



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO
E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE
*INDIRIZZO MALATTIE RARE
CICLO XX*

IDENTIFICAZIONE DI PATTERN DI ESPRESSIONE GENICA DELLA DISPLASIA RENALE ASSOCIATA AD UROPATIA MALFORMATIVA

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Supervisore : Dott.ssa Luisa Murer

Dottoranda : CENTI SONIA

31 gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO pag. 3

PRESENTAZIONE E SCOPO DEL LAVORO pag. 7

FASE 1

INTRODUZIONE

LA DISPLASIA RENALE pag. 9

MATERIALI E METODI

• Colture cellulari, analisi istologica, pag. 13

analisi immunocitochimica

• Estrazione e valutazione dell' RNA pag. 14

• Microarray pag. 15

RISULTATI pag. 16

FASE 2

INTRODUZIONE

GENI CANDIDATI pag. 21

MATERIALI E METODI

• Estrazione RNA da tessuto bioptico pag. 26

• Real time PCR pag. 27

RISULTATI pag. 29

FASE 3

INTRODUZIONE

IL GENE SPRY1 pag. 33

MATERIALI E METODI

ANALISI DI MUTAZIONE

- SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e Sequenziamento pag. 35

RISULTATI pag. 36

MATERIALI E METODI

STUDIO DI ASSOCIAZIONE

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) pag. 38
- HRM (High Resolution Melt) pag. 39

RISULTATI pag. 41

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE pag. 45

BIBLIOGRAFIA pag. 54

RIASSUNTO

Lo sviluppo del rene e delle vie urinarie è un processo complesso regolato da una precisa modulazione spazio-temporale dell'espressione di geni codificanti per fattori di trascrizione, fattori di crescita, fattori di proliferazione/morte cellulare, molecole di adesione. Alterazioni dell'espressione sequenziale di tali geni può causare un difettoso cross talk tra la via ureterale in formazione ed il mesenchima metanefrico determinando una malattia da alterato sviluppo del rene e/o delle vie urinarie (nefrouropatie malformative congenite). Quanto più precocemente avviene la disregolazione del processo nefrogenetico tanto più severo sarà il fenotipo di malattia renale, la cui forma più grave è rappresentata dalla displasia. Tuttavia scarse sono le conoscenze sulla eziopatogenesi delle nefrouropatie malformative. Recentemente la tecnica dei microarray ha fornito un ottimo strumento per acquisire informazioni sui meccanismi fisiopatologici alla base delle malattie.

Durante la prima fase di questa ricerca è stata condotta un'analisi dei pattern di espressione genica, mediante microarray (21.329 oligonucleotidi settantimeri), su RNA estratto da 8 colture cellulari primarie da tessuto renale. Lo scopo era di identificare potenziali biomarkers specifici di un quadro di displasia renale. Per i 4 geni considerati più informativi (UPK1B, SOX11, SPRY1, MMP2) è stata successivamente analizzata l'espressione genica, mediante Real Time PCR, su RNA estratto da tessuto renale: 10 casi con quadro istologico di displasia renale e 10 casi con quadro istologico normale.

Per il gene SPRY1, il cui omologo murino è fortemente coinvolto nella regolazione dell'espressione del fattore di crescita GDNF durante la fase del branching ureterale, è stata condotta un'analisi di mutazione in 27 pazienti pediatrici con doppio distretto pieloureterale. L'analisi mutazionale ha permesso di identificare 2 nuove varianti genomiche di cui è stata stimata la frequenza in una popolazione di controllo e che potrebbero essere "varianti genomiche coinvolte nello splicing" (SpaGVs).

I risultati di questa ricerca portano ad ipotizzare che il gene SPRY1 sia coinvolto nella determinazione delle nefrouropatie malformative nell'uomo.

ABSTRACT

Normal kidney and urinary tract development is a complex process, regulated by a strict space-time-corrected sequential activation of a cascade of genes encoding transcription factors, growth factors, cell death/proliferation factors and adhesion molecules. An alteration disrupting this sequential gene expression may cause a defective ureteric bud-to-metanephric mesenchyme cross-talk that results in a renal and urinary tract developmental abnormality (congenital anomalies of kidney and urinary tract – CAKUT). Phenotype severity depends on the stage of nephrogenesis in which the alteration of the developmental program occurs, thus renal dysplasia is the most severe manifestation. However, little is known about CAKUT pathogenesis. The recent advent of microarray technology

provided an unique tool to identify genes potentially involved in the pathogenesis of several diseases.

During the first stage of this research, we applied the microarray technique to study gene expression profiles of primary renal cell cultures, using an array composed by 21329 oligonucleotides. The aim was to identify potential biomarkers of renal dysplasia. Four genes seemed to be more interesting (UPK1B, SOX11, SPRY1, MMP2). We analysed the expression of these four genes using Real Time PCR on RNA extracted from renal tissue samples of 10 patients with a histological picture of renal dysplasia and 10 with histologically normal renal tissue.

Mutation analysis of SPRY1 gene, whose murine homologue is hugely involved in the regulation of GDNF growth factor's expression during ureteric branching, was carried out on 27 patients with renal duplicity. Mutation analysis identified 2 new genomic variants - whose frequency was analysed in a control population – that may be “genomic variants involved in splicing” (SpaGVs).

Our research results allow to hypothesize that SPRY1 gene may be involved in the pathogenesis of kidney and urinary tract developmental diseases.

PRESENTAZIONE E SCOPO DEL LAVORO

La disregolazione del normale programma nefrogenetico, che coinvolge un complesso network di geni, ha come conseguenza un' alterazione del differenziamento ed un arresto maturativo, rappresentata nella sua forma fenotipicamente più grave dalla displasia renale.

La displasia renale si associa generalmente ad anomalie congenite del tratto urinario (CAKUT: Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract) che possono presentarsi come forma sporadica o familiare, come quadro sindromico o isolato.

In casi sindromici ereditati e in casi sporadici sono state recentemente riportate mutazioni di specifici geni che rendono però ragione solo di una piccola parte dei casi osservati. La maggior parte di queste anomalie congenite potrebbe quindi essere dovuta a mutazioni di geni fino ad oggi non identificati e coinvolti nella nefrogenesi.

Lo studio dei profili di espressione genica, mediante microarray, ha dato un nuovo impulso allo studio dei meccanismi patogenetici delle malattie da alterato sviluppo renale portando alla scoperta di nuovi geni candidati.

Scopo di questa ricerca, che si è articolata in 3 fasi, è stato di identificare geni coinvolti nella displasia renale:

fase 1: analisi di espressione genica mediante microarray su RNA estratto da colture di tessuto renale displasico e tessuto renale normale

fase 2: conferma mediante Real Time PCR per i geni considerati informativi
su tessuto renale displasico e tessuto renale normale

fase 3: analisi di mutazione di geni candidati in soggetti con displasia renale
associata a nefrouropatie malformative.

FASE 1

INTRODUZIONE

LA DISPLASIA RENALE

Le nefrouropatie malformative sono anomalie congenite dovute ad una alterazione del programma di sviluppo del rene e della via urinaria.

Il fenotipo renale più severo è rappresentato dalla displasia caratterizzata, istologicamente, dalla presenza di strutture tubulari primitive circondate da stroma e collari muscolari, da zone di mesenchima nefrogenico e di metaplasia cartilaginea alternate ad aree di tessuto renale più o meno differenziato.

Nell'embrione umano la nefrourogenesi che darà origine al rene definitivo inizia intorno alla 5° settimana di gestazione, in seguito al contatto dell'abbozzo ureterale, che origina dalle strutture wolffiane, con il mesenchima metanefrico che viene indotto a differenziarsi nel rene definitivo (1,2) (Fig.1).

In seguito a tale contatto, il mesenchima metanefrico attiva un processo di trascrizione genica che regola da una parte l'allungamento e la ramificazione (branching) delle vie escretrici, dall'uretere alla pelvi fino ai dotti collettori, dall'altra la proliferazione e la differenziazione delle cellule del blastema metanefrico. Le cellule mesenchimali proliferano, condensano e formano vescicole che daranno origine, per allungamento, segmentazione e differenziazione epiteliale, alle varie parti del nefrone maturo, dal tubulo distale al glomerulo.

Infine avviene la maturazione dei diversi segmenti tubulari, con acquisizione di polarizzazione e differenziazione funzionale (3). Sebbene il branching dell'uretere decresca dalla 15 SG, la formazione di nuovi nefroni continua a venire indotta in senso centrifugo fino alla 34° SG e probabilmente oltre.

Un'alterazione di questa complessa sequenza di eventi causa una anomalia dello sviluppo renale, caratterizzata da fenotipi diversi a seconda del numero e localizzazione di nefroni maturi, delle aree di mesenchima nefrogenico rimasto indifferenziato, della presenza di segmenti tubulari immaturi che formano cisti di diverso numero e localizzazione, dell' associazione o meno con anomalie della via escretrice urinaria.

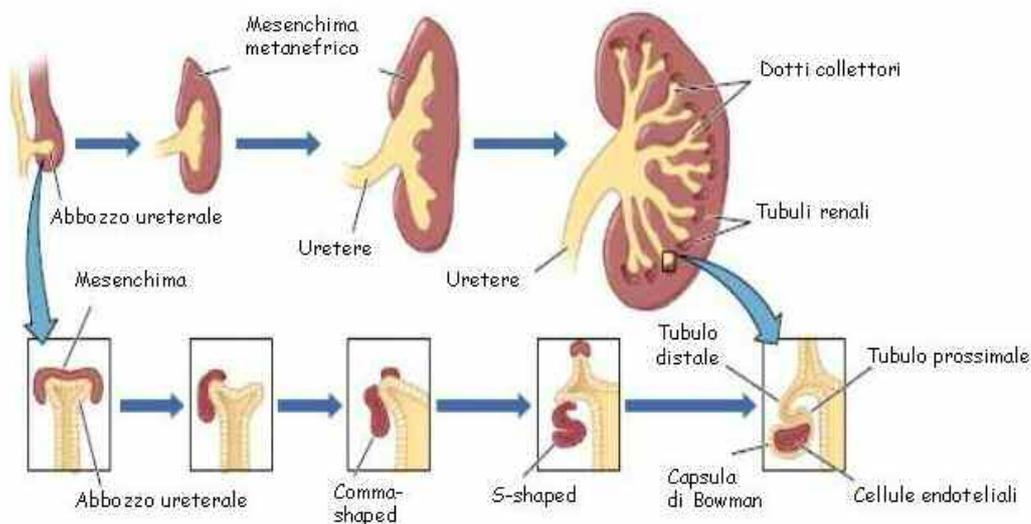


Fig.1 Schema di sviluppo nefrourinario modificato da *Sampogna RV et al, Physiology 2004*

Recentemente, sulla base di studi sull'animale da esperimento, è stato ipotizzato che i diversi fenotipi dipendano dall'epoca della nefrogenesi in cui si è determinata l'alterazione del programma (4). L'agenesia renale deriverebbe dall'assenza completa di induzione da parte della bozza ureterale sul metanefro; diversi quadri di displasia (dal rene multicistico alle ipodisplasie con cisti periferiche corticali), per lo più associati a malformazioni della via escrettrice urinaria, deriverebbero da un arresto del branching ureterale e della differenziazione in senso epiteliale; l'ipoplasia oligomeganefronica o la disgenesia tubulare potrebbero essere causate da errori della fase più tardiva.

Il normale processo nefrogenetico è regolato dall'attivazione sequenziale e corretta in senso spazio-temporale di una cascata di geni che codificano per fattori di crescita, fattori di trascrizione, molecole di adesione, molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (5,6). Alcuni di questi geni sono stati identificati mediante modelli di knock-out genetico (7). Tra questi Pax2, Wt1, Gdnf e il suo recettore cRet, Hgf, Wnt4, Sall1 e geni del sistema Renina-Angiotensina (Fig.2) sono risultati implicati nell'induzione della bozza ureterale, nel branching dell'uretere, nella morfogenesi dei dotti collettori e nella differenziazione dei segmenti del nefrone.

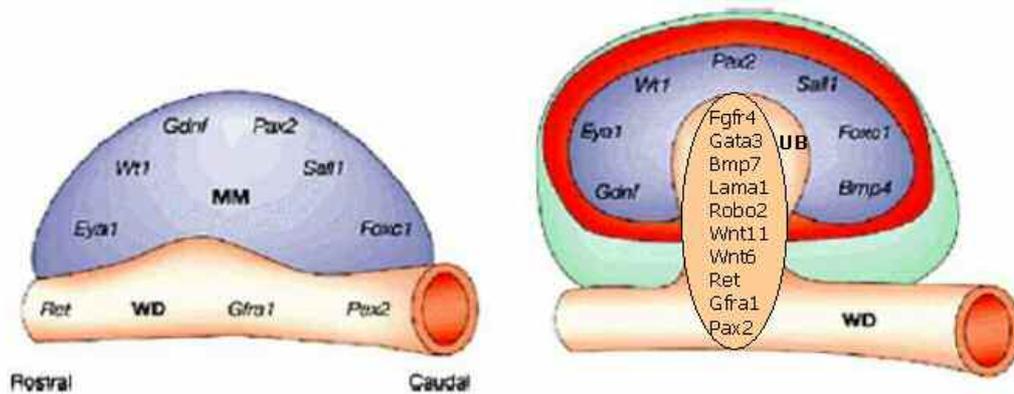


Fig.2 Overview di geni coinvolti nell'induzione dell'abbozzo ureterale.

