.
- *GENETICA MOLECOLARE, EPIDEMIOLOGIA, PATOGENESI DEL RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA;*  
Dr.ssa Rosalba Cristofaro; 22 Dicembre 2010 Convegno di presentazione dell'Attività di Ricerca dei Dottorandi del XXIV ciclo della Macroarea 2- Scienza della vita-. Palazzo del Bò, Padova
- *RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA: MALATTIA (MSK)* Dr.ssa Rosalba Cristofaro;  
15 Aprile 2011 Policlinico Universitario di Padova.

*GENETICA MOLECOLARE, EPIDEMIOLOGIA, PATOGENESI DEL RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA; Dr.ssa Rosalba Cristofaro; 8 Aprile 2011 Bressanone.*

### **Pubblicazione:**

Parte di questo lavoro è stato recentemente pubblicato:

- *IDENTIFICATIONS OF GDNF GENE SEQUENCE VARIATIONS IN PATIENTS WITH MEDULLARY SPONGE KIDNEY DISEASE.*

Torregrossa R, Anglani F, Fabris A, Gozzini A, Tanini A, Del Prete D, **Cristofaro R**, Artifoni L, Abaterusso C, Marchionna N, Lupo A, D'Angelo A, Gambaro G.  
Clin J Am Soc Nephrol. 5(7):1205-10.

## **Ringraziamenti**

*Sono trascorsi questi anni e se mi fermo a ripercorrere questo viaggio ho la sensazione che questo tempo sia passato velocemente.*

*Desidero principalmente ringraziare la Dr.ssa Anglani, per avermi avvicinato e fatto conoscere la sua passione per la ricerca, per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi in questi anni, e per tutto l'aiuto e l'infinita pazienza fornitomi durante la stesura di questa tesi. Grazie ancora Dottoressa.....*

*Un grazie particolare a Monica, la mia "tutor originale e tanto altro su di lei potrei dire..." che mi ha sempre incoraggiata anche nei momenti difficili; a Giovanna "la collega che piacevolmente ho riscoperto in quest'ultimo anno sempre cara, discreta e vicina"; ad Enrica, "una lattina di Coca cola in esplosione....che con la sua voce mi comunica la sua presenza ancor prima di raggiungere il piano (Enry abbiamo avuto dei momenti un po' così ma dimentichiamoci di quelli e ricordiamoci solo di quelli belli.....quante risate ci siamo fatte assieme) e la Dr.ssa Del Prete perché per me è sempre stata un'infusione indispensabile di tanta dolcezza e serenità.*

*A Valentina, Sonia e Susanna un immenso grazie per aver contribuito a questo mio lavoro di dottorato.*

*Un ringraziamento un po' più di parte a Federica, Alessandra, Lucia ed Emilia per essermi state vicine in questo tempo, per aver allietato le mie giornate e per avermi reso felice nell'aver trovato in loro non solo delle colleghe ma anche delle amiche. Ultimo ringraziamento non di certo ultimo per importanza a Marianna; poche solo le parole che potrei dirle in questo momento e in questo contesto.....Ninna grazie di tutto.....*

