

VARIANTI RARE DEL GENOMA E SUSCETTIBILITÀ ALLE MALATTIE MULTIFATTORIALI. L'ESEMPIO DEL RENE CON MIDOLLARE A SPUGNA

Franca Anglani¹, Antonia Fabris², Rossella Torregrossa¹, Rosalba Cristofaro¹, Giovanni Gambaro³, Angela D'Angelo⁴

¹Laboratorio di Istomorfologia e Biologia Molecolare del Rene, Clinica Nefrologica, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Padova, Padova

²Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgiche, Università di Verona, Verona

³Divisione di Nefrologia e Dialisi, Dipartimento di Medicina Interna, Università Cattolica "Sacro Cuore", Roma

⁴Clinica Nefrologica, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Padova, Padova

Il Rene con Midollare a Spugna (MSK), malattia rara la cui incidenza è stimata tra 5 su 10000 e 5 su 100000, rappresenta un'anomalia morfologica del rene, caratterizzata da modificazioni ectasiche e cistiche dei dotti collettori della midollare. Può essere annoverato tra la nefropatie malformative anche in ragione della sua frequente associazione con altre malformazioni congenite non solo renali, quali rene a ferro di cavallo, aplasia renale monolaterale e rene piccolo controlaterale (1-3), ma anche extra-renali, la più frequente delle quali è l'emi-ipertrofia congenita (4).

La malattia è stata riconosciuta per la prima volta in Italia, a Padova, da Lenarduzzi nel 1939, grazie all'impiego dell'allora nuova tecnica dell'urografia e, successivamente, è stata descritta nel 1949 da Cacchi e Ricci, rispettivamente urologo e patologo dell'Università patavina (5).

La patogenesi della malattia non è nota, ma la maggior parte degli Autori concorda nell'affermare che si tratta di una patologia congenita con espressione ritardata. La malattia è asintomatica nella maggior parte dei casi, ma può presentarsi anche con ematuria, infezioni urinarie o coliche renali. I sintomi si rendono solitamente evidenti nella terza o nella quarta decade. I maschi e le femmine sono colpiti in ugual misura. Che alla base di MSK ci possa essere una componente genetica importante è suggerito non solo dall'appartenenza al gruppo delle patologie malformative, ma anche dalla sua associazione con altre malattie ereditarie (6) e dalla presenza di casi familiari dove la malattia sembra essere trasmessa come carattere autosomico dominante (7, 8).

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 ammalarsi 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 e megabasi), o CNV (*Copy Number Variation*), che decorrono nella popolazione come comuni polimorfismi con una frequenza compresa fra l'1% e il 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 (9). Il limite di questi studi è la necessità che essi siano condotti su un numero molto elevato di casi e di controlli ben definiti dal punto di vista fenotipico, affinché sia raggiunta una significatività statistica e affinché possano essere replicati.

Un approccio alternativo ai WGAS si basa sulla "rare variant hypothesis" (10) che propone che una porzione significativa della suscettibilità genetica a 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 lo 0.1% e l'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 dei 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 dei geni candidati e 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 alla stessa area geografica dei casi.

Lo studio che abbiamo condotto sul Rene con Midollare a Spugna allo scopo di identificarne le basi genetiche, e che è stato recentemente pubblicato su *CJASN* (11), rientra a pieno titolo in questo secondo approccio e ci ha permesso di identificare delle varianti rare del gene GDNF, associate in maniera quasi causativa alla malattia in un gruppo di pazienti.

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 nefrocalcosi, calcoli renali e disfunzioni del tubulo nefronico. La sua patogenesi deve rendere conto, perciò, 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 dal dotto mesonefrico di Wolff della gemma ureterale che si allunga fino a invadere il mesenchima. La gemma ureterale esprime sul suo apice il recettore RET di GDNF (Fig. 1). 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 (12, 13). In base a queste considerazioni, abbiamo ipotizzato che MSK sia la conseguenza di un disturbo dell'interfaccia "gemma

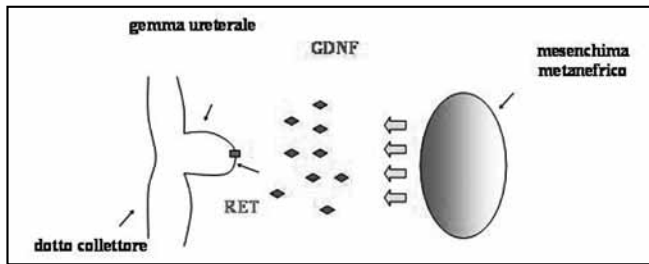


Fig. 1 - Interfaccia "gemma ureterale-mesenchima metanefrico". GDNF, prodotto dal mesenchima metanefrico, e il suo recettore RET, all'apice della bozza ureterale, conducono in maniera fine e coordinata lo sviluppo dei dotti collettori e la formazione dei nefroni.

