



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE**

CICLO XXIX

**L'analisi genomica per la diagnosi e il trattamento
delle anomalie congenite dei reni e delle vie urinarie (CAKUT)**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Riccardo Bonadonna

Tutore:

Chiar.mo Prof. Landino Allegri

Dottorando: Dr Monica Bodria

Anni 2014/2017

INDICE GENERALE

Definizioni utili per la lettura di questa tesi **Pag. 5**

INTRODUZIONE

Introduzione alla medicina personalizzata nelle malformazioni dei reni e delle vie urinarie **Pag. 7**

- La Medicina Personalizzata: definizione e applicabilità
- Ruolo della Medicina Personalizzata in Nefrologia

Anomalie Congenite dei Reni e delle Vie Urinarie: CAKUT **Pag. 17**

- 1. Definizione, epidemiologia e classificazione
- 2. Patogenesi
- 3. L'architettura genetica dei CAKUT nell'Uomo
- 4. Il ruolo delle copy number variations nei CAKUT
- 5. Forme di CAKUT monogeniche causate da mutazioni puntiformi
- 6. Ereditarietà complessa
- 7. Implicazioni cliniche dei test genetici
- 8. Conclusioni

TESI SPERIMENTALE

- Struttura della presente tesi sperimentale Pag.34

- Studi di genetica sul CAKUT Pag. 36

1) Analisi di CNV in oltre 2000 pazienti per definire l'architettura genetica del CAKUT

2) Studi *in silico* e di espressione per identificare nuovi geni candidati nel CAKUT

3) Genetic dissection del coinvolgimento renale nella sindrome di DiGeorge

- La delezione nella regione 22q11.2 C-D della Sindrome di DiGeorge è frequente nel CAKUT

- Modello funzionale con zebrafish mostra difetti nel pronefro per *aifm3*, *snap29*, e *crkl*.

- L'uso di whole exome e targeted next-generation sequencing hanno identificato una mutazione

deleteria in CRKL

- Studi di espressione e funzionali implicano CRKL come causa principale della genesi

della malattia renale nella DGS

- Genetic dissection del coinvolgimento renale nella sindrome di DiGeorge: risultati complessivi

-Precision in CAKUT: gruppo di studio italiano sulla patogenesi e le complicanze delle anomalie congenite

dei reni e delle vie urinarie Pag. 52

- Introduzione
- Presupposti e procedure allo studio
- Ipotesi, rationale e procedure al protocollo di Medicina Personalizzata
- Significato e innovazione dello studio
- Risultati preliminari
- Future directions

- Imaging studies in CAKUT Pag. 73

- Materiali e Metodi
- Analisi statistica
- Risultati

DISCUSSIONE Pag. 80

BIBLIOGRAFIA Pag. 83

DEFINIZIONI UTILI PER LA LETTURA DI QUESTA TESI

- DNA: acido deossiribonucleico. L'intero genoma umano contiene 3 miliardi di basi (ad un lettore veloce ci vorrebbero circa 9.5 anni per leggere la sequenza di un solo individuo) e circa 20,000 geni, ognuno organizzato in sequenze codificanti (esoni) e non codificanti (introni).
- Single nucleotide variants (SNVs): sostituzioni di un singolo nucleotide. Per convenzione, quando la frequenza dell'allele minore ("mutato") è superiore all'1% si parla di single nucleotide polymorphisms (SNPs); quando la frequenza dell'allele minore è inferiore all'1% si parla di mutazione (anche se in realtà la mutazione sottende un elemento di causalità che richiede prove funzionali in modelli animali e/o cellulari).
- Copy number variations (CNVs): aumento o perdita di DNA nucleare della linea germinale di dimensioni comprese tra 1 kilobase (Kb) fino a diverse megabasi (Mb) e che non sono rilevabili dalle tecniche di citogenetica convenzionale; analogamente a quanto sopra, quando una CNV ha una frequenza superiore all'1% si parla di CNP (copy number polymorphism).
- Sanger sequencing: si basa sul sequenziamento diretto del genoma umano usando separazione in gel di elettroforesi (in genere su un sequenziatore a capillari); è ancora ritenuto il gold standard per la validazione di varianti puntiformi (SNVs) ed è la tecnologia che è stata utilizzata per il completamento del primo draft del genoma umano (costato circa 3 miliardi di dollari).

- Next-generation sequencing (anche nota come massively parallele sequencing): termine che descrive diverse moderne tecnologie di sequenziamento (ad es. Illumina sequencing, Roche 454 sequencing, SOLiD sequencing, ecc..) che permettono di sequenziare milioni di frammenti di DNA o RNA in parallelo così riducendo di diversi ordini di grandezza i costi e i tempi di sequenziamento; per esempio, un intero genoma umano può ora essere sequenziato in 24 ore ad un costo appena inferiore ai 1,000 dollari.
- Whole exome e whole genome sequencing: con questi termini si intende il sequenziamento di tutti gli esoni di un genoma (whole exome) e il sequenziamento dell'intero genoma (esoni, introni, e regioni intergeniche) di uno o più individui, rispettivamente.

INTRODUZIONE

La Medicina Personalizzata: definizione e applicabilità

La Medicina Personalizzata (Personalized or Precision Medicine) è un approccio emergente al trattamento e alla prevenzione delle malattie incentrata sulla variabilità individuale nei geni, nell'ambiente, e nello stile di vita di ogni persona, intesa come singolo e non come popolazione.

E' possibile definire la Medicina Personalizzata sotto un punto di vista strettamente clinico, come strategia intesa a prevedere il giusto trattamento per il giusto paziente al momento giusto e coinvolgere il paziente in una via che esso possa perseguire nel tempo e che possa migliorare la sua salute e la salute della sua famiglia.

Il concetto di Medicina Personalizzata, benchè coinvolga una rete di connessione di diverse discipline che studiano le malattie e il loro sviluppo, è emerso recentemente grazie alle straordinarie innovazioni in campo di genetica molecolare, soprattutto riguardo al sequenziamento diretto (next-generation sequencing). Infatti, la possibilità di sequenziare l'intero genoma di un singolo individuo in meno di 24 ore ad un costo inferiore ai 1,000 euro, rappresenta un'opportunità senza precedenti per l'identificazione delle varianti genetiche che predispongono o causano i diversi fenotipi e malattie di ogni singolo individuo. Una volta identificato il difetto (o alterazione) genetico che determina la malattia di un individuo, il trattamento si basa sulla correzione (o targeting) individualizzata di quel difetto genetico.