MM: mesenchima metanefrico; UB: abbozzo ureterale; WD: dotto di Wolff.

Vainio S. et al. Nat Rev genet 2002 (Aggiornato 2006).

Mutazioni di geni umani omologhi a quelli murini, identificati con gli studi di knock-out, sono responsabili nell'uomo di malattie da alterato sviluppo renale sindromiche, quali la sindrome di Kalmann (gene KAL) e la Brachio-Oto-Renale (geni EYA1, SIX1) (8,9,10), caratterizzate da agenesia e displasia renale; sindrome di Townes-Brocks (gene SALL1), con displasia renale e malformazioni delle basse vie urinarie; la sindrome coloboma e rene (gene PAX2) (11,12,13), caratterizzata da ipoplasia renale e reflusso vescico-ureterale; la sindrome cisti renali e MODY5 (gene TCF2) (14,15), caratterizzata da anomalie cistiche di sviluppo renale (displasie e glomerulocisti) e delle vie urinarie (4).

La variabilità fenotipica e l'eterogeneità genetica osservate in forme sindromiche ed isolate di malattie da alterato sviluppo renale confermano l'estrema complessità del programma genetico che regola lo sviluppo del rene e della via

urinaria, suggerita dai modelli animali. Infatti gli studi cellulari e d'organo *in vitro* hanno dimostrato l'esistenza di un network di più geni coinvolti in diversi momenti della nefrogenesi, la cui attivazione e repressione è temporalmente controllata. Perciò la disregolazione anche di un gene a monte di una via metabolica potrebbe alterare la funzione di uno o più geni, più o meno a valle della stessa o di altre vie metaboliche correlate, implicate nella determinazione di uno specifico fenotipo (gene modificatore).

L'avvento di nuove tecnologie, come la tecnica dei microarray, che permette di valutare il profilo di espressione di migliaia di sequenze nucleotidiche di geni noti e non noti, fornisce uno strumento unico per identificare fattori di regolazione dello sviluppo su larga scala.

Anche se studi di espressione mediante microarray sono stati effettuati su modelli murini (16,17), pochi sono a tutt'oggi quelli eseguiti su reni umani adulti e fetali (18,19,20,21).

MATERIALI E METODI

Vista la fondamentale importanza della cellula epiteliale renale, sia effettrice sia regolatoria, nel processo nefrourogenetico, si è deciso di condurre lo studio con microarray su RNA estratto da colture cellulari primarie epiteliali ottenute da frammenti biotici di tessuto renale associati a malformazione della via urinaria.

Colture cellulari, analisi istologica, analisi immunocitochimica

Sono state allestite 20 colture cellulari, ottenute da frammenti di tessuto renale (biopsie intraoperatorie effettuate per motivi diagnostici), provenienti da reni associati a malformazioni urinarie (terreno di coltura arricchito con siero fetale bovino (FCS) 10%). In tutti i casi è stato ottenuto il consenso informato dei genitori per l'analisi molecolare.

Parte di tali frammenti è stata utilizzata anche per l'analisi istologica eseguita, ai fini di un inquadramento diagnostico e prognostico della patologia renale in esame, per evidenziare precisi componenti tessutali e cellulari, normali e patologici.

L'analisi istologica è stata effettuata previa fissazione in formalina ed inclusione in paraffina, utilizzando le classiche colorazioni:

- Ematossilina-Eosina
- Tricromica di Masson (Ematossilina di Mayer, Soluzione di Gomori, Acido Acetico)
- Pas (Acido periodico, Reattivo di Schiff, Ematossilina di Mayer)

- Silver PAS (Acido periodico, Stok Solution, Cloruro d'oro, Metabisolfito di potassio, Iposolfito di sodio).

E' stata inoltre eseguita l'analisi immunocitochimica di preparati ottenuti dalle colture cellulari, utilizzando anticorpi mono o policlonali per filamenti intermedi o proteine di superficie della cellula mesenchimale renale e della cellula tubulare matura: vimentina, α -actina, citocheratina, e-caderina.

Estrazione e valutazione RNA

L'RNA è stato estratto, dalle colture cellulari primarie, mediante metodiche standard (RNAzol - cloroformio/isopropanolo) ed è stato valutato quantitativamente e qualitativamente mediante Nanodrop® e Agilent 2100 Bioanalyzer.

Il *NanoDrop®* è uno spettrofotometro UV-Visibile innovativo, capace di lavorare con microvolumi di campione, fino a 1ul. La capacità di lavorare anche a concentrazioni estremamente elevate consente di eliminare totalmente l'utilizzo delle cuvette ed il ricorso alle diluizioni del campione permettendo, così, una quantificazione molto accurata.

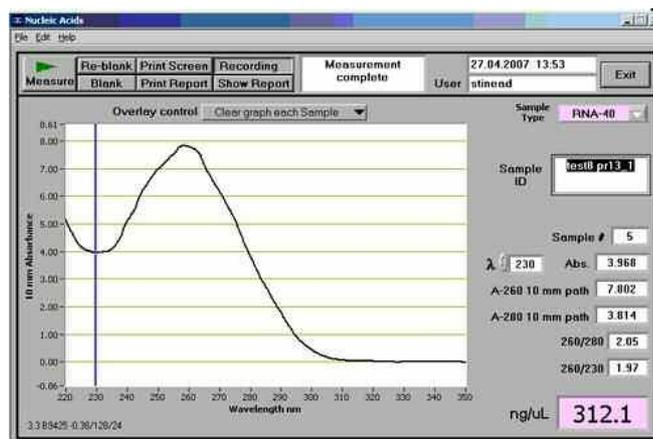


Fig.3 Esempio di lettura al Nanodrop di un campione di RNA

L'*Agilent* permette di eseguire la valutazione qualitativa del campione. E' un sistema molto sensibile che prevede il caricamento dei campioni (solo 1 μ l) in un chip in cui avviene una corsa elettroforetica capillare. Al termine della corsa elettroforetica i campioni sono letti in base alla loro fluorescenza e tale informazione è tradotta in una tipica immagine di gel elettroforesi e in elettroferogrammi. Un RNA utilizzabile nella tecnica dei microarray deve avere un'elettroferogramma simile a quello riportato in figura dove i picchi del 28S e 18S presentino un rapporto di circa 1.8-2.0 (Fig.4).

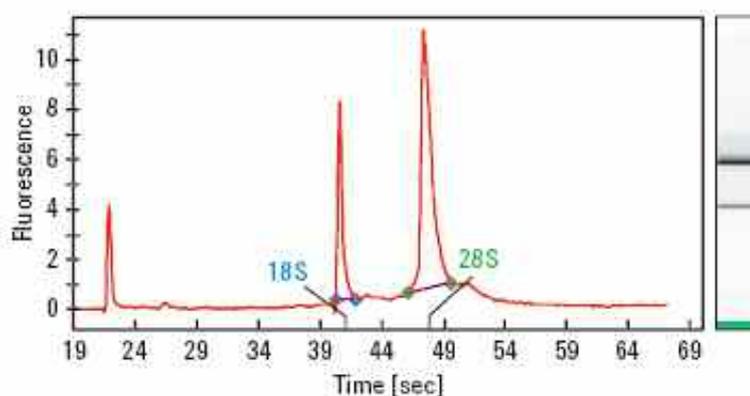


Fig.4

Microarray

La tecnica dei Microarray è stata applicata sull' RNA estratto dalle colture cellulari primarie.

Dopo valutazione della loro integrità, i campioni sono stati amplificati con il kit AminoAllyl MessageAmp aRNA dell'Ambion utilizzando 0,5-1 µg di RNA. Per ogni esperimento si sono marcati 0,5 µg di aRNA con i fluorofori Cy3 e Cy5 della ditta Amersham.

Il set di oligo usato consisteva di 21.329 oligonucleotidi settantimeri (Operon versione 2.0) disegnati su altrettanti cluster di Unigene Human, principalmente nella regione 3'-terminale dell'mRNA in modo da minimizzare le cross-ibridazioni tra geni omologhi. Una determinata sequenza è stata anche scelta in modo da identificare una sola variante di *splicing* (per i geni con *splicing* alternativi) e da evitare la presenza di sequenze ripetute e di punti di *mismatch* tra la sonda e il *target*, in quanto riducono la specificità ed alterano la cinetica di ibridazione.

Gli oligonucleotidi sono stati depositati in doppia replica su vetrino MICROMAX Glass Slides: SuperChip I fornito dalla ditta PerkinElmer Life Sciences, Inc. con la stazione robotizzata Microgrid II Biorobotics. La qualità della deposizione è stata controllata con una scansione accurata a 10 micron, mediante GSI Lumonics scanner, con un protocollo che permette la lettura degli spot depositati, grazie ai sali presenti nella soluzione in cui gli oligo sono risospesi.

Sul vetrino, alla fine, vi erano 48 subarray disposti in 4 colonne e 12 righe.

L'ibridazione è stata effettuata utilizzando l'ibridatore ArrayBooster dell'Advalytix. La scansione e la prima analisi (quantizzazione e normalizzazione) è stata effettuata usando il programma ScanArray Express. La normalizzazione dei dati di intensità è basata sull'intensità totale o interpolazione non lineare (LOWESS). L'analisi statistica è stata effettuata usando il programma SAM (*Significant Analysis of Microarray*). Per selezionare i geni differenzialmente espressi è stato preso un cut-off del \log_2 del rapporto di intensità dei due canali di 1.1. Per restringere il campo di dati ottenuti è stato inoltre applicato un ulteriore programma di analisi, lo Z-score analysis.

RISULTATI

Culture cellulari

Sono risultate adeguate per l'analisi dei profili di espressione genica, sia per quanto riguarda la quantità e la qualità dell'RNA estratto, sia per quanto riguarda la valutazione del quadro istologico, otto colture primarie. Due colture erano state ottenute da biopsie intraoperatorie eseguite durante intervento di pieloureteroplastica per giuntopatia congenita e sei da biopsie intraoperatorie in bambini con diversa malformazione urinaria in cui l'intervento era stato eseguito per la comparsa di complicanze maggiori (infezioni ripetute, ematuria, ipertensione, ecc.).

L'analisi istologica del tessuto renale ha dimostrato in quattro casi un quadro di displasia (alternarsi di zone di parenchima renale a diverso stadio differenziativo, con aree di mesenchima nefrogenico indifferenziato e aree di metaplasia cartilaginea, con o senza la presenza di cisti di origine tubulare, duttale o glomerulare con diversa localizzazione ed estensione) (Fig. 5a) e in quattro casi si è invece evidenziato un tessuto renale maturo e differenziato senza lesioni di rilievo (Fig. 5b).

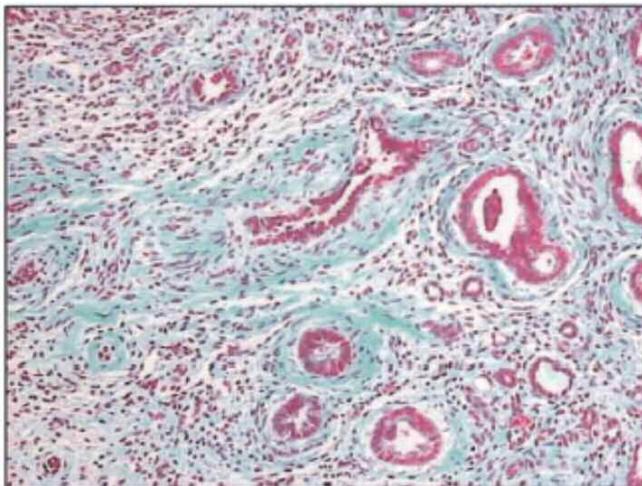


Fig. 5a

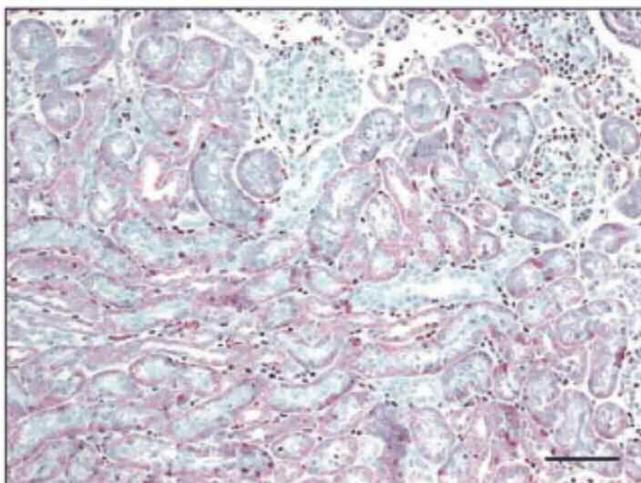
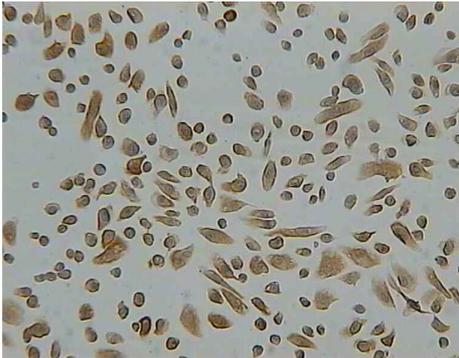


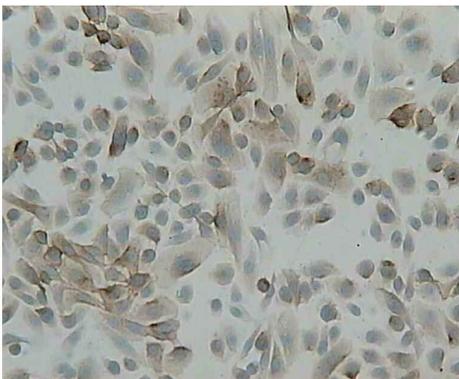
Fig. 5b

L'analisi immunocitochimica ha dimostrato positività per gli anticorpi vimentina, E-caderina e citocheratina caratteristici della cellula di tipo epiteliale (Fig.6).