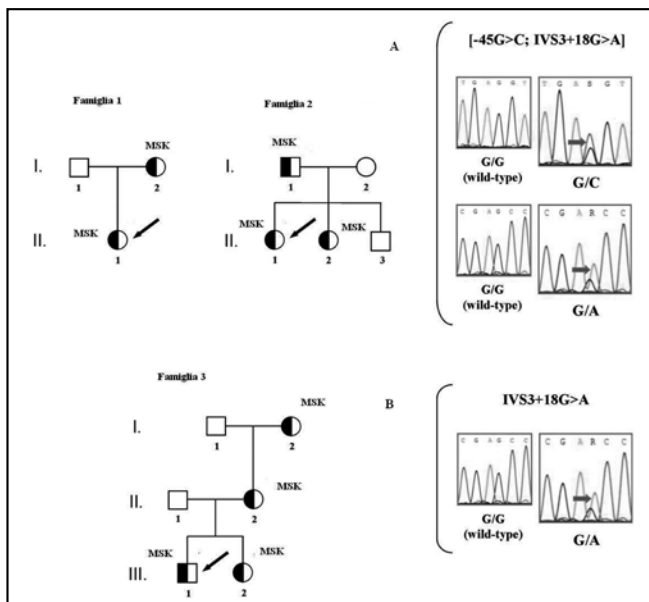


Fig. 2 - Alberi genealogici dei casi familiari di MSK che mostrano come le mutazioni di GDNF (indicato con il simbolo mezzo pieno) segregano con la malattia. A e B: ferogrammi della sequenza di GDNF che dimostrano la presenza delle varianti nucleotidiche come allele complesso (A) e come allele semplice (B). Nelle famiglie 1 e 2 segrega con MSK l'allele complesso [-45G>C e IVS2+18G>A], mentre, nella famiglia 3, l'allele semplice [IVS2+18G>A].

ureterale-mesenchima metanefrico", a causa di mutazioni/polimorfismi dei geni RET e/o GDNF.

Una volta scelti i geni candidati, li abbiamo analizzati mediante sequenziamento e profilo di restrizione enzimatica in una popolazione accuratamente selezionata di casi: 55 pazienti con MSK bilaterale diagnosticato tramite urografia, provenienti da una vasta popolazione di origine veneta di pazienti con nefrolitiasi calcica idiopatica reclutati presso la Nefrologia di Verona. Da questa stessa popolazione, sono stati selezionati anche i controlli: 85 pazienti di sesso ed età comparabile a quella dei casi, accuratamente esaminati per escludere la presenza di MSK, anche parziale.

L'ipotesi patogenetica si è rivelata plausibile: in 8 pazienti, infatti, sono state trovate alterazioni della sequenza del gene GDNF. Due sono le varianti nucleotidiche trovate, mai descritte precedentemente, localizzate nella regione del promotore (-45G>C e IVS2+18G>A). Esse sono presenti in quattro pazienti come allele complesso [-45G>C e IVS2+18G>A] e in 4 come allele semplice [IVS2+18G>A]. Queste stesse mutazioni non sono state trovate

nella popolazione di controllo, dando luogo a una differenza nella frequenza altamente significativa ($\chi^2=10.552$ $p=0.001$). In una popolazione generale del Veneto (125 campioni di cordone ombelicale) è stata stimata la loro frequenza allelica, che risultava inferiore all'1%. Eravamo, quindi, di fronte a delle varianti rare con un chiaro effetto fondatore (più pazienti portano la stessa mutazione) di cui, come passo successivo, dovevamo dimostrare un effetto sulla funzione del gene, cioè sulla sua trascrizione o traduzione. Per la mutazione -45G>C abbiamo utilizzato un approccio cosiddetto in "silico", che prevede l'uso di software in grado di predire quale potrebbe essere l'effetto delle varianti sulla proteina o sull'RNA messaggero (14). Tre differenti software erano in accordo nel prevedere che la mutazione causasse un'alterazione della struttura del messaggero (attivazione di un sito criptico di splicing). Per la mutazione IVS2+18G>A, invece, abbiamo potuto dimostrare che, nella papilla renale di un paziente con MSK e mutazione, l'espressione genica di GDNF era più elevata rispetto al tessuto renale di controllo, deponendo per una sua disregolazione nel tessuto mutato. Un'altra considerazione ci permetteva di rafforzare quanto trovato sull'effetto delle due mutazioni nuove sulla trascrizione di GDNF: la regione del gene in cui esse insistono costituisce un dominio di legame con il fattore di trascrizione PAX2, fattore cruciale per il differenziamento dei tubuli renali. Abbiamo ipotizzato che un'alterata risposta di GDNF a PAX2 possa portare a un disturbo di quei messaggi differenziativi necessari non solo allo sviluppo regolare dei dotti collettori (15), ma anche a una corretta nefrogenesi e, quindi, a 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. Inverso, ipercalciuria, elevato pH urinario e ipocitaturia caratterizzano il profilo urinario dei nostri pazienti con MSK, soprattutto di quelli con mutazione GDNF (11).