Questa nuova strategia del XXI secolo rimpiazza il paradigma del secolo scorso che definiva una malattia sulla base della patologia o per associazione a segni e sintomi, in cui una malattia o sindrome complessa

era causata, in tutti gli individui che la possedevano, da un singolo fattore eziopatogenetico (postulato di Koch). Come risultato, gli studi clinici si sono focalizzati nell'identificazione del farmaco (o intervento) che curi o tratti la malattia in tutti gli individui che la posseggono, indipendentemente dal background genetico etnico/razziale o individuale.

Sulla base di questa idea il metodo scientifico stabilito per l'insegnamento della medicina e della ricerca medica agli inizi del XX secolo seguiva una metodologia che partendo dall'osservazione generava un'ipotesi per poi applicare un test che dimostrasse la correlazione univoca tra un singolo fattore e la sindrome esistente. Contemporaneamente la tassonomia delle malattie era stata costruita sulla base della anatomia patologica e la diagnosi di una malattia era fatta tramite l'identificazione di un patogeno all'interno di un tessuto o utilizzando sintomi e segni surrogati. Se un germe non veniva identificato, ci si riferiva al tipo di patologia in atto (infiammazione, metaplasia, disordini funzionali, ecc...) piuttosto che all'eziologia. Il trattamento era quindi deciso sulla base della diagnosi e sull'evidenza di risposta di un paziente con le medesime caratteristiche precedentemente trattato con lo stesso regime[1]. Questo ha portato allo sviluppo della medicina basata sull'evidenza (evidence-based medicine) in cui l'efficacia di un farmaco viene misurata in base al confronto tra gruppi numerosi di pazienti trattati allo stesso modo con lo stesso farmaco (o gruppi di farmaci) e gruppi numerosi di pazienti trattati con placebo o con il farmaco (o gruppi di farmaci) che costituiscono l'attuale *standard of care*. Sebbene questo tipo di approccio abbia condotto allo sviluppo di protocolli terapeutici che, in numerose malattie e sindromi, hanno portato ad una ridotta mortalità e morbilità, esso porta inevitabilmente a vedere ogni singolo paziente come la media dei pazienti

della popolazione affetta da questa malattia e, di conseguenza, porta alla perdita completa della variabilità interindividuale. Infatti, se da un certo punto di vista il trial clinico ci permette di affermare che, se trattiamo tutti i nostri pazienti con lo stesso regime terapeutico, abbiamo una percentuale (spesso molto variabile) di successo rispetto al placebo o al trattamento precedente, spesso non ci permette di identificare i singoli pazienti che trarranno beneficio dal nuovo regime rispetto a quelli che non risponderanno.

Per fare un esempio pratico ed esemplificativo, in campo di oncologia, campo pioniere della medicina personalizzata, l'utilizzo del farmaco trastuzumab(anticorpo monoclonale contro il recettore HER2) nel cancro metastatico della mammella è stato dimostrato efficace nell'aumentare la sopravvivenza in pazienti con mutazione di HER2 mentre è inefficace e potenzialmente dannoso in pazienti senza mutazione di HER2[2]. Dal punto di vista anatomopatologico i due tumori sono indistinguibili, quindi se trattassimo tutti i pazienti con cancro della mammella con trastuzumab non avremmo strumenti per predire chi ne trarrà vantaggi e chi ne riceverà danno.

La Medicina Personalizzata differisce dal modello del XX secolo sotto vari aspetti (tab.1). Il punto chiave è che differenti meccanismi eziologici possono causare lo stesso segno e sintomo in un soggetto. All'interno dell'esistente impalcatura più malattie sono classificate come patologie omogenee e sono valutate e trattate come fossero determinate da una unica sottostante causa. In realtà questi disordini non possono essere tutti risolti con il metodo binario del XX secolo in cui un unico agente eziologico determina una patologia complessa (vedi di nuovo l'oncologia: la maggior parte dei tumori, benchè indistinguibili dal

punto di vista anatomopatologico, rappresentano entità molecolari estremamente diverse con risposta diversa a trattamenti specifici che mirano al difetto genetico sottostante). La Medicina Personalizzata del XXI secolo si basa invece su un modello di meccanismo e di predizione di un sistema biologico normale determinando quali fattori genetici, ambientali e strutturali singolarmente e combinati insieme alterino la capacità di un sistema fino al punto da determinare una patologia. Stabilire un modello di malattia e simulare una patologia complessa è infatti un passaggio critico poiché processi complessi e in evoluzione non possono essere compresi studiando una singola variabile o multiple singole variabili. Quindi, modelli particolarmente applicati nelle ultime decadi come l'evidence based medicine verranno verosimilmente superati (lo sono già in numerosi campi) da questo nuovo approccio che permette di svelare i reali meccanismi sottostanti una patologia nel singolo individuo[3].

Diversamente dalla pratica corrente le cure mediche vengono in questo nuovo metodo focalizzate non sulla malattia ma sullo stato di salute, non su un determinato stato di malattia ma su una sua traiettoria, i trattamenti non basati sulla patologia ma evitando la patologia, non sul "trial and error" ma su una selezione del migliore trattamento a sua volta in continua evoluzione (tab.1).

Dominio	XX secolo	XXI secolo
Obiettivo Principale	Trattamento delle malattie	Prevenzione delle malattie
Tecnologie disponibili	Microscopi, tecniche di coltura, biopsie	Next generation sequencing, biomarkers, computer
Modello di malattia	Germ Theory	Rischio complesso, variabile risposta a uno stress
Paradigma, forza trainante	Flexner report del 1910	Economica
Focus educativo	Diagnosi e classificazione delle malattie	Risposte normali, assetto delle varianti
Focus scientifico	Determinare le associazioni	Determinare i meccanismi
Approccio scientifico	Postulato di Koch, esiti statistici	Creazione di modelli e simulazioni, caratteristiche della performance
Classificazione delle malattie	Patologia tissutale, sindromi	Rischio genetico e ambientale,

		endpoint surrogati
Time-frame della malattia	Statistica, cross-sectional	Dinamico, longitudinale
Focus del medico	Disfunzione complessiva dell'organo	Attività e traiettoria dei sistemi disfunzionali
Assetto	Classificazione delle malattie	Predizione dell'outcome
Trattamento	Trial and error	Ottimizzato, a target
Misura del successo clinico	Basato sulla popolazione	Basato sull'individuo
Utilità del paradigma	Malattie infettive, genetica mendeliana, malattie legate a una singola causa, riscontro del cancro	Malattie infiammatorie, genetica dei tratti complessi, disordini funzionali, controllo del cancro

Tabella 1. La medicina nel XX e nel XXI secolo(modificata da Whitcomb DC, *Nat Rev GastroenterolHepatol*, 2012[4]).

La genetica molecolare riveste in questo nuovo approccio un ruolo cardine, essendo in grado di portare alla definizione diagnostica di una malattia a partire da un fenotipo comune, di predirne l'andamento clinico e di indirizzarne la strategia terapeutica oltre che di svolgere un forte ruolo etico nel fornire risposte alle famiglie specie quando affette da patologie ereditarie.

Nel corso degli anni l'applicazione delle tecniche di genetica molecolare ha visto trascorrere tre diverse erenella scoperta dei geni che hanno contribuito allo sviluppo delle conoscenze nell'ambito della scienza medica: a) in un primo tempo, le patologie mendeliane hanno portato alla scoperta di nuovi geni tramite l'utilizzo di mappe genetiche complete e, benchè queste malattie siano estremamente rare, in alcuni casi hanno contribuito allo sviluppo di trattamenti efficaci in malattie comuni (per esempio le statine); b) in un secondo momento si è potuto studiare le "varianti comuni presenti in patologie comuni" con l'applicazione della genotipizzazione con SNP ad alta densità (genome-wide association studies, GWAS), con importanti informazioni riguardo a fattori di rischio modificabili e non (per esempio l'uso di avastin nella degenerazione maculare senile, la maggiore causa di cecità nella popolazione anziana); c) infine, con gli attuali sviluppi tecnologici in campo di sequenziamento e genotipizzazione, si è in grado di fondere la

ricerca di varianti rare in patologie sia rare che comuni tramite l'uso dell'*high-throughputsequencing* nella creazione di un metodo definitivo nella comprensione del ruolo della variabilità genetica nell'ambito sia della salute che della malattia.

Sono ora maturi i tempi per introdurrel'approcciodella Medicina Personalizzata nella pratica clinica quotidiana. Questa possibilitàè supportatadall'attualeprogressiva riduzione dei costi di indagini come il whole exome o whole genome sequencing, dalla diffusione di personale specilizzato nella interpretazione dei dati, dalla quantità di dati stessi disponibili come confronto nei database pubblici (tab.2).

Database di riferimento
dbSNP (versione 142) in NCBI
1000 Genomes (fase III, comprendente 2500 genomi)
ESP6500 (Exome Variant Server) in NHLBI (exome sequencing project)
ExAC Browser in Exome Aggregator Consortium

Tabella 2. Alcuni tra i principali database pubblici di riferimento per la genetica nell'Uomo.

Infatti mano a mano che più genomi vengono sequenziati, più incrementa l'affidabilità di porre una *diagnosidefinitiva* mediante la diagnostica molecolare.La prospettiva di applicare il concetto di Medicina Personalizzata è cresciuta drammaticamente con i recenti sviluppi di database biologici su larga scala (così come la sequenza del genoma umano), i più potenti metodi per caratterizzare il paziente (come la proteomica, la metabolomica, la genetica, e i saggi cellulari) e gli strumenti computazionali per analizzare dati in grandi quantità. Negli Stati Uniti è in corso il *Million Veteran Project* (MVP, <http://www.research.va.gov/MVP/>), che ha l'obiettivo di generare la sequenza dell'intero genoma di un milione di veterani e di collegare i dati genetici ai record clinici elettronici (electronic medical records,

EMR) in modo da generare *decision-support tools* per migliorare il trattamento e la sicurezza del trattamento di malattie comuni e non. Infine, in ospedali altamente specializzati, il sequenziamento rapido e diretto dell'intero genoma è già implementato nella pratica clinica per la diagnosi e il trattamento di malattie severe e complesse neonatali (<https://www.nichd.nih.gov/news/releases/Pages/090413-newborn-sequencing.aspx>)[5].

Risultati derivanti da questo approccio sperimentale sono già presenti nella diagnosi e nel trattamento del cancro, di malattie comuni (alcuni esempi in tab. 3), e di malattie congenite[6]. A partire da driver molecolari sono state prodotte terapie a target che hanno mostrato benefici a volte spettacolari. Esempi sono presenti in neonatologia dove i pattern di presentazione di malattie monogeniche sono inizialmente indifferenziabili e spesso un trattamento specifico è richiesto in tempi brevi. L'applicazione del whole-genome sequencing ad esempio è stato in grado in questa categoria di pazienti, di diversificare due differenti presentazioni di anomalie in BRAT-1, un neonato con rigidità letale neonatale e un altro con sindrome convulsiva multifocale; un bambino con eterotassia viscerale e malformazione cardiaca presentava mutazioni in BCL9L, mentre lesioni cutanee ulcerative in un altro neonato sono state spiegate da alterazioni a carico di GJB-2[7, 8]. Questo tipo di approccio, attualmente riferito soprattutto a patologie rare, verrà applicato in futuro anche a patologie a eziologia complessa, come il diabete.

Mutazioni rare con largo effetto guidano la terapia di patologie comuni e del cancro.	
<u>Target per malattie comuni identificati mediante la genetica mendeliana</u>	
- ROMK	Insufficienza cardiaca congestizia
- B-secretasi	Malattia di Alzheimer
- SOST	Picco massa ossea
- Orexina	Sonno
- Nav1.7	Dolore
- PCSK9	Colesterolo LDL
<u>Farmaci sviluppati a partire da mutazioni somatiche nel cancro</u>	
- Abl	Imatinib
- BRAF	Vemurafenib
- EGFR	Gefitinib
- ALK	Crizotinib
- IDH1	In via di sviluppo

Tabella 3. Applicazioni della Medicina Personalizzata attualmente in uso nella pratica clinica.

L'esempio dell' *Oncologia Personalizzata* offre un modello di questo nuovo approccio di facile comprensione per il Clinico. Il cancro è una patologia che spaventa per la sua letalità, i sintomi e per la tossicità dei farmaci spesso utilizzati per il suo trattamento. L'incidenza del cancro è in aumento con l'aumento dell'età della popolazione. La sua eziologia è già stata largamente dimostrata essere il risultato di un accumulo di danno genomico durante la vita di un individuo, tuttavia variabilità genetiche ereditabili contribuiscono profondamente al rischio di sviluppo[9]. Le nuove conoscenze sul cancro hanno iniziato a influenzare il calcolo del rischio, le categorie diagnostiche e le strategie terapeutiche. Infatti molte lesioni molecolari dei tumori sono comuni in più forme di questa malattia, ma con alcune caratteristiche proprie di alcuni tumori e alcune caratteristiche comuni a più tipologie[10]. Sulla base di questi concetti si sono sviluppate nuove strategie terapeutiche, è aumentato l'utilizzo di farmaci e anticorpi preparati tenendo conto di driver molecolari specifici[11]. L'utilizzo di terapie a target con risultati anche

spettacolari ha dimostrato come la caratterizzazione molecolare sia un forte predittore sulla possibilità di beneficio[12]. Queste caratteristiche fanno comprendere come la strada della Medicina Personalizzata sia il punto di partenza verso nuove terapie, nuovi trial clinici adulti e pediatrici e nuovi modelli di test maggiormente predittivi.

Ruolo della Medicina Personalizzata in Nefrologia

La Nefrologia è una disciplina strettamente intrecciata con la genetica umana e con la diagnostica molecolare. La malattia renale policistica autosomica dominante (ADPKD) rappresenta la prima causa di insufficienza renale terminale a ereditarietà mendeliana nell'età adulta con una incidenza stimata di 1 ogni 1000 nati vivi[13]. L'ADPKD fa parte delle patologie cistiche renali, come la nefronoftisi, la malattia cistica della midollare e altre sindromi quali Bardet-Biedl, tutte patologie note per essere associate a anomalie genetiche[14, 15]. I disturbi a carico dei canali ionici, causa di turbe dell'equilibrio acido base e di modificazione dei valori della pressione arteriosa[16], le alterazioni citoscheletriche del podocita cause riconosciute di glomerulosclerosi focale e segmentaria (FSGS)[17], le glomerulonefriti proteinuriche nella loro globalità[18], le mutazioni a carico della cascata del complemento che si manifestano con la sindrome emolitico uremica atipica (SEUA)[19] sono solo parte degli esempi di come la Medicina Personalizzata abbia un grande rilievo nell'ambito della Nefrologia e di come possa prevenire o ritardare lo sviluppo di un danno cronico e di disegnare terapie mirate a ogni singolo individuo evitando i numerosi effetti collaterali quali quelli associati alla somministrazione di agenti immunosoppressivi. Il recente inserimento

dell'eculizumab, un anticorpo monoclonale contro il componente C5 della cascata del complemento, nel trattamento della sindrome emolitico-uremica atipica (SEUA) è un esempio applicativo di come questo approccio abbia rivoluzionato il trattamento di una nefropatia con alta morbilità e mortalità[20]: la somministrazione di questo anticorpo monoclonale garantisce un trattamento a lungo termine nei pazienti affetti da SEUA, eliminando i potenziali gravi rischi associati al trattamento tradizionale con plasma exchange (quali le reazioni trasfusionali e la trasmissione di infezioni virali).

Le cause comuni di danno renale sono inoltre patologie con tratti complessi quali il diabete tipo 2 e l'ipertensione arteriosa essenziale anch'esse considerate come prossimi target di applicazione del programma di Medicina Personalizzata soprattutto nell'ambito della farmacogenomica[21]. Un'altra applicazione determinante è nel trapianto renale dove garantisce una migliore valutazione del donatore (specie nel caso del trapianto da vivente dove il donatore acquisisce i rischi associati allo stato di monorene), la possibilità di una terapia immunosoppressiva mirata, un più preciso calcolo del rischio di recidiva in caso di malattia primitiva con caratteristiche di ricorrenza. È chiaro a questo punto il ruolo che la diagnostica molecolare possa rivestire sulla scelta del trattamento in pazienti affetti da patologia renale[22, 23], come possa predire l'outcome e la possibile ricorrenza di malattia nel trapianto d'organo[24] così come aiutare il planning familiare nelle famiglie affette da insufficienza renale terminale[25, 26]. Oltre a un significato applicativo diagnostico, i risultati di questi studi hanno un ruolo nel migliorare le conoscenze sullo sviluppo del rene e delle vie urinarie e nella comprensione da questi di quale sia la causa che predisponga un individuo allo sviluppo di insufficienza renale terminale[27]. Questo è vero

soprattutto all'interno del vasto capitolo delle malformazioni congenite dei reni e delle vie urinarie (meglio conosciute sotto l'acronimo CAKUT, Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract):esse costituiscono piu' del 20% delle malformazioni congenite identificate alla nascita e sono la prima causa di insufficienza renale terminale in età pediatrica[28]. Le forme più severe sono rappresentate dall'agenesia e ipodisplasia renale, e dalle valvole dell'uretra posteriore, e ad oggi la causa sottostante questi difetti resta per lo più sconosciuta. La severità clinica, la presenza di questi tratti nel 23% delle sindromi malformative complesse secondarie a anomalie citogenetiche o a mutazioni genetiche note[29-31]e la ricorrenza familiare[32] hanno portato la comunità scientifica ad applicare studi di genetica rivelando come differenti fenotipi sottendano a una complessa variabilità nei modelli di ereditarietà e di sviluppo della malformazioni stesse. I CAKUT rappresentano una scommessa diagnostica e un modello per l'applicabilità della Medicina Personalizzata, utile a svelarne le cause, a comprendere lo sviluppo dei reni e delle vie urinarie, ad identificare pazienti a rischio di sviluppo di malattie (specielmente neuropsicologiche) che si manifestano più tardivamente nel corso della vita, e a individuare terapie mirate.

Anomalie Congenite dei Reni e delle Vie Urinarie: CAKUT

1. Definizione, epidemiologia, classificazione.

Come sopra accennato, le anomalie dei reni e delle vie urinarie sono uno spettro di malformazioni che va sotto l'acronimo CAKUT(dall'inglese Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tract).

Le malformazioni urogenitali rappresentano più del 20% dei difetti congeniti[33] e sono presenti in più dell'1% dei nati vivi[34-36]. L'aumento dell'utilizzo delle tecniche ultrasonografiche come screening ha portato a un aumento della diagnosi dei CAKUT in epoca prenatale, con l'idroureteronefrosi come anomalia congenita più frequente, essendo presente nel 2% di gravidanze non complicate[37, 38], seguita dall'agenesia renale unilaterale[39]. Il 17% delle idronefrosi a riscontro prenatale ha una risoluzione autonoma, più del 70% dei restanti casi sono di media gravità (4-9 mm), e circa il 20% sono moderate (10-15 mm), mentre solo il 2% sono severe (>15 mm)[40]. Tra i casi di idronefrosi di grado medio e moderato, circa il 90% si risolve o stabilizza entro i due anni di vita e il 10% progredisce verso uno stadio moderato-severo di ostruzione, mentre tra i casi di idronefrosi severa alla nascita il 25% migliora o si risolve, il 50% si stabilizza su un grado moderato di idronefrosi, il 25% mostra persistente severa dilatazione[40]. In sintesi la prevalenza di severa o persistente idronefrosi può essere stimata intorno ad almeno 2 ogni 1000 nati vivi. La risoluzione spontanea o il miglioramento in una frazione dei casi evidenzia la plasticità del sistema urinario nei primi anni di vita e suggerisce che la scoperta di meccanismi molecolari che sottostanno allo sviluppo dei CAKUT possano portare al riconoscimento di nuovi target terapeutici, almeno nel reflusso vescico-ureterale e nell'uropatia ostruttiva. L'assenza bilaterale di tessuto renale funzionante è un fenotipo letale per la conseguente ipoplasia polmonare (sequenza di Potter), mentre varia l'outcome dei pazienti che presentano una agenesia renale monolaterale. L'incidenza è di 1 ogni 2000 nati, mentre la displasia renale multicistica è stimata essere 1 ogni 4300 nati, di cui il 5% subisce un'involuzione completa prima della nascita[41]. L'andamento del monorene è stato dibattuto nel corso degli anni in molti lavori, perlopiù

inficiati dalla co-presenza di anomalie urinarie associate e da diversi altri bias, come la considerazione di condizione di monorene congenito insieme con le forme acquisite[42-44]. Un recente studio prospettico condotto su 400 bambini con criteri uniformi ha mostrato come nella condizione di monorene un bambino su tre mostra segni di danno renale entro i 10 anni di vita e come un segnodeterminante di rischio di progressione verso l'insufficienza renale sia la presenza simultanea di altre anomalie urinarie[27]. Lo studio ha mostrato come ogni anno circa il 4% dei bambini sviluppa un segno di danno renale non presente nei controlli precedenti: allo stato attuale non esistendo uno score di rischio certo, tutti i bambini portatori dello stato di monorene devono essere mantenuti in osservazione in un centro di secondo livello (ricerca di microalbuminuria, controllo della pressione arteriosa, controllo della funzionalità renale) e devono seguire uno stile di vita adeguato (come assumere una dieta ad apporto sodico controllato, evitare l'utilizzo di farmaci nefrotossici, evitare eventi traumatici come quelli associati alle attività sportive di contatto) per prevenire o rallentare il deterioramento della funzione renale.

Nel complesso le anomalie congenite dei reni e delle vie urinarie (CAKUT) sono la causa di insufficienza renale terminale nel 40-50% dei casi pediatrici e nel 7% dell'adulto[27, 45-48]. I bambini con insufficienza renale terminale hanno una mortalità complessiva di circa il 41%, che raggiunge il 93% quando l'insufficienza renale terminale è già presente alla nascita[49], mentre i bambini che sopravvivono hanno un rischio di morte 30 volte maggiore rispetto ai bambini della stessa età senza insufficienza renale terminale[50].

Le malformazioni renali vengono classificate seguendo l'anatomia (in forma isolata o coinvolgente più strutture come rene, uretere, vescica), possono essere presenti in forma isolata o combinata all'interno di una stessa famiglia, possono essere simmetriche o asimmetriche, monolaterali o bilaterali[51-54]. Queste malformazioni includono fenotipi a carico del parenchima renale, quali l'agenesia o l'ipodisplasia renale (RHD) e anomalie dell'uretere, come la stenosi del giunto pieloureterale (UPJO), duplicazione del sistema collettore (DCS), megauretere congenito e ostruzione della giunzione vescico-ureterale (UVJO) o ancora il reflusso vescico-ureterale (VUR)[51, 52, 55, 56]. Questa classificazione anatomica non dà informazioni sulla natura eziologica del difetto molecolare o genetico che ne sta alla base[57-60]. La grande variabilità fenotipica è giustificata dall'interazione tra i due diversi tessuti embriologici, il mesenchima metanefrico e la gemma ureterale, che durante l'embriogenesi concorrono alla formazione dei vari componenti dei reni e delle vie urinarie[61-65]: è sufficiente l'alterazione di un'unica via per determinare conseguenze in entrambi i compartimenti del sistema urinario.

2. Patogenesi.

Lo sviluppo dei reni e del sistema urinario è il risultato di una precisa e coordinata interazione spaziale e temporale tra due strutture, il mesenchima metanefrico (MM, originato dalla corda nefrogenica) e la gemma ureterale (UB, che origina dal dotto nefrico o di Wolffian). Durante il giorno 10.5 dell'embrione di topo e alla quinta settimana gestazionale nell'uomo, il MM induce la formazione del UB a partire dal dotto

nefrico e la conseguente reciproca interazione tra le due strutture porta il MM a crescere e differenziarsi e la UB penetrando nel MM determina lo sviluppo definitivo del parenchima renale e delle vie urinarie[63, 65]. Qualsiasi alterazione che sia genetica, ambientale o stocastica, che colpisca questi processi può determinare una malformazione a carico dei reni e delle vie urinarie. Molte diverse molecole espresse in uno o in entrambi i tessuti operano nell'orchestrare gli eventi di ramificazione del UB e di differenziazione in senso epiteliale del mesenchima. L'inattivazione di una qualsiasi di queste vie chiave nei roditori può risultare in diverse malformazioni dei reni e delle vie urinarie che rispecchiano i fenotipi umani di CAKUT (per la discussione delle vie di segnale coinvolte nello sviluppo dei reni e delle vie urinarie derivanti da studi su modelli animali si rimanda a recenti review)[52, 56, 62-74].

3. L'architettura genetica dei CAKUT nell'uomo

Per ogni tratto o patologia umana, la sua struttura genetica può essere ipotizzata e semplificata mediante un modello che tenga ragione delle caratteristiche cliniche ed epidemiologiche del fenotipo. I CAKUT rappresentano un gruppo molto eterogeneo di malattie diverse per severità, modalità di trasmissione e differente modo di associazione con malattie e malformazioni extra-renali. In modo esemplificativo possiamo riassumere le diverse forme di CAKUT in tre maggiori categorie: a) forme severe, con mortalità in utero o perinatale con storia familiare negativa per patologia renale; b) forme familiari di CAKUT; c) forme sporadiche comuni. Ognuna di queste categorie sottende una differente architettura

genetica e implica approcci differenti di diagnosi molecolare e di identificazione genetica e, verosimilmente, di approccio preventivo e terapeutico.

Nelle forme severe sporadiche di malattia le malformazioni congenite sono frequentemente associate ad alta morbilità e mortalità riducendo la possibilità che le mutazioni responsabili vengano trasmesse alla generazione successiva. Di conseguenza, i genitori dei soggetti affetti da queste condizioni hanno frequentemente (80-90%) un fenotipo normale suggerendo quindi un tipo di ereditarietà recessiva o la presenza di mutazione *de novo* (i.e. che occorre nella linea germinale, più spesso paterna, del genitore).

Questi dati seguono la teoria genetica classica secondo la quale la maggior parte delle varianti deleterie sono eliminate dalla spinta selettiva e quindi non raggiungono un'alta frequenza nella popolazione generale[75, 76]. In questo scenario le rare copy number variations (CNVs) costituiscono una fonte di variabilità genetica che sembra essere largamente coinvolta nello sviluppo della patologia soprattutto nei casi a presentazione sindromica. Infatti il diverso meccanismo che sottosta alla predisposizione genetica umana, alle mutazioni puntiformi e alle CNVs rende le varianti strutturali tre volte più frequenti delle mutazioni puntiformi[77].

Nelle forme famigliari di CAKUT, che rappresentano circa il 20-30% dei casi, la malattia segrega in forma dominante con penetranza incompleta nella maggior parte dei pedigree[32, 56, 78]. In questo caso il modello genetico che concorda maggiormente con l'epidemiologia è attribuibile a mutazioni che danno loss-of function o ad alleli ipomorfici che producano malformazioni moderate senza un impatto significativo sulla fitness riproduttiva. In questo modo, mutazioni che predispongono all'insufficienza renale in età

adulta, manifestano il loro effetto deleterio anni o decenni successive allo sviluppo sessuale dei portatori, permettendo pertanto che vengano trasmesse alle generazioni successive.

Inoltre due forme di CAKUT mostrano una inusuale alta prevalenza nella popolazione generale e frequentemente una ereditarietà complessa nonmendeliana: il reflusso vescico-ureterale (VUR) e il doppio sistema collettore (DCS). Infatti il VUR isolato è presente nel 1% dei bambini normali alla nascita[79, 80]e, nonostante la forte aggregazione familiare e il numero di ricorrenza nei fratelli, nessun gene che segua le classiche leggi mendeliane è stato ad oggi identificato[78, 80, 81]. DCS è uno dei più comuni difetti del tratto urinario con prevalenza di almeno 0.8%[82], valore che tuttavia risulterebbe essere una sottostima essendo gran parte delle DCS spesso asintomatiche[83]. In tale scenario potrebbero essere proprio le varianti comuni con effetto lieve o moderato, oppure una complessa interazione tra le varianti funzionali in geni rilevanti per lo sviluppo a spiegare l'ereditarietà di questi tratti.

4. Il ruolo delle copy number variations nei CAKUT.

Le copy number variations (CNVs)-generalmente definite come qualsiasi aumento o perdita di DNA nucleare germinale (i.e. presenti nel corredo genetico di tutte le cellule di un dato individuo) di una taglia compresa tra 1 kilobase (Kb) fino a diverse megabasi (Mb) che non sono rilevabili dalle tecniche di citogenetica convenzionale-sono una fonte di variabilità genetica che si è iniziato ad approfondire negli ultimi 5-10 anni[84-87]. Le CNV spesso interessano più di un gene e sono state dimostrate alla base di diversi fenotipi umani, comprese malattie del sistema nervoso centrale (ritardo mentale, autismo,

schizofrenia, epilessia), difetti cardiaci, patologie polmonari, malformazioni del cranio e del massiccio facciale, e altre[88-95].

LeCNVs possono essere ricorrenti, quando vengono generate tramite un meccanismo di ricombinazione omologa non allelica (non-allelic homologous recombination, NAHR) guidata da elementi altamente ripetitivi (come ad esempio le segmental duplications) presenti in contiguità alle CNVs stesse, oppure possono essere non-ricorrenti, ossia in cui i punti di rottura sono diversi in ogni singolo individuo, quando guidate da altri tipi di meccanismi come il legame a terminazioni non omologhe (non-homologous end-joining, NHEJ) o alfork stalling template and switching [96, 97](fig.1).

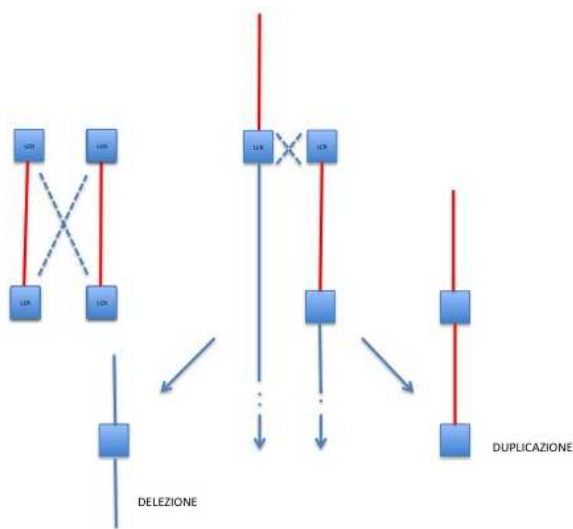


Figura 1. Principale meccanismo di genesi di CNV: ricombinazione allelica non omologa (LCR=low-copy repeats).

Ci sono numerose evidenze che uno squilibrio genomico giochi un ruolo principale nella predisposizione al CAKUT. Per primo il CAKUT è presente nel 23% delle sindromi malformative a riscontro prenatale causate da disordini cromosomici[33]e ci sono molti difetti citogenetici che si associano ai CAKUT(10q26, 6p21

e19q13)[98-100]. Inoltre esistono specifici riarrangiamenti cromosomici diagnostici per difetti congeniti sindromici che si associano con alta prevalenza a malformazioni dei reni e delle vie urinarie, come le delezioni a carico del 22q11.2 causative per la sindrome di DiGeorge o Velocardiofaciale[101, 102] o la delezione interstiziale ricorrente di ~1.5 Mb sul cromosoma 17q12 recentemente identificata in pazienti con malattia renale (specie in reni con displasia multicistica) e diabete[30] che coinvolge il gene *TCF2*, codificante per l'*hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF1B)*, un gene il cui ruolo è già noto nel diabete tipo 5 a insorgenza giovanile (MODY5) e nelle malformazioni renali[31, 103, 104]. Questa sindrome da microdelezione è la prima sindrome ricorrente specifica che coinvolge malattie dello sviluppo dei reni e delle vie urinarie. Più recentemente uno studio comprendente 30 bambini con forme sindromiche di CAKUT ha identificato CNV *de novo* in tre (10%) dei pazienti[105], rafforzando l'osservazione che lo sviluppo dei reni e delle vie urinarie è sensibile al dosaggio genico. Inoltre tutti gli studi condotti fino ad ora comprendevano coorti di pazienti di piccola numerosità con malformazioni multiple e complesse rendendo non chiaro il ruolo delle rare CNV nella predisposizione verso le più comuni forme di CAKUT.

Il nostro gruppo ha condotto dapprima un largo studio caso-controllo che ha analizzato il contributo patogenetico delle rare CNV nei CAKUT confrontando 522 bambini e giovani adulti affetti da ipodisplasia renale (RHD) e paragonati a circa 14,000 controlli nella popolazione generale dimostrando che un disordine genomico è la causa della RHD in quasi il 20% dei casi[106] fornendo una prima omogenea e numerosa coorte utile a dimostrare il ruolo delle CNV in queste malattie. Un secondo lavoro ha individuato nelle CNV la causa primitiva di malattia renale cronica nel 7% di 221 bambini con CAKUT[107], mentre un'ulteriore

coorte di 80 bambini con monorene funzionale ha rivelato come in oltre il 13% dei casi ci sia alla base un disordine secondario a squilibrio genomico[108].

5. Forme di CAKUT monogeniche causate da mutazioni puntiformi.

L'evidenza per un ruolo importante nelle mutazioni puntiformi rare nella patogenesi dei CAKUT deriva principalmente dalle rare ma ben note forme sindromiche di malformazioni dei reni e delle vie urinarie che sono attribuibili a mutazioni in *PAX2*, *TCF2*, *SALL1*, *WT1*, *SIX1*, *EYA1* e altri[56]. Queste malattie sono frequentemente diagnosticate tramite altri più specifici segni extra-renali, come il coloboma oculare, fistole auricolari, malformazioni ano-rettali. L'aggregazione familiare nei CAKUT è ben riconosciuta e risponde al 10-20% dei casi, con differenti modelli di trasmissione[32, 56, 81], il più frequente dei quali è la forma autosomica dominante con penetranza incompleta, indicando che mutazioni puntiformi eterozigoti non determinanti effetti maggiori sulla fitness riproduttiva costituiscono la fonte principale di predisposizione genetica all'interno di queste famiglie. Proprio questa estrema variabilità genetica associata a una gamma enorme di fenotipi, a diagnosi a volte non certe, e a pedigree di piccolo taglia, hanno reso ardua l'identificazione di geni coinvolti nelle forme non sindromiche di CAKUT.

La prima chiara evidenza che mutazioni in geni generalmente responsabili per forme sindromiche di CAKUT possano essere identificate in bambini con malformazioni isolate dei reni e delle vie urinarie è stata data da Weber et al., i quali hanno esaminato i geni *TCF2*, *PAX2*, *EYA1*, *SIX1*, e *SALL1* per mutazioni in pazienti con ipodisplasia renale[59]. Mentre mutazioni nella maggior parte dei geni erano rare, varianti

deleterie in eterozigosi erano presenti con alta frequenza nei geni *TCF2* e *PAX2* suggerendo un importante ruolo di questi due geni nella predisposizione a malformazioni isolate a carico dei reni e delle vie urinarie nell'uomo. Da qui diversi gruppi hanno riportato mutazioni isolate a carico dei geni *TCF2* e *PAX2* come più frequenti cause di CAKUT, anche se nel complesso la porzione di anomalie attribuibili a questi geni non supera il 10%[31, 59, 109-112]. Infatti mentre le mutazioni a carico di *TCF2* sono frequentemente riscontrate in reni con displasia multicistica o ipodisplastici, sono rare nelle malformazioni del tratto urinario[103, 112]. Un altro gene che appare essere coinvolto in una discreta percentuale di pazienti affetti da CAKUT è stato recentemente identificato dal nostro gruppo[113]. Abbiamo studiato una famiglia reclutata presso il centro di Nefrologia Pediatrica dell'Ospedale Gaslini di Genova, con differenti anomalie dei reni e delle vie urinarie che segregava in modo autosomico dominante con penetranza incompleta in 7 diversi individui. Tramite l'uso di positional cloning combinati al whole-exome sequencing abbiamo identificato in questa famiglia una mutazione a carico del sito di splicing 5-prime dopo l'esone 2 in *DSTYK*, codificante per una chinasi serina/treonina specifica che non era mai stata individuata come implicata nel processo di sviluppo dei reni e delle vie urinarie nei mammiferi. Questa mutazione risulta nell'attivazione di uno splice site criptico 27 basi prima del sito canonico portando a una delezione in-frame di 9 aminoacidi altamente conservati. Il risequenziamento di ulteriori 311 pazienti con CAKUT ha identificato 5 nuove mutazioni in 7 pazienti, comprendenti una mutazione di stop prematuro all'ottavo aminoacido suggerendo che un meccanismo di tipo loss-of-function sia alla base del meccanismo che associa i CAKUT a *DSTYK*. L'inattivazione dell'ortologo di *DSTYK* nello zebrafish risulta nella malformazione della cloaca (che

rappresenta l'equivalente delle vie urinarie inferiori nei mammiferi) e in fenotipi che ricapitolano l'inattivazione completa del segnale del fattore di crescita fibroblastica (FGF)[114-116]. In maniera concorde a questa osservazione, *DSTYK* co-localizza con il recettore dell'FGF tipo 1 e 2 nel mesenchima metanefrico e nella gemma ureterale del topo, e lo studio su linee cellulari embrionali umane ha mostrato che il silenziamento dell'RNA del *DSTYK* risulta in una soppressione della fosforilazione di ERK dipendente da FGF. Nell'insieme tutti questi dati identificano *DSTYK* come un nuovo regolatore positivo del segnale FGF durante lo sviluppo delle sistema urinario. Mutazioni in *DSTYK* sono state identificate nel 2.3% dei pazienti affetti da CAKUT, soprattutto nei soggetti con uropatia ostruttiva (UPJO, megauretere, idronefrosi congenita).

Mutazioni recessive sono raramente cause del CAKUT e complessivamente non raggiungono il 2% dei casi. Nel 2005, mutazioni recessive a carico di geni codificanti per mediatori del sistema renina-angiotensina (RAS) sono state trovate in soggetti con forme severe di disgenesia dei tubuli renali, oligoidramios e mortalità perinatale secondaria a ipoplasia polmonare[117]. Le anomalie dello sviluppo renale sono precise fenocopie dell'effetto degli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina nei feti esposti a questi farmaci, confermando l'importante ruolo del RAS nello sviluppo normale dei reni. Recentemente, una mutazione frame-shift omozigote nel recettore muscarinico per l'acetilcolina M3 è stata ritrovata segregare in una famiglia con individui affetti da malformazioni della vescica con associati VUR, idronefrosi, e un fenotipo addominale del genere Prune-Belly-like[118]. I pazienti sono stati inoltre

scoperti avere una asimmetrica costrizione pupillare agli stimoli luminosi e presentare secchezza delle mucose. Questo fenotipo riporta a quello nei topi con inattivazione dell'ortologo *chrm3*[119]. In modo simile, utilizzando la mappatura per omozigotità a whole exome sequencing in una famiglia consanguinea con diversi feti affetti da agenesia renale bilaterale è stata identificata una mutazione frame-shift in omozigosi nel gene *FGF20*[120] sottolineando il ruolo determinante del pathway dell'FGF nelle malformazioni renali. Per finire, in un recente studio su una larga coorte di pazienti affetti da CAKUT e da CAKUT associati a sindrome di VACTERL mutazioni in omozigosi o eterozigosi composte in *TRAP1* sono state identificate nello 0.5% dei pazienti[121]. Il ruolo di TRAP1 nello sviluppo dei reni e delle vie urinarie dei mammiferi resta ad ora sconosciuto.

Riassumendo le forme monogeniche non sindromiche di CAKUT causate da mutazioni puntiformi a carico di 10 geni identificati sinora sono riconosciute in meno del 15% dei casi, dimostrando l'estrema variabilità di questi tratti. Mentre le mutazioni dominanti rivestono una più larga frazione di questi pazienti rispetto a quelle recessive, la relazione causale per mutazioni eterozigoti è più difficile da dimostrare, a differenza delle rare forme recessive.

6. Ereditarietà complessa.

L'estrema eterogeneità genetica dei CAKUT, l'espressione variabile del fenotipo, la penetranza incompleta e gli effetti pleiotropici associati alle anomalie di sviluppo extra-renale, determinano nell'insieme una

scarsa correlazione tra il genotipo di un singolo locus e il fenotipo dell'individuo. E' perciò verosimile che un modello di ereditarietà complesso sia coinvolto nel determinare la malattia e nell'espressione del fenotipo. Descrivere gli effetti epistatici e oligogenici dei modelli di ereditarietà nell'uomo è estremamente difficile. Tra le malattie renali probabilmente il miglior esempio è la sindrome di Bardet-Bield (BBS), patologia autosomica recessiva geneticamente eterogenea caratterizzata da alta variabilità tra le famiglie e anche tra gli individui di una stessa famiglia[122, 123]. Nella BBS possono essere coinvolti diversi organi e apparati con formazione di malformazioni cistiche renali, obesità, polidattilia, degenerazione retinica, e altre[124]. Nelle forme di BBS cosiddette oligogeniche, diversi geni che quando mutati causano la malattia, possono agire in aggregato (pazienti con 3, 4 o più mutazioni) come modificatori per loci genetici in *cis* o *trans* per guidare il fenotipo principale o secondario[123, 125-127]. Il grado di variabilità può infatti essere parzialmente spiegato dall'interazione di tre o più loci della BBS in alcuni pazienti. In uno studio il locus *MGC1203* è stato identificato come codificante per una proteina in grado di interagire fisicamente con altre 8 note proteine coinvolte in BBS. *MGC1203* è localizzata nel centromero delle strutture ciliari presenti nel corpo basale della retina, del pericardio, e nell'epitelio limbico. Gli autori hanno trovato