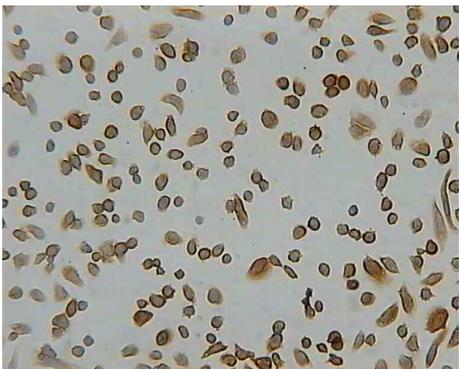
Fig.6 Analisi immunocitochimica



vimentina



E-caderina



citocheratina

Microarray

I profili di espressione genica dei reni displasici sono stati confrontati con quelli dei tessuti renali maturi, considerati come normali.

Dalla prima analisi statistica, mediante il programma SAM, è emersa una differenza statisticamente significativa per 1144 geni, 237 sovraespressi e 907 sottoespressi. I geni hanno seguito lo stesso andamento in tutti i campioni, i dati clusterizzavano in modo molto netto (Fig.7).

Dall'analisi statistica combinata SAM / Z-score il numero dei geni differentemente espressi è stato ridotto a 449, di cui 61 sovraespressi e 338 sottoespressi. Un'analisi più stringente dei risultati è stata fatta mediante studi di genomica funzionale associati ad analisi computazionale. Sono stati in questo modo selezionati 47 geni di cui 8 sovraespressi e 39 sottoespressi, codificanti per: fattori di trascrizione implicati nella proliferazione cellulare, proteine strutturali citoscheletriche, nucleari, di membrana; proteine coinvolte nella via di trasduzione del segnale; proteine coinvolte nel WNT e nel JAK-STAT pathway, vie metaboliche coinvolte nello sviluppo embrionale, nella proliferazione cellulare, nella determinazione dell'apoptosi e nella polarizzazione cellulare.

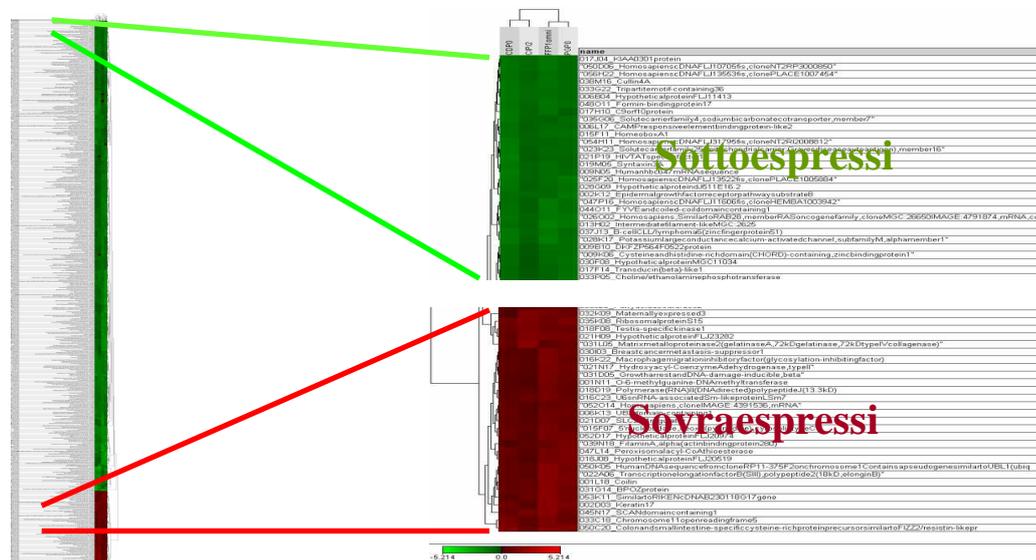


Fig.7

FASE 2

INTRODUZIONE

GENI CANDIDATI

Tra i 47 geni selezionati l'attenzione è stata focalizzata su quattro di essi che, sulla base degli studi su animali da esperimento riportati in letteratura, potrebbero avere un ruolo chiave nella nefrogenesi. Si tratta dei geni sottoespressi UPK1B (Uroplachina 1B), SOX11 (Sry-like HMG box 11), SPRY1 (Sprouty Homolog 1) e del gene sovraespresso MMP2 (Metallo Proteinasi di Matrice 2). Non sono mai stati riportati studi molecolari di questi quattro geni nelle displasie renali umane.

MMP2 : durante la morfogenesi, risultano fondamentali le interazioni che si instaurano tra l'ambiente intracellulare e l'ambiente extracellulare. Le cellule elaborano precocemente proteine specifiche della matrice extracellulare (ECM) che, a loro volta, svolgono un'azione di promozione dei processi differenziali della cellula.

Il ruolo della ECM nello sviluppo metanefrico è stato definito qualche decennio fa da Grobstein et al e da Saxen et al. Gli autori postulavano che la membrana basale della ECM, interposta tra la bozza ureterale ed il blastema metanefrico, avesse un effetto paracrino nel facilitare l'interazione tra i principali tipi di cellule che guidano la conversione del mesenchima nel fenotipo epiteliale (22). Il transdifferenziamento mesenchima-epiteliale che avviene durante l'organogenesi renale è associato all'espressione di componenti della ECM che giocano un ruolo

cruciale nello stabilire la polarità cellulare, il fenotipo epiteliale ed il branching ureterale. Durante questi processi vi è la necessità di un continuo rimodellamento della ECM (23); una delle molecole principalmente coinvolte sono le metalloproteinasi di matrice (MMP), enzimi con attività ione metallico dipendente, che degradano le glicoproteine della ECM.

La loro attivazione permette di modulare sia l'interazione cellula-cellula sia quella cellula-matrice, regolando così il differenziamento, la migrazione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (24). Le MMP2, con le MMP9, sono una sottofamiglia di metalloproteinasi definite gelatinasi.

Studi su topo, in vivo e in vitro, hanno dimostrato che la MMP2 è coinvolta nel branching ureterale con modulazione della propria espressione durante le varie fasi dello sviluppo renale. Il suo livello diminuisce durante il periodo postnatale, suggerendo che il loro potenziale ruolo nell'organogenesi del rene sia confinato al periodo pre-natale (22).

UPK1B : l'uropalachina1B è una proteina di membrana che forma con gli altri tipi di uropalachine (1A, II, III) degli aggregati definiti "placche proteiche", lungo la membrana asimmetrica uroteliale (AUM), specificatamente sulla parte apicale delle cellule ad ombrella della vescica. Dai risultati di studi morfologici e fisiologici si è visto che la formazione di queste placche fornisce forza e flessibilità alla superficie luminale della vescica, costituendo una barriera impermeabile che previene l'invasione dell'urina nei tessuti circostanti (25).

Il ruolo dell'uroplachina1B sembra essenziale, per quanto riguarda l'assemblaggio di queste placche, soprattutto nelle fasi di maturazione dell'urotelio. Questo suggerisce un ruolo chiave di questa proteina nel guidare gli stadi finali del differenziamento uroteliale (26).

SOX11 : il fattore di trascrizione Sox11 appartiene alla famiglia di proteine Sox (Sry-like HMG box). Il capostipite di questa famiglia è Sry, il fattore di determinazione del sesso, situato nei mammiferi sul cromosoma Y (27). Sry contiene un particolare dominio per il legame al DNA, di tipo high mobility group (HMG), costituito di 80 aminoacidi e altamente conservato in tutti i fattori Sox. Il dominio HMG di molti fattori Sox, oltre a legare il DNA, è coinvolto anche nell'interazione con altre proteine. Tutti i fattori Sox contengono, nel dominio HMG, due segnali di localizzazione nucleare che ne permettono il trasporto all'interno del nucleo (28).

In base all'omologia di sequenza, i fattori SOX sono suddivisi in dieci gruppi principali denominati A-J. I membri di ciascun gruppo presentano almeno il 90% di identità nella sequenza aminoacidica del dominio HMG ed una significativa omologia al di fuori di questo dominio. SOX11 appartiene al gruppo C.

Le evidenze sperimentali suggeriscono che molti di questi fattori svolgono un ruolo importante in diverse fasi dello sviluppo e nella determinazione del destino cellulare. Sta inoltre emergendo un loro ruolo come interruttori tessuto-specifici in grado di indurre cambiamenti nell'espressione genica. Per questa funzione è

indispensabile una corretta regolazione spazio-temporale dell' espressione di questi fattori Sox.

Studi su animali hanno evidenziato un'elevata espressione genica di SOX11 nel rene metanefrico, localizzata in particolare nelle strutture della bozza ureterale destinate a differenziarsi in glomeruli. Un'elevata espressione di SOX11 è stata anche osservata durante la conversione del mesenchima metanefrico in fenotipo epiteliale (30). Bassi livelli d'espressione sono stati invece osservati nelle zone di mesenchima che non si differenziano (29).

SPRY1 : la proteina Sprouty1 è stata originariamente descritta come antagonista del signalling di FGF (Fibroblast Growth Factor) durante il branching tracheale nella *Drosophila*. Studi in vitro ed in vivo in animali hanno dimostrato che Spry1 agisce come modulatore della cascata di trasduzione del segnale di fattori di crescita come EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Plastrine Derived Growth Factor) o GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor).

La via delle MAPK (Mitogen Activeted Protein Kinase), attivata dal legame tra un fattore di crescita ed un recettore tirosin chinasi (RTK), è uno dei pathway cruciali nella regolazione della proliferazione, del differenziamento e della migrazione cellulare (31). Rimane controverso a tutt'oggi l'identificazione dello step, dell'attivazione della via delle ERK (extracellular signal-regulated kinase)/MAPK, su cui agisce Spry1. Gli studi fin'ora condotti suggeriscono l'esistenza di molteplici meccanismi d'azione di Spry1 che dipenderebbero dal

contesto cellulare e/o dal tipo di RTK (recettore tirosin chinasi) al quale si lega il fattore di crescita.

L'ipotesi più accreditata è che Spry1 inattivi le MAPK legandosi alla proteina Grb2 ed impedendo così il legame con la proteina Sos (Fig.8) (32,33,34,35,36).

Non sono ancora chiari i meccanismi molecolari attraverso i quali Spry1 agisce.

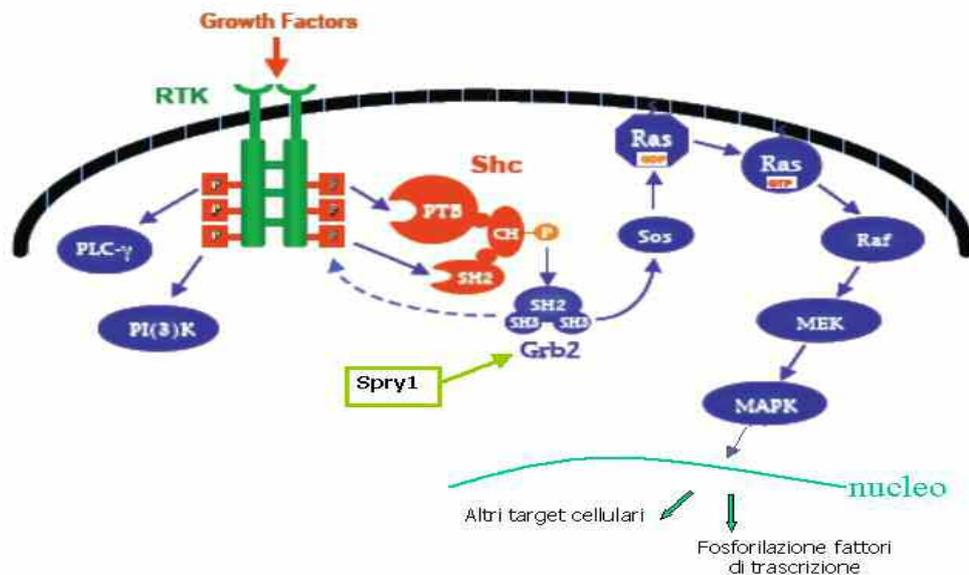


Fig.8

Il gene SPRY1 umano sembra essere coinvolto nel branching ureterale.

E' ormai ben documentato, nell'uomo, il ruolo chiave giocato dal fattore di crescita GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) che risulta attivo dalle prime fasi del processo nefrourogenetico fino alla terminazione del branching (10,37,38). La chemochina neurotrofica GDNF è uno dei segnali induttivi prodotti dal blastema che promuove sia la gemmazione sia la ramificazione della bozza ureterale (Fig.9). La sua espressione è ristretta al mesenchima circostante ed i suoi rispettivi recettore-corecettore sono cRET e GFR α -1 (39,40).

L'espressione di GDNF è fortemente regolata sia in senso spaziale sia in senso temporale per tutta la durata del branching.

Recenti studi su modelli murini, hanno dimostrato che la proteina Sprouty1, codificata dal gene *Spry1*, agisce da regolatore del segnale di GDNF inibendo la responsività del dotto di Wolff a tale segnale ed assicurando, così, la formazione di un'unica gemma ureterale.

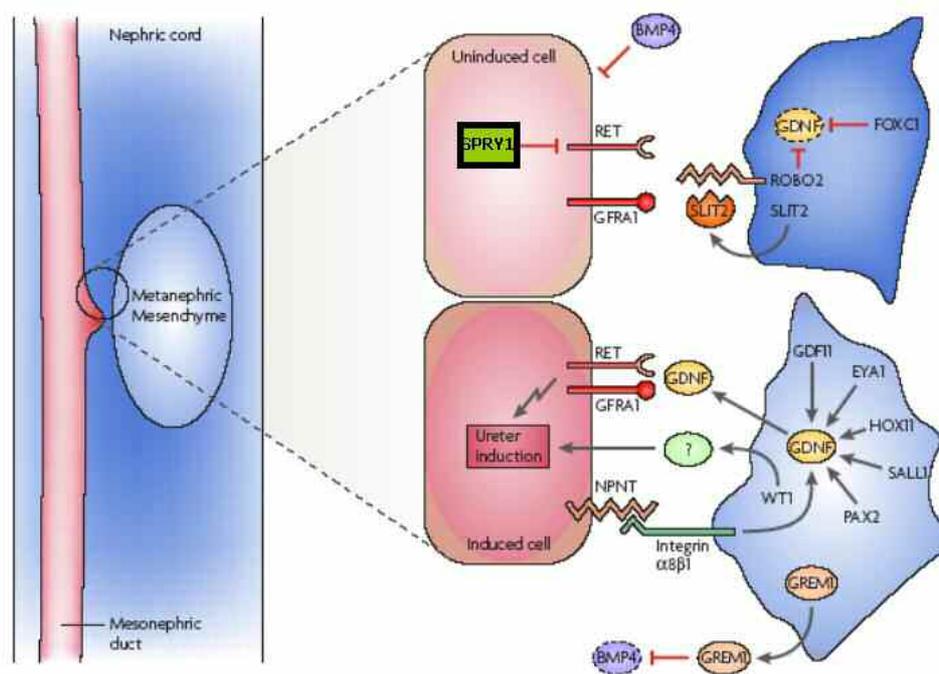


Fig.9 Schedl A. Nature Reviews genetics, 2007

Topi knock-out per *Spry1* presentano difetti del rene e del tratto urinario. I topi mutanti sviluppano gemme ureterali sovranumerarie che portano alla formazione di ureteri e reni multipli (41,42).

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.

MATERIALI E METODI

Estrazione di RNA da tessuto bioptico

Valutazione del pattern di espressione genica di UPK1B, SPRY1, SOX11 e MMP2, mediante Real Time PCR, su RNA estratto da frammenti tissutali di reni associati a malformazioni urinarie, con quadro istologico di displasia e con quadro istologico di tessuto renale maturo e differenziato, senza lesioni croniche di rilievo. Sono stati utilizzati numerosi frammenti tissutali (biopsie intraoperatorie effettuate per motivi diagnostici) parte dei quali utilizzata per l'estrazione dell'RNA e parte per l'analisi istologica.

In tutti i casi è stato ottenuto il consenso informato dei genitori per l'analisi molecolare.

L'estrazione dei campioni di RNA da tessuto renale, conservato in RNA Later, è stata effettuata con RNeasy - cloroformio/isopropanolo. L'RNA è stato valutato quantitativamente e qualitativamente sempre mediante Nanodrop® e Agilent

2100 Bioanalyzer. Sono stati considerati esclusivamente i campioni con concentrazione superiore a 20 ng/ μ l e con rapporto A260/280 tra 1,7 e 2,0 (valutazione al Nanodrop® e Agilent).

Prima della retrotrascrizione, i campioni di RNA sono stati trattati con DNAsi per eliminare eventuali tracce di DNA contaminante.

Sono stati retrotrascritti 100 ng di RNA in cDNA utilizzando l'enzima M-MLV Reverse Transcriptase dell'Applied Biosystems in un volume totale di reazione di 20 μ l (42 °C per 30 min, 99 °C per 5 min, 5 °C per 5 min, 4°C per ∞).

Real Time PCR

La Real Time PCR (effettuata con lo strumento iCycler della BIORAD) rappresenta uno strumento di elezione per la quantificazione relativa e assoluta dei messaggeri perché permette di fare delle valutazioni in breve tempo e con un minore errore associato al ridotto numero di passaggi necessari per avere i dati definitivi. Con la tecnica di Real Time non sono infatti richieste manipolazioni post-amplificazione comportando una diminuzione dei tempi di ottenimento dei risultati e la possibilità di monitorare costantemente l'andamento della reazione.

Per la Real Time PCR sono state costruite delle curve standard per i geni di interesse e per un gene housekeeping con diluizioni seriali 10^9 - 10^1 . Si è quindi messa a punto la metodica, effettuando tutte le prove necessarie per ottenere le condizioni di massima efficienza di amplificazione.

Gli ampliconi relativi ai cDNA dei geni testati sono stati rilevati mediante Sybr Green, fluoroforo intercalante simile all'etidio bromuro che quando si lega al DNA

emette una fluorescenza in soluzione 200 volte superiore rispetto a quando si trova nella forma libera. L'utilizzo del Sybr Green non richiede la sintesi di sonde con sequenza specifica e potrebbe quindi legarsi a qualsiasi DNA, come i dimeri di primers e altri prodotti aspecifici, dando un segnale artefatto. Pertanto, la specificità di reazione, è garantita dalla coppia di primer utilizzata ed è quindi importante disegnare i primer correttamente verificando che non si trovino in regioni di alta omologia con altri geni. Per verificare la specificità del prodotto è necessario allestire, alla fine della PCR, una corsa di denaturazione aumentando lentamente la temperatura del campione oltre quella di melting dell'amplicone. Graficando il logaritmo della fluorescenza in funzione della temperatura si ottiene una curva in cui, la presenza di un picco unico, dimostra l'unicità e la specificità del prodotto di PCR.

Prima di ogni esperimento è stata caricata una piastra di normalizzazione contenente, in ogni pozzetto, 25 μ l di External Well Factor (BioRad Laboratories, Hercules, California). Questo è servito per compensare variazioni di fluorescenza dovute ad eventuali errori sistematici o a pipettate non uniformi da pozzetto a pozzetto.

Una volta messe a punto le condizioni di reazione, le curve standard ed i campioni sono stati caricati in duplicato e le determinazioni quantitative relative dei geni target sono state valutate in rapporto all'espressione di un gene housekeeping, la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (GAPDH).

Per ogni campione e per ogni gene si è ottenuto un valore di Ct (Threshold Cycle) definito come il ciclo a livello del quale la curva di cinetica della reazione

interseca la Threshold stabilita (il termine Threshold indica una retta di soglia che interseca la curva di fluorescenza della reazione e che permette di discriminare il segnale specifico dal segnale di rumore di fondo) e, per estrapolazione dalla curva standard, si è ottenuto il corrispondente numero di copie dell'amplificato.

I dati per ogni campione sono stati forniti come rapporto tra il numero di copie del gene di interesse e il gene housekeeping (n° copie target/ n° copie GAPDH).

Per MMP2 e SPRY1 i primer sono stati scelti tra quelli proposti in letteratura (43,44), mentre per UPK1b e SOX11 sono stati selezionati tra quelli proposti da un programma bioinformatico per la costruzione di sequenze oligonucleotidiche, il Beacon Design.

MMP2 F: 5' CAA AAA CAA GAA GAC ATA CAT CTT 3'

R: 5' GCT TCC AAA CTT CAC GCT C 3'

SPRY1 F: 5' TGT CCG AAA AGG ATT TCA GAT GC 3'

R: 5' ACT GCC ACT GCC ATG TTG AT 3'

UPK1B F: 5' CAT CTG CCT CTT CTG CCT GTC TG 3'

R: TCT TGT TGT GTT GCT GCT GTG ATA C 3'

SOX11 F: 5' GCC CGC TGC TCG CTC TTT C 3'

R: 5' CTA CCA CCG CCA CCA TCA ACA C3'

MIX di reazione (volume finale di 25µl)	
MgCl ₂	3 mM
Buffer	1X

Jump Start Polimerasi	0,04 U/ μ l
Primer forward e Reverse	0,3 μ M
dNTPs	0,2 mM
Sybr Green	0,2X

Programma di amplificazione:

DENATURAZIONE INIZIALE	95°C x 5 min	
-a- DENATURAZIONE	94°C x 30 sec	
-b- ANNEALING	65,2°C (UPK1B) x 45 sec	
	62,8°C (SPRY1) x 45 sec	
	60°C (GAPDH) x 45 sec	40 cicli
	57,2°C (MMP2) x 45 sec	
	68,1°C (SOX11) x 45 sec	

Alla fine di ogni reazione è stato eseguito il protocollo di dissociazione da 65°C a 95°C.

RISULTATI

Estrazione RNA e Real Time PCR

L'analisi di espressione genica è stata effettuata su campioni di RNA estratto da frammenti di tessuto renale provenienti da biopsie di reni o emidistretti renali di pazienti pediatrici con malformazioni del rene e/o delle vie urinarie.

L'analisi istologica è stata effettuata su un totale di 40 campioni tissutali.

Sulla base della valutazione istologica e della presenza di un RNA quantitativamente e qualitativamente adeguato, sono stati selezionati 10 casi con

quadro istologico di displasia renale e 10 casi con quadro istologico di tessuto renale maturo e differenziato, utilizzati come controlli.

L'analisi delle curve di dissociazione di ciascun gene hanno mostrato la presenza di un unico picco di *melting*, indice della specificità della reazione e omogeneità degli ampliconi.

Non è emersa alcuna differenza significativa, per quanto riguarda i geni MMP2 e UPK1B, dal confronto tra l'espressione genica dei casi istologicamente displasici rispetto ai casi istologicamente normali.

E' stata invece evidenziata una differenza statisticamente significativa dell'espressione genica di SPRY1 e SOX11 osservata nei tessuti displasici rispetto a quella osservata nei tessuti istologicamente normali (rispettivamente $p=0,05$ e $p=0,02$) (Fig. 10, Fig. 11 e Fig. 12). Questa significativa differente regolazione porta ad ipotizzare un importante ruolo dei geni SPRY1 e SOX11 nella determinazione della displasia renale.

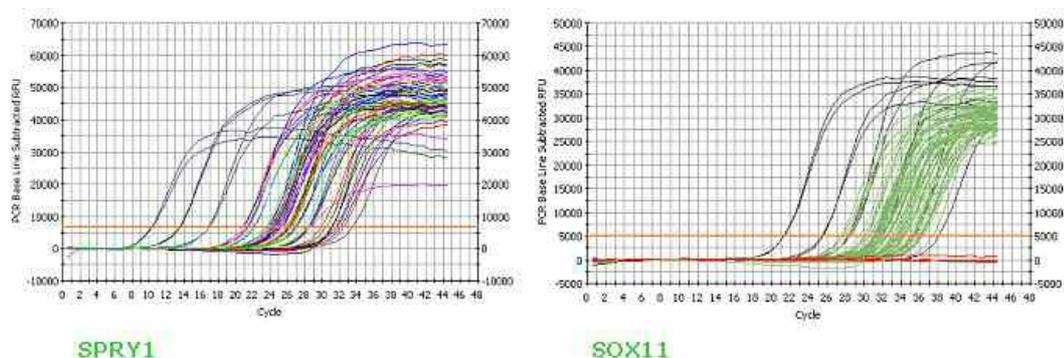


Fig.10 Rappresentazione dell'andamento delle curve di amplificazione in Real Time per i geni SPRY1 e SOX11

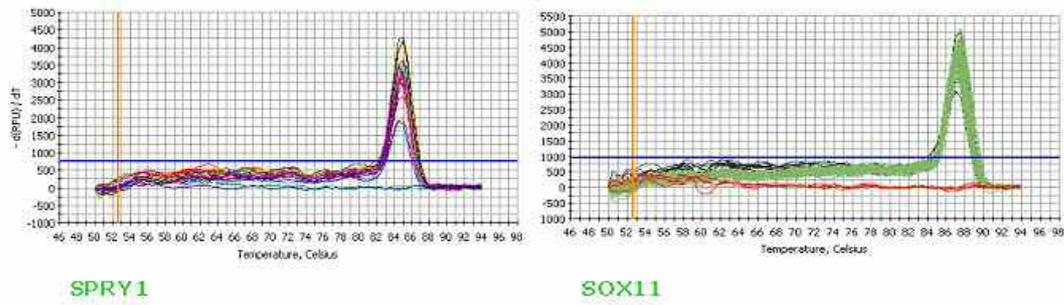


Fig.11 Rappresentazione delle curve di melting per i geni SPRY1 E SOX 11 per verificare la specificità dell'amplificato

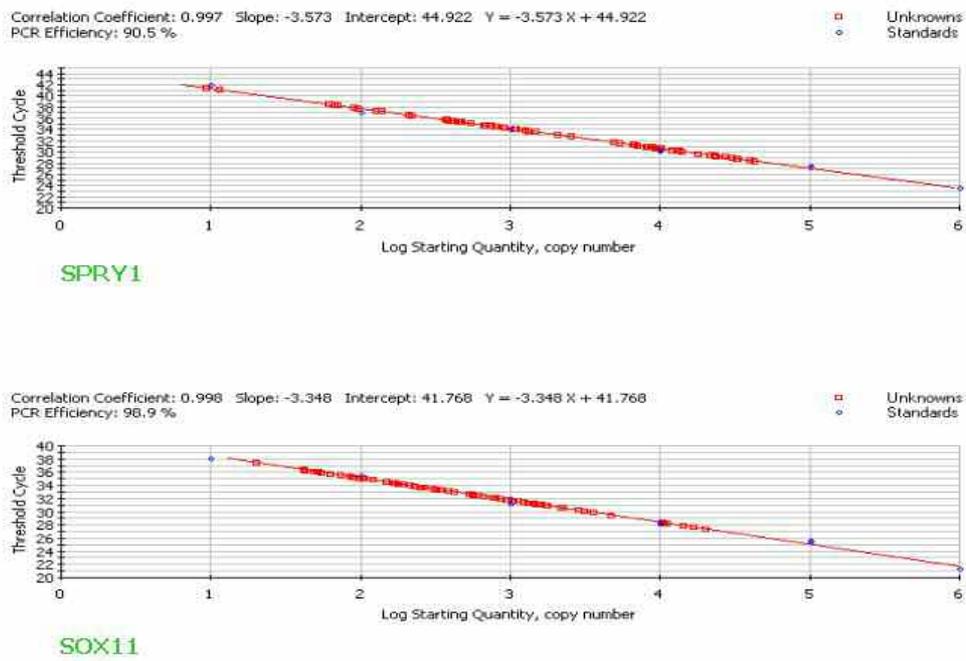


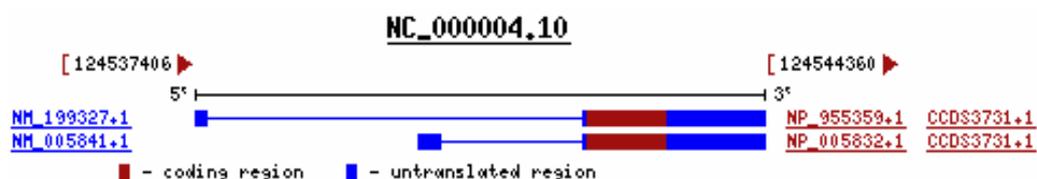
Fig.12 rappresentazione della retta di regressione per i geni SPRY1 e SOX11 ottenuta graficando i valori di Ct contro il logaritmo della quantità iniziale del campione standard corrispondente, espressa in numero di copie.

FASE 3

INTRODUZIONE

IL GENE SPRY1

Il gene umano SPRY1, che codifica per la proteina Spry1, mappa sul chr 4q27-q28 ed ha una lunghezza di 6954 bp. SPRY1 è costituito da tre esoni che codificano per due trascritti alternativi: uno della lunghezza di 2612 bp comprendente l'esone 1 e l'esone 3, ed uno della lunghezza di 2349 bp, comprendente l'esone 2 e l'esone 3.



Entrambi i trascritti traducono per la stessa proteina costituita da 319 aa e con un peso di circa 35 KDa. La regione codificante coinvolge esclusivamente l'esone 3; gli esoni 1 e 2 sono trascritti alternativamente, ma non vengono tradotti. E' possibile che queste regioni genomiche svolgano un'importante funzione regolatrice della trascrizione.

Nei mammiferi le proteine Sprouty (Spry1, 2, 3 e 4), costituite da un numero aminoacidico inferiore rispetto alla proteina Sprouty di Drosophila,

originariamente descritta (circa 300 aa vs 591 aa), contengono una regione c-terminale ricca in cisteine ed altamente conservata (circa 110 residui) (45).

Grazie a questo dominio, denominato “Sprouty Translocation Domain” (SpryTD o SPR), queste proteine traslocano dal citosol alla membrana plasmatica (46). Lo stesso dominio è stato trovato anche nelle proteine Spred (Sprouty related protein with an EVH1 domain), famiglia di proteine anch’esse associate alla modulazione del segnale nel pathway Ras/Raf/MAPK (Fig. 13) (47).

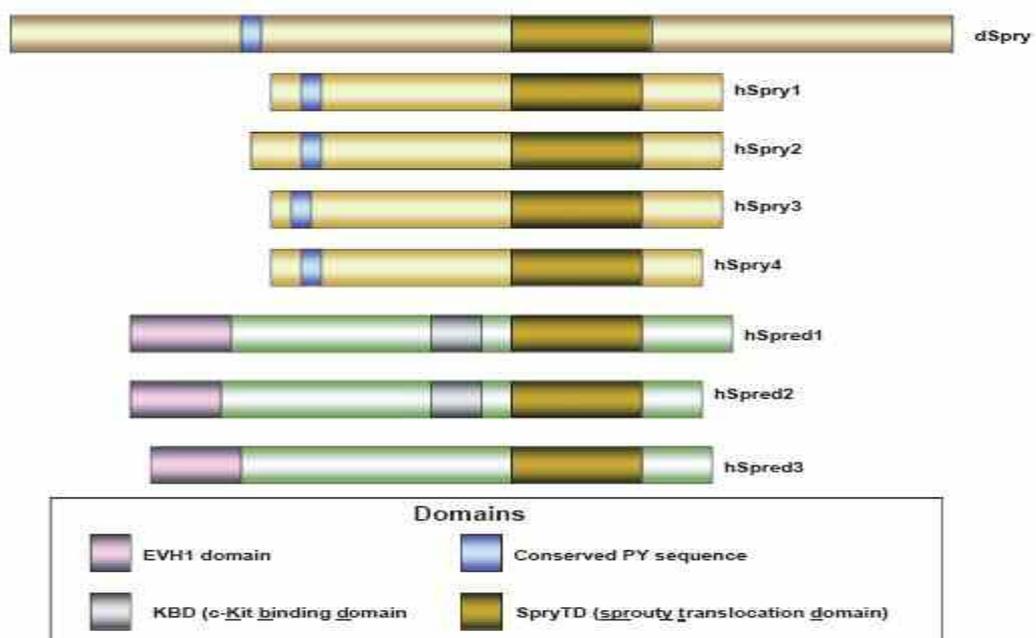


Fig. 13. Rappresentazione di proteine che contengono il dominio conservato SpryTD

La regione N-terminale delle proteine Sprouty, pur essendo altamente variabile, contiene un motivo conservato in grado di legare, in seguito a fosforilazione, il dominio SH2 di proteine bersaglio.

Probabilmente è proprio la variabilità di questa regione che permette a Spry1 di agire sia da regolatore positivo sia da inibitore nel signalling ERK/MAPK.

Sulla base delle conoscenze della letteratura e dei risultati ottenuti con la tecnica dei microarray (Fase1) e della Real Time PCR (Fase2), si è deciso di effettuare l'analisi di mutazione del gene SPRY1 e studi di associazione per le eventuali sostituzioni nucleotidiche identificate.

MATERIALI E METODI

ANALISI DI MUTAZIONE

Il DNA è stato estratto da sangue congelato o da tessuto renale bioptico congelato mediante l'utilizzo di kit "DNA EXTRACTION" (QIAGEN).

I campioni sono stati ottenuti da 27 pazienti pediatrici con doppio distretto pieloureterale, di cui 4 erano membri della stessa famiglia. Come campioni di controllo sono stati considerati i DNA di 6 soggetti senza nefrouropatie malformative (ecografia, scintigrafia e CUMS nella norma).

Per tutti i pazienti era stato ottenuto il consenso informato all'analisi genetica.

SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) e Sequenziamento

Il metodo SSCP permette la ricerca di alterazioni nucleotidiche in frammenti di DNA, amplificati mediante PCR, in gel non denaturanti di poliacrilamide. Nonostante il metodo sia stato introdotto ancora alla fine degli anni '80 (Orita e collaboratori, 1989) rimane comunque un sistema utilizzato in molti laboratori per la sua semplicità di realizzazione, per la sua relativa efficienza e per i costi contenuti.

Per ottenere risultati corretti è comunque molto importante che il prodotto di amplificazione sia fortemente specifico.

I primer per lo scopo sono stati ricercati mediante Primer Express software e sono stati studiati in modo da suddividere le regioni da analizzare in amplificati di circa 270-400 bp (tabella 1).

Per aumentare la probabilità di evidenziare le alterazioni nucleotidiche, i frammenti di DNA sono stati analizzati in due o più condizioni di corsa elettroforetica (acrilammide 6%, 8% e 10% con e senza glicerolo e tampone TBE 1X o 0,5X).

L'intera regione trascritta è stata sequenziata in tutti e 6 i campioni di controllo mediante sequenziamento con Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) su ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems). I primer utilizzati per il sequenziamento sono gli stessi utilizzati per il SSCP (tab.1).

Il sequenziamento è stato poi esteso ai campioni di DNA dei 27 pazienti con doppio distretto pieloureterale per escludere la possibilità che la tecnica SSCP non avesse evidenziato tutte le alterazioni presenti.

SEQUENZA UTR		
ESONE 1	Forward : 5' CCG 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 CCG 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

Tab.1

RISULTATI

5 sostituzioni nucleotidiche, già riportate come SNPs nelle banche dati bioinformatiche, sono state identificate in alcuni casi di doppio distretto pieloureterale e in alcuni casi di controllo:

- rs300568 (811 T>G in EBI-Ensembl; regione intronica 1-2)
- rs300572 (3569 A>G in EBI-Ensembl; esone 2)
- rs300573 (5278 C>A in EBI-Ensembl; regione intronica 2-3)
- rs300574 (6383 T>C in EBI-Ensembl; esone 3 in regione UTR)

- rs300575 (6428 G>C in EBI-Ensembl; esone 3 in regione UTR)

Tutti i 5 SNPs erano presenti anche in omozigosi.

In 3 pazienti con doppio distretto pieloureterale è stata evidenziata una sostituzione nucleotidica, in eterozigosi, non nota, assente nei 6 campioni di controllo (NM_199327 c.132+73A>C; regione intronica 1-2) (Fig.14).

In 1 campione di controllo è stata inoltre identificata una sostituzione nucleotidica, in eterozigosi, non nota (NM_199327 c268-62C>G; regione intronica 2-3) (Fig.15).

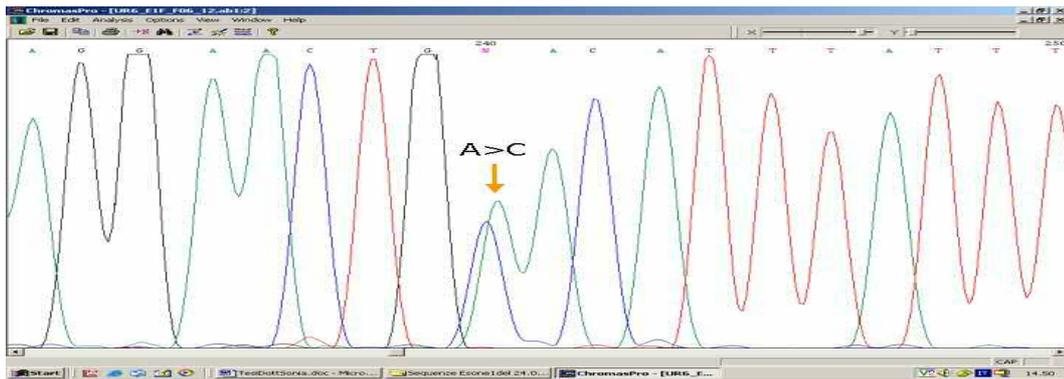


Fig. 14

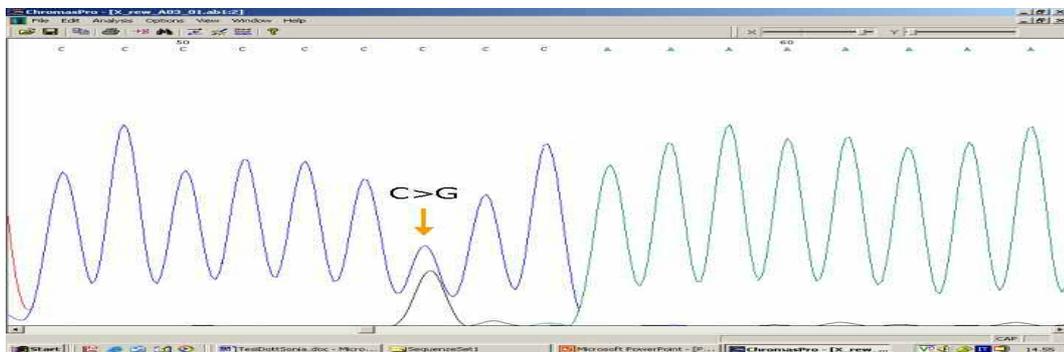


Fig. 15

MATERIALI E METODI

STUDIO DI ASSOCIAZIONE

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La frequenza allelica della sostituzione c268-62C>G è stata stimata in una popolazione non selezionata costituita da 370 campioni di DNA, da sangue di cordone ombelicale, mediante PCR e RFLP.

Il DNA è stato estratto da 200 µl di sangue congelato mediante kit "DNA EXTRACTION" (QIAGEN).

La concentrazione del DNA e il grado di purezza sono stati determinati mediante lettura con Nanodrop®.

Mediante PCR è stato amplificato il segmento genico contenente il polimorfismo indagato.

Primer Forward	5' GAG GTC ATT ACT AGG CGG T 3'
Primer Reverse	5' GAT CTG GTC TAA GGA CAA AAT A 3'
Amplicone	301 bp

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite in un volume finale di 25 µl, utilizzando 50-100 ng di DNA genomico (32 cicli: 95°C x 30", 57.3° x 30", 72°C x 30").

Il prodotto di amplificazione di 301 bp è stato digerito con l'enzima di restrizione Acil (Buffer 1X, 1 U di enzima a 37 °C overnight in un volume di reazione di 25

μl). I prodotti ottenuti dal taglio enzimatico, sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d'Agaroso low melting Nusieve® GTG®.

La presenza dell'allele G ha prodotto due siti di taglio per l'enzima di restrizione producendo, in seguito a digestione, tre frammenti di 250bp, 36 bp, 15 bp (queste ultime due bande non visualizzabili in agarosio).

La presenza dell'allele C ha invece prodotto un solo sito di taglio per l'enzima producendo, in seguito a digestione, due frammenti di 286 bp e di 15 bp (Fig.16)

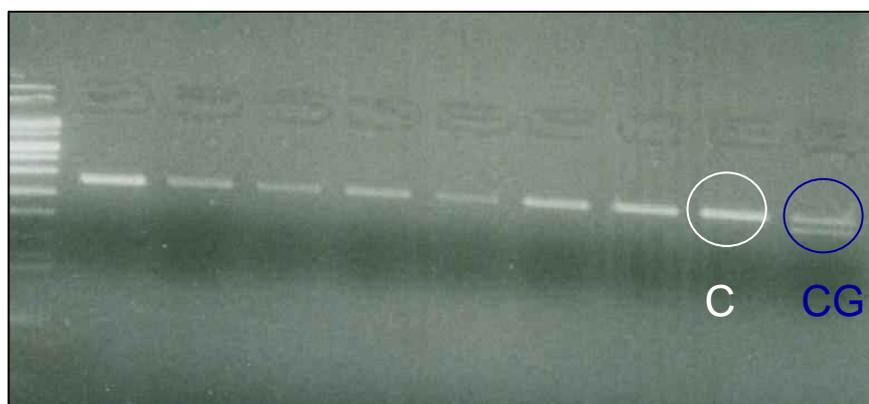


Fig.16

HRM (High Resolution Melt)

La frequenza della sostituzione non nota c.132+73A>C, osservata in 3 pazienti con doppio distretto ureterale, è stata stimata in 161 campioni di DNA da sangue di cordone ombelicale mediante una tecnica innovativa denominata HRM (High Resolution Melt) ottenuta utilizzando Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science).

Il Rotor-Gene™ 6000 è uno strumento dotato di un sistema rotante per il rilevamento in tempo reale di un'amplificazione genetica, utilizzabile per individuare, quantificare e/o genotipizzare campioni genetici.

I campioni vengono eccitati dal fondo della camera attraverso un LED. L'energia viene trasmessa attraverso la base delle provette, la fluorescenza emessa passa attraverso i filtri di emissione ai lati della camera e viene catturata da un fotomoltiplicatore. Il percorso ottico fisso assicura l'uniforme eccitazione di ogni singolo campione durante la rotazione nella camera (Fig.17).

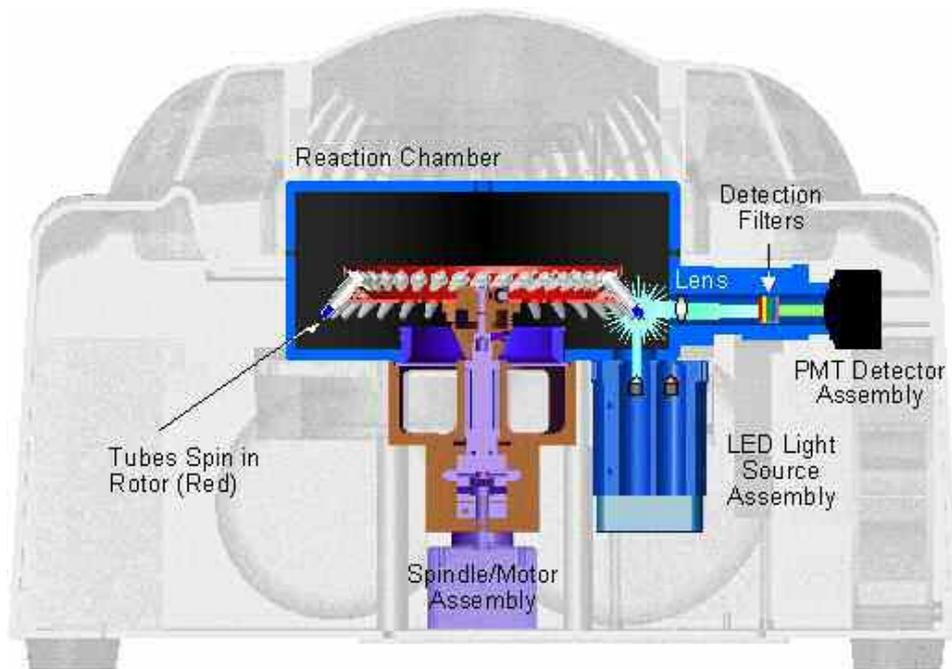


Fig. 17 Illustrazione dello schema ottico del Rotor-Gene™ 6000

L'HRM permette di distinguere le differenze di sequenza del DNA analizzando il percorso della curva di melting.

L'amplicone si denatura in presenza di un fluoroforo intercalante (EvaGreen™ Dye) che permette la saturazione totale del DNA senza inibire la reazione di PCR. La saturazione impedisce fenomeni di ricollocazione del fluoroforo durante la fase di melting (Fig. 18).

Ogni duplex (omoduplex o eteroduplex) esibirà un caratteristico percorso della curva di melting. L'HRM monitorizza questo percorso rilevando il cambiamento nella fluorescenza che avviene durante la fase di dissociazione con incremento della temperatura da DNA double strand a DNA single strand.

L' HRM può essere potenzialmente utilizzato per analizzare tutti i tipi di variazione di sequenza del DNA inclusi cambiamenti di singole basi, inserzioni, delezioni e sostituzioni di coppie di basi (48).

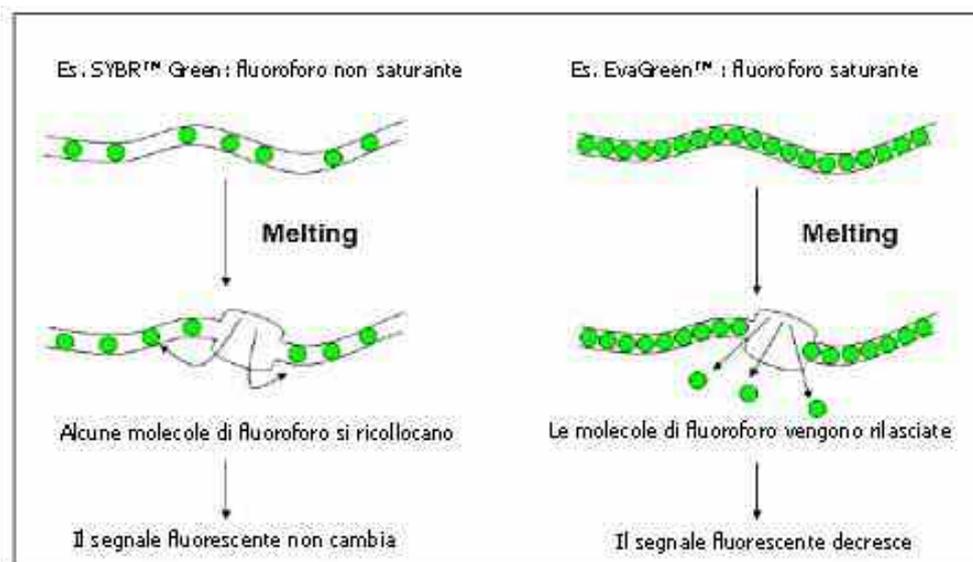


Fig.18 Modificato da: National Genetics Reference Laboratory (Wessex). Mutation scanning by high resolution melt analysis. June 2006.

La coppia di primer utilizzata per la genotipizzazione con HRM della sostituzione nucleotidica c.132+73A>C, è stata selezionata mediante il programma bioinformatico Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Primer Forward: 5' TGC ATT AGG TAA GTA CCG TTT CC 3'; Primer Reverse: 5' GAA AGC AAG TTC AAA TAA ATA AAT G 3'; Amplicone 107 bp).

RISULTATI

La variante allelica c.132+73C (Fig. 19) è risultata presente nel 7% della popolazione di controllo costituita da 161 campioni di DNA da sangue di cordone ombelicale. Può pertanto definirsi un polimorfismo comune o SNP. La variante allelica c268-62G, risultata presente, in eterozigosi, solo in 1 campione di controllo, non è stata osservata in nessuno dei 370 campioni di DNA da cordone ombelicale (tabella 2).

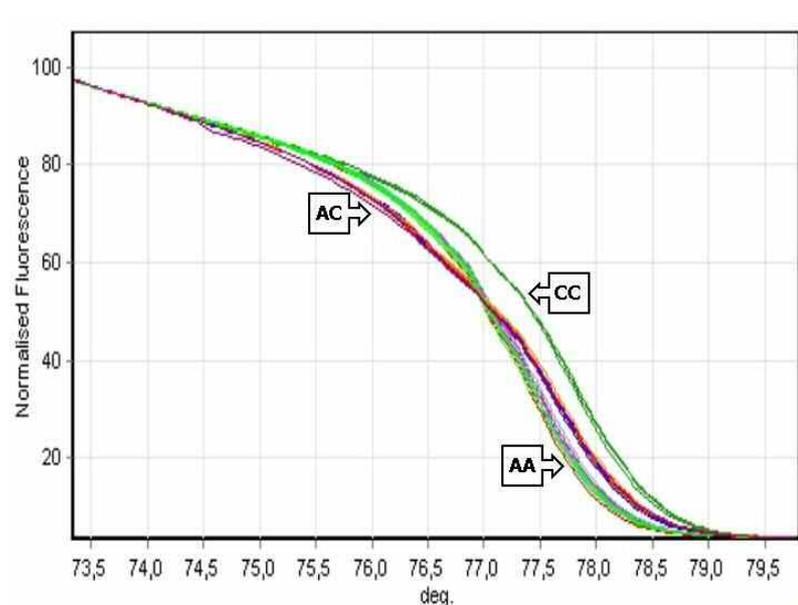


Fig.19 Curve di melt (in HRM) per la sostituzione nucleotidica c.132+73A>C

GENOTIPO	PZ CON DOPPIO URETERE (n.23) FREQUENZA GENOTIPICA	FREQUENZA ALLELICA	POPOLAZIONE NON SELEZIONATA (n.161) FREQUENZA GENOTIPICA	FREQUENZA ALLELICA
c.132+73AA	87%	c.132+73A 0.94 c.132+73C 0.06	86%	c.132+73A 0.93 c.132+73C 0.07
c.132+73AC	13%		12%	
c.132+73CC	0		2%	
	PZ CON DOPPIO URETERE (n.23) FREQUENZA GENOTIPICA	c.268-62C 1 c.268-62G 0	POPOLAZIONE NON SELEZIONATA (n.370) FREQUENZA GENOTIPICA	
c.268-62CC	100%		100%	c.268-62C 1
c.268-62CG	0		0	c.268-62G 0
c.268-62GG	0		0	

Tab.2 Frequenze alleliche e genotipiche delle due sostituzioni nucleotidiche non note

Il gene SPRY1 presenta due isoforme trascrizionali delle quali si hanno poche informazioni in relazione all'espressione spazio temporale e nessuna informazione sui sistemi di regolazione della trascrizione del gene. Le due sostituzioni nucleotidiche non note identificate in questo studio, sono localizzate in regioni ritenute regolatorie per lo splicing. Ipotizzando che queste varianti possano avere effetto sulla formazione dei trascritti è stata effettuata una ricerca bioinformatica predittiva per sequenze regolatorie dello splicing.

Entrambe le varianti si localizzano in sequenze riconosciute da RNA-binding protein: la sostituzione c.132+73A>C produrrebbe un sito di legame per il fattore SRp40 modificando anche la struttura secondaria del trascritto (Fig.18a) , mentre la sostituzione c.268-62C>G sembrerebbe solo diminuire la probabilità di legame per il fattore hnRNP E (Fig.18b).

E' possibile quindi che le due sostituzioni introniche possano essere "varianti genomiche coinvolte nello splicing" (SpaGVs) in particolare splice site genomic variants (5'ssGV e 3'ssGV).

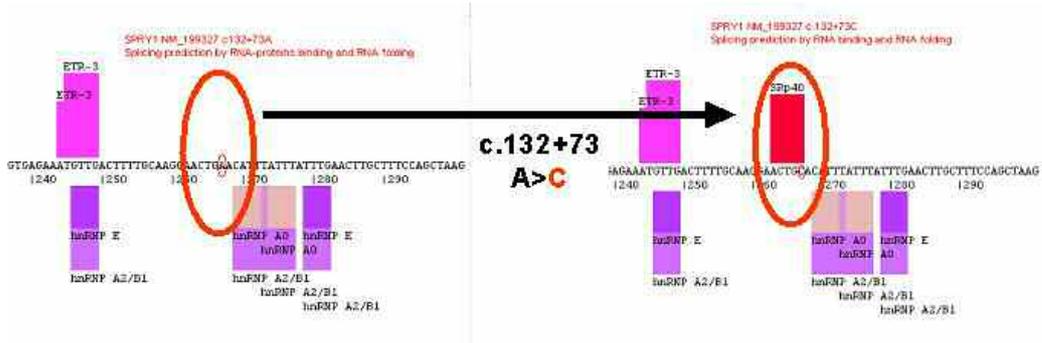


Fig.18a

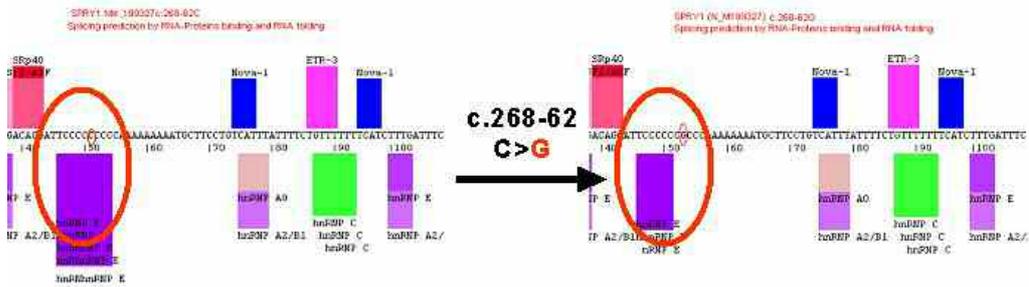


Fig.18b

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella prima fase di questa ricerca è stata applicata la tecnica dei microarray allo scopo di aumentare le conoscenze relative ai meccanismi patogenetici delle displasie renali associate ad uropatia malformativa, che rappresentano la principale causa di IRC in età pediatrica.

La displasia viene definita da una diagnosi istopatologica in cui il tessuto renale presenta, in parte o totalmente, aree indifferenziate e/o metaplastiche con presenza o assenza di cisti di origine tubulare, duttale o glomerulare. Le uropatie da alterato sviluppo e la displasia ad esse associata sono la conseguenza di una disregolazione del normale programma nefrourogenetico, che coinvolge un complesso network di geni. Studi sull'animale hanno permesso l'identificazione di alcuni geni coinvolti nella nefrourogenesi e, nell'uomo, mutazioni di geni omologhi sono responsabili di forme malformative sindromiche (Sdr. Kalman, Sdr. Coloboma e Rene, Sdr. Brachio-Oto-Renale).

Pochissime, sono a tutt'oggi, le conoscenze sui meccanismi patogenetici alla base della displasia renale.

L'avvento della tecnologia microarray ha rappresentato uno strumento unico per lo studio contemporaneo dell'espressione genica di decine di migliaia di geni ed è pertanto di grande interesse per i ricercatori che studiano le basi molecolari di una determinata malattia.

La tecnica dei microarray, segnalata dai dati della letteratura, è stata applicata su modelli renali murini per lo studio della nefrogenesi.

Schmidt-Ott et al hanno riportato i risultati di uno studio d'espressione effettuato su microdissezioni di mesenchima metanefrico e di bozze ureterali di embrioni (E13.5) di topo e di ratto dimostrando la conservazione di determinate molecole tra specie diverse (49). Tra i geni da loro identificati emergono geni target per il signalling di Gdnf come Cfl-1, Arg2, Ret, Wnt11, Catnd2, Ros1, Spry1; geni modulatori di molecole della matrice extracellulare come Agrn, Prss8, Pcsk9 e geni coinvolti in altri pathway come Gata3, Bmp7 e Fgf4.

Uno studio analogo è stato condotto da *Schwab K et al* per il confronto dell'espressione genica in microdissezioni di bozze ureterali e mesenchima metanefrici di embrioni murini in epoche gestazionali diverse (E11.5, E12.5, E13.5, E16.5), e in reni murini adulti (16). Da tale confronto è emersa una significativa sovraespressione, nelle prime fasi dello sviluppo rispetto all'organo adulto, di qualche centinaio di geni coinvolti in multiple categorie funzionali includendo fattori di trascrizione, fattori di crescita, molecole di trasduzione del segnale e del ciclo cellulare. Tra i geni identificati emergono geni già noti come Gdnf, Wt1, Wnt6 e geni di nuovo interesse come Gadd45, Umod, Sox11.

A nostra conoscenza non esistono studi dei profili di espressione effettuati su modelli animali per le displasie renali associate o meno ad uropatie malformative. Inoltre esistono pochissimi studi, condotti con tecnologia microarray, su reni umani adulti o fetali.

In particolare, in letteratura, sono segnalati solo due studi effettuati su reni displasici nell'uomo: uno condotto da *Liapis H et al* su reni multicistici e uno

condotto da *Jain S et al* su reni fetali e postnatali displasici confrontati con tessuto fetale o neonatale normali (50, 21).

Per entrambi gli studi vanno fatte, tuttavia, delle considerazioni. Nel rene multicistico non sono più riconoscibili strutture renali perché vi è la totale sostituzione del tessuto renale da formazioni cistiche a parete connettivale in cui non sono presenti nemmeno elementi metanefrici immaturi, che caratterizzano invece il tessuto renale displasico propriamente detto. Per quanto riguarda lo studio condotto da *Jain S* non è chiara la caratterizzazione istologica dei tessuti utilizzati per il confronto dei profili di espressione genica, che l'autore classifica in base alla percentuale di infiltrato infiammatorio presente. Questa non è in realtà una caratteristica istologica della displasia renale ed il profilo d'espressione risultante dall'analisi con microarray potrebbe essere quello dovuto alla presenza, oltre che di cellule residenti renali, anche di cellule infiltranti.

E' ormai ben noto che la normale nefrogenesi dipende dal cross talk tra il mesenchima metanefrico e la via ureterale in formazione. Alterazioni, durante questo delicato processo, causano difetti di crescita e differenziamento del fenotipo mesenchimale in fenotipo epiteliale.

Vista la fondamentale importanza della cellula epiteliale sia effettrice sia regolatoria del processo nefrourogenetico, in questa ricerca si è scelto di applicare la tecnologia microarray ad RNA estratto da colture cellulari primarie epiteliali ottenute da tessuto displasico e da tessuto normale associati al medesimo tipo di malformazione della via urinaria.

L'accurata scelta dei nostri campioni è stata confermata dai risultati dei microarray. Dalla prima analisi statistica è emersa una differenza statisticamente significativa per 1144 geni, 237 sovraespressi e 907 sottoespressi. A conferma dell'omogeneità dei campioni utilizzati, tutti i geni hanno seguito lo stesso andamento in tutti i campioni, i dati clusterizzavano in modo molto netto.

Tra i geni differenzialmente espressi sono stati individuati geni codificanti per fattori di trascrizione implicati nella proliferazione cellulare, proteine strutturali citoscheletriche, nucleari, di membrana; proteine coinvolte nella via di trasduzione del segnale; proteine coinvolte nel WNT e nel JAK-STAT pathway, vie metaboliche coinvolte nello sviluppo embrionale, nella proliferazione cellulare, nella determinazione dell'apoptosi e nella polarizzazione cellulare.

Un'analisi più stringente dei risultati è stata fatta mediante studi di genomica funzionale associati ad analisi computazionale ed, attraverso un approfondito studio della letteratura, l'attenzione è stata focalizzata su 4 geni potenzialmente coinvolti nella displasia renale: MMP2, sovraespresso, UPK1B, SPRY1 e SOX11 tutti e 3 sottoespressi.

In particolare, la sottoespressione di SOX11 è confermata anche nel lavoro di *Jain S et al.*

Studi su topo, in vivo e in vitro, hanno dimostrato che: *Mmp2* (metalloproteinasi2) è coinvolta nel branching ureterale con modulazione della propria espressione durante le varie fasi dello sviluppo renale (22). *Upk1b* (uroplachina1B) sembra essenziale soprattutto nelle fasi di maturazione dell'urotelio quindi negli stadi finali del differenziamento uroteliale (26). *Sox11* (Sry-like HMG box 11) ha

evidenziato un'elevata espressione genica nel rene metanefrico, localizzata in particolare nelle strutture della bozza ureterale destinate a differenziarsi in glomeruli. Un'elevata espressione di Sox11 è stata anche osservata durante la conversione del mesenchima metanefrico in fenotipo epiteliale (30). *Spry1* (Sprouty Homolog 1) agisce come modulatore della cascata di trasduzione del segnale di fattori di crescita come EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Plastrine Derived Growth Factor) o GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) con un meccanismo a feedback negativo (33). Sembra inoltre essere coinvolto nel branching ureterale agendo da regolatore del segnale del fattore di crescita Gdnf (41).

Questi quattro geni non sono mai stati oggetto, in letteratura, di studi molecolari, né con l'analisi di espressione né con l'analisi di mutazione, nelle displasie renali umane.

Nella seconda fase di questa ricerca si sono analizzati i profili di espressione di questi geni, mediante Real Time PCR.

L'analisi dei risultati ha evidenziato una sovraespressione, statisticamente significativa, di *SPRY1* e di *SOX11* nel tessuto renale istologicamente displasico rispetto al tessuto renale istologicamente normale.

Quindi il pattern di espressione ottenuto con la tecnica Real Time PCR risulta contrario a quello ottenuto con la tecnica dei microarray per entrambi questi geni.

Si può ipotizzare che questa differente regolazione trascrizionale sia da imputare alla diversa natura del materiale biologico da cui è stato estratto l'RNA

analizzato. Il tessuto renale, costituito da numerosi e diversi tipi cellulari, è sicuramente regolato da un complesso background genetico che può influire sull'espressione di SPRY1 e SOX11. Le colture primarie, ottenute per l'analisi con microarray, erano costituite invece da un solo tipo cellulare.

E' indubbio, comunque, che i geni SPRY1 e SOX11 presentano un'alterata regolazione della loro espressione in colture e in tessuti renali istologicamente displasici rispetto a colture e tessuti renali istologicamente normali, portando ad ipotizzare un loro coinvolgimento nel processo nefrourogenetico.

Alla luce dei risultati ottenuti nella fase 1 e 2 di questo studio e ai dati riportati in letteratura sul gene SPRY1, la terza fase di questa ricerca è stata focalizzata sull'analisi di mutazione del gene SPRY1 in pazienti con doppio distretto pieloureterale isolato e familiare, patologia dovuta da un'alterata duplicazione della gemma ureterale durante il periodo embrionale.

Studi effettuati su modelli murini hanno infatti dimostrato che la proteina Sprouty1, codificata dal gene Spry1, agisce da regolatore del segnale di Gdnf, fattore di crescita che induce la formazione della bozza ureterale. I topi mutanti sviluppano gemme ureterali sovrannumerarie che portano alla formazione di ureteri e reni multipli.

Lo screening mutazionale condotto su 27 pazienti con duplicità pieloureterale (di cui 4 membri della stessa famiglia) e su 6 soggetti di controllo, ha evidenziato 5 SNPs, già riportati nei data base bioinformatici, ma che non sono mai stati oggetti di studio in letteratura. L'analisi ha inoltre permesso l'identificazione di 2 nuove

sostituzioni nucleotidiche (c.132+73A>C; c.268-62C>G). Lo studio della frequenza di queste “varianti”, condotto su una popolazione non selezionata proveniente dalla stessa area geografica, ha permesso di definire la sostituzione c.132+73A>C un polimorfismo comune (SNP).

Per quanto riguarda la sostituzione c.268-62C>G, mai osservata nella popolazione di controllo, non è chiara la sua definizione.

Il polimorfismo genetico è definito come presenza di due o più varianti della sequenza del DNA dovute ad inserzioni, delezioni o sostituzioni di basi azotate che abbiano una frequenza non inferiore all'1% nella popolazione. Il polimorfismo più semplice e comune è lo SNP (Single Nucleotide Polymorfism) e nell'uomo la frequenza di queste variazioni è stata stimata pari ad uno ogni 700-1000 bp, la maggior parte delle quali è localizzata in regioni non codificanti. Lo SNP potrebbe quindi essere localizzato in sequenze, esoniche o introniche, che regolano la trascrizione o lo splicing influenzando, così, qualitativamente e/o quantitativamente il prodotto proteico. Alla luce delle nuove conoscenze sullo splicing e degli effetti che le alterazioni puntiformi possono avere, è stato ipotizzato che una frazione significativa di SNPs abbia potenzialmente degli effetti patogeni.

Dai dati della letteratura, come riportato da *Baralle M et al*, non risulta ancora chiaro quanto frequentemente variazioni di sequenza coinvolgenti siti di splicing, siano effettivamente coinvolte nei meccanismi patogenetici di alcune malattie. Alcune alterazioni, infatti, possono causare difetti nello splicing solo in determinati tessuti e sotto l'influenza di un set di fattori regolatori dello splicing e/o di un

particolare background genetico (51). Nella *beta talassemia*, ad esempio, il risultato delle alterazioni che creano siti alternativi di splicing o che modificano le sequenze consenso (in particolare i dinucleotidi GT e AG) modificano il livello di mRNA per la globina beta ma una parte delle molecole di mRNA viene comunque processata correttamente. In questi casi, l'analisi dell'mRNA attraverso Northern Blotting ed ibridazione rivela la presenza di mRNA per la globina beta con una mobilità elettroforetica alterata. Un altro esempio è rappresentato dall'identificazione di sostituzioni introniche, associate al VUR (reflusso vescico ureterale), in *ROBO2*, gene coinvolto nella regolazione dell'espressione metanefrica di GDNF durante il processo nefrourogenetico.

Non si può, quindi, escludere che gli SNPs identificati con l'analisi di mutazione di *SPRY1*, nella terza fase di questa ricerca, siano "varianti genomiche coinvolte nello splicing" (SpaGVs). *SPRY1* codifica due trascritti alternativi di cui, tutt'oggi, non sono noti i sistemi di regolazione.

Non è da sottovalutare, inoltre, che nei genomi complessi la funzione di un prodotto genico dipende molto spesso da un contesto difficile da definire a causa delle complicate reti metaboliche in cui le proteine sono coinvolte. I percorsi di segnalazione all'interno della cellula sono "degenerati", ovvero lo stesso risultato può essere ottenuto con diversi percorsi e componenti differenti. Quindi, le varianti genomiche, se pur non alterando significativamente il prodotto proteico, potrebbero realmente influire sul grado di "degeneranza" di un sistema.

In conclusione, la tecnica dei microarray ha permesso di evidenziare geni differentemente espressi nei campioni istologicamente displasici rispetto a quelli istologicamente normali. Un'approfondita analisi della letteratura, mirata ai geni maggiormente coinvolti nel processo nefrourogenetico, unitamente ad un'analisi computazionale dei nostri risultati, ha portato all'identificazione dei quattro geni candidati SOX11, SPRY1, UPK1B e MMP2. L'applicazione della tecnica dei microarray ha messo, inoltre, in evidenza una sovraespressione e sottoespressione di altri geni di cui si può ipotizzare un coinvolgimento nella nefrourogenesi e che saranno oggetto di futuri studi.

L'analisi di mutazione di SPRY1 ha portato all'identificazione di SNPs, alcuni dei quali potrebbero rappresentare "varianti genomiche coinvolte nello splicing" (SpaGVs). La mancata identificazione di mutazioni "causa malattia", nella casistica di questo studio, non esclude il coinvolgimento di SPRY1 nella determinazione delle malattie da alterato sviluppo. Infatti l'analisi mutazionale di questo gene verrà estesa ad una casistica più ampia di soggetti con duplicità pieloureterale e anche ad un'ampia casistica di soggetti con altre nefrouropatie malformative. Le varianti genomiche identificate saranno oggetto di studi di associazione e di studi di espressione in vitro.

BIBLIOGRAFIA

1. Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1157-91. Review.
2. Sampogna RV, Nigam SK. Implication of gene networks for understanding resilience and vulnerability in the kidney branching program. *Physiology* 19:339-347, 2004.
3. Schedl A, Hastie ND. Cross-talk in kidney development. *Curr Opin Genet Dev.* 2000 Oct;10(5):543-9. Review.
4. Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJ. Evolving concepts in human renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Apr;15(4):998-1007. Review.
5. Davies JA, Fisher CE. Genes and proteins in renal development. *Exp Nephrol.* 2002;10(2):102-13. Review.
6. Meyer TN, Schwesinger C, Bush KT, Stuart RO, Rose DW, Shah MM, Vaughn DA, Steer DL, Nigam SK. Spatiotemporal regulation of morphogenetic molecules during in vitro branching of the isolated ureteric bud: toward a model of branching through budding in the developing kidney. *Dev Biol.* 2004 Nov 1;275(1):44-67.
7. Woolf AS, Winyard PJ. Molecular mechanisms of human embryogenesis: developmental pathogenesis of renal tract malformations. *Pediatr Dev Pathol.* 2002 Mar-Apr;5(2):108-29. Review.

8. Rodríguez-Soriano J, Vallo A, Bilbao JR, Castaño L. Branchio-oto-renal syndrome: identification of a novel mutation in the EYA1 gene. *Pediatr Nephrol.* 2001 Jul;16(7):550-3.
9. Buller C, Xu X, Marquis V, Schwanke R, Xu PX. Molecular effects of Eya1 domain mutations causing organ defects in BOR syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 15;10(24):2775-81.
10. Pohl M, Bhatnagar V, Mendoza SA, Nigam SK. Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract. *Kidney Int.* 2002 Jan;61(1):10-9. Review.
11. Fletcher J, Hu M, Berman Y, Collins F, Grigg J, McIver M, Juppner H, Alexander SI. Multicystic dysplastic kidney and variable phenotype in a family with a novel deletion mutation of PAX2. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Sep;16(9):2754-61. Epub 2005 Jul 27. Review.
12. Eccles MR, Wallis LJ, Fidler AE, Spurr NK, Goodfellow PJ, Reeve AE. Expression of the PAX2 gene in human fetal kidney and Wilms' tumor. *Cell Growth Differ.* 1992 May;3(5):279-89.
13. Winyard PJ, Risdon RA, Sams VR, Dressler GR, Woolf AS. The PAX2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J Clin Invest.* 1996 Jul 15;98(2):451-9.
14. Bingham C, Bulman MP, Ellard S, Allen LIS, Lipkin GW, van't Hoff WG, Woolf AS, Rizzoni G, Novelli G, Nicholls AJ, Hattersley AT: Mutations in the

hepatocyte nuclear factor-1 β gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 219 -224.

15. Ulinski T, Lescure S, Beaufile S, Guignon V, Decramer S, Morin D, Clauin S, Deschenes G, Bouissou F, Bensman A, Bellanne-Chantelot C. Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Feb;17(2):497-503. Epub 2005 Dec 21.
16. Schwab K, Patterson LT, Aronow BJ, Luckas R, Liang HC, Potter SS. A catalogue of gene expression in the developing kidney. *Kidney Int*. 2003 Nov;64(5):1588-604.
17. Stuart RO, Bush KT, Nigam SK. Changes in gene expression patterns in the ureteric bud and metanephric mesenchyme in models of kidney development. *Kidney Int*. 2003 Dec;64(6):1997-2008.
18. Yano N, Endoh M, Fadden K, Yamashita H, Kane A, Sakai H, Rifai A. Comprehensive gene expression profile of the adult human renal cortex: analysis by cDNA array hybridization. *Kidney Int*. 2000 Apr;57(4):1452-9.
19. Higgins JP, Wang L, Kambham N, Montgomery K, Mason V, Vogelmann SU, Lemley KV, Brown PO, Brooks JD, van de Rijn M. Gene expression in the normal adult human kidney assessed by complementary DNA microarray. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):649-56. Epub 2003 Dec 2.
20. Price KL, Long DA, Jina N, Liapis H, Hubank M, Woolf AS, Winyard PJD. Microarray interrogation of human metanephric mesenchymal cells

- highlights potentially important molecules in vivo. *Physiol Genomics*, 2007; 28: 193-202.
21. Jain S, Suarez AA, McGuire J, Liapis H. Expression profiles of congenital renal dysplasia reveal new insights into renal development and disease. *Pediatr Nephrol*. 2007 Jul;22(7):962-74. Epub 2007 Apr 21.
 22. Kanwar YS, Wada J, Lin S, Danesh FR, Chugh SS, Yang Q, Banerjee T, Lomasney JW. Update of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Feb;286(2):F202-15. Review.
 23. Lelongt B, Legallicier B, Piedagnel R, Ronco PM. Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 Jan;10(1):7-12. Review.
 24. Haas C, Gleason B, Lin S, Tramonti G, Kanwar Y. Matrix metalloproteinases in renal development. *Connect Tissue Res*. 2004; 45(2):73-85.
 25. Yu J, Lin JH, Wu XR, Sun TT. Uroplakins 1a and 1b, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J Cell Biol* 1994; 125, 171-182.
 26. Deng FM, Liang FX, Tu L, Resing KA, Hu P, Supino M, Hu CC, Zhou G, Ding M, Kreibich G, Sun TT. Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin1b as an early step of urothelial plaque assembly. *J Cell Biol*, 2002; 159, 685-694.

27. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A., Musterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346, 245-250.
28. Wilson M, Koopman P. Matching SOX: partner proteins and cofactors of the SOX family of transcriptional regulator. *Current Opinion in Genetics & Development* 2002; 12, 441-446.
29. Hargrave M, Wright E, Kun J, Emery J, Cooper L, Koopman P. Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. *Dev Dyn.* 1997 Oct;210 (2):79-86.
30. Plisov SY, Ivanov SV, Yoshino K, Dove LF, Plisova TM, Higinbotham KG, Karavanova I, Lerman M, Perantoni AO. Mesenchymal-epithelial transition in the developing metanephric kidney: gene expression study by differential display. *Genesis* 2000 Jul;27 (3):136.
31. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000 Oct 13;103 (2):211-25. Review.
32. Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD. Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem.* 2001 Dec 7;276 (49):46460-8. Epub 2001 Oct 3.
33. Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol.* 2006 Jan;16 (1):45-54. Epub 2005 Dec 7. Review.

34. Dikic I, Giordano S. Negative receptor signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 2003, 15:128-135.
35. Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol.* 2002 Nov;4 (11):850-8.
36. Ozaki K, Miyazaki S, Tanimura S, Kohno M. Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms. *J Cell Sci.* 2005 Dec 15;118 (Pt 24) :5861-71.
37. Miyazaki Y, Ichikawa I. Ontogeny of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. *Pediatr Int.* 2003 Oct;45 (5):598-604.
38. Sainio K, Suvanto P, Davies J, Wartiovaara J, Wartiovaara K, Saarma M, Arumäe U, Meng X, Lindahl M, Pachnis V, Sariola H. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development.* 1997 Oct;124 (20):4077-87.
39. Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays.* 2006 Feb;28 (2):117-27. Review.
40. Popsueva A, Poteryaev D, Arighi E, Meng X, Angers-Loustau A, Kaplan D, Saarma M, Sariola H. GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. *J Cell Biol.* 2003 Apr 14;161 (1):119-29. Epub 2003 Apr 7.
41. Basson MA, Akbulut S, Watson-Johnson J, Simon R, Carroll TJ, Shakya R, Gross I, Martin GR, Lufkin T, McMahon AP, Wilson PD, Costantini FD,

- Mason IJ, Licht JD. Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell*. 2005 Feb;8 (2):229-39.
42. Basson MA, Watson-Johnson J, Shakya R, Akbulut S, Hyink D, Costantini FD, Wilson PD, Mason IJ, Licht JD. Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. *Dev Biol*. 2006 Nov 15;299 (2):466-77. Epub 2006 Aug 25.
43. Wang H, Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou YH, Liao WS, Fuller GN, Zhang W. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res*. 2003 Aug 1;63 (15):4315-21.
44. Kwabi-Addo B, Wang J, Erdem H, Vaid A, Castro P, Ayala G, Ittmann M. The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64 (14):4728-35.
45. Guy GR, Wong ES, Yusoff P, Chandramouli S, Lo TL, Lim J, Fong CW. Sprouty: how does the branch manager work? *J Cell Sci*. 2003 Aug 1;116 (Pt 15):3061-8. Review.
46. Lim J, Yusoff P, Wong ES, Chandramouli S, Lao DH, Fong CW, Guy GR. The cysteine-rich sprouty translocation domain targets mitogen-activated protein kinase inhibitory proteins to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in plasma membranes. *Mol Cell Biol*. 2002 Nov;22 (22):7953-66.

47. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S, Baron R, Yoshimura A. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*. 2001 Aug 9;412 (6847):647-51.
48. White H, Potts G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science), HR1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory NGRL (Wessex). June 2006.
49. Kerecuk L, Sajoo A, McGregor L, Berg J, Haq MR, Sebire NJ, Bingham C, Edghill EL, Ellard S, Taylor J, Rigden S, Flinter FA, Woolf AS. Autosomal dominant inheritance of non-syndromic renal hypoplasia and dysplasia: dramatic variation in clinical severity in a single kindred. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jan;22(1):259-63. Epub 2006 Sep 23.
50. Schmidt-Ott KM, Yang J, Chen X, Wang H, Paragas N, Mori K, Li JY, Lu B, Costantini F, Schiffer M, Bottinger E, Barasch J. Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):1993-2002. Epub 2005 May 25.
51. Liapis H, Doshi RH, Watson MA, Liapis A, Steinhardt GF. Reduced renin expression and altered gene transcript profiles in multicystic dysplastic kidneys. *J Urol*. 2002 Oct; 168 (4Pt2): 1816-20.
52. Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet*. 2005 Oct;42(10):737-48. Review.