A rafforzarsi nella convinzione che avevamo trovato delle varianti genetiche con un forte effetto sulla genesi-patogenesi della malattia è stato il riscontro di MSK in alcuni familiari dei pazienti con mutazione. Ancora di più, questi familiari affetti portavano nel loro genoma la mutazione GDNF, il che depondeva per una trasmissione autosomica dominante della malattia, con espressività variabile in quanto i familiari non mostravano alcun sintomo di malattia (Fig. 2).

Solo il 16% dei pazienti da noi studiati, tutti con MSK bilaterale, ha dimostrato di avere delle varianti genetiche rare con un forte effetto sul fenotipo; nonostante ciò il nostro studio ci ha permesso di mettere in luce alcuni aspetti di MSK, mai prima d'ora conosciuti, che potranno comportare anche dei risvolti nella pratica clinica: 1) nella patogenesi della malattia sono coinvolti geni dello sviluppo; 2) i casi familiari sono più numerosi di quanto si pensava e, infine, 3) la prevalenza di MSK nella popolazione generale è di certo sottostimata.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI: Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Franca Anglani
 Clinica Nefrologica
 Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche
 Via Giustiniani 2
 35128 Padova
 e-mail: franca.anglani@unipd.it

BIBLIOGRAFIA

1. Lambrianides AL, John DR. Medullary sponge disease in horseshoe kidney. *Urology* 1987; 29 (4): 426-7.
2. Gambaro G, Fabris A, Citron L, et al. An unusual association of contralateral congenital small kidney, reduced renal function and hyperparathyroidism in sponge kidney patients: on the track of the molecular basis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (6): 1042-7.
3. Iwig J, Thiemann KJ. [Medullary sponge kidney with megapylon and primary congenital megaureter in unilateral renal aplasia]. *Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed* 1969; 111 (1): 137-40.
4. Rommel D, Pirson Y. Medullary sponge kidney--part of a congenital syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 (3): 634-6.
5. Gambaro G, Feltrin GP, Lupo A, Bonfante L, D'Angelo A, Antonello A. Medullary sponge kidney (Lenarduzzi-Cacchi-Ricci disease): a Padua Medical School discovery in the 1930s. *Kidney Int* 2006; 69 (4): 663-70.
6. Diouf B, Ka EH, Calender A, Giraud S, Diop TM. Association of medullary sponge kidney disease and multiple endocrine neoplasia type IIA due to RET gene mutation: is there a causal relationship? *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (12): 2062-3.
7. Copping GA. Medullary sponge kidney: its occurrence in a father and daughter. *Can Med Assoc J* 1967; 96 (10): 608-11.
8. Kuiper JJ. Medullary sponge kidney in three generations. *NY State J Med* 1971; 71 (22): 2665-9.
9. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447 (7145): 661-78.
10. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 2008; 40 (6): 695-701.
11. Torregrossa R, Anglani F, Fabris A, et al. Identification of GDNF gene sequence variations in patients with medullary sponge kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5 (7): 1205-10.
12. Schedl A, Hastie ND. Cross-talk in kidney development. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10 (5): 543-9.
13. Huber SM, Braun GS, Segerer S, Veh RW, Horster MF. Metanephrogenic mesenchyme-to-epithelium transition induces profound expression changes of ion channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279 (1): F65-76.
14. Nalla VK, Rogan PK. Automated splicing mutation analysis by information theory. *Hum Mutat* 2005; 25 (4): 334-42.
15. Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR. Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Development* 2001; 128 (23): 4747-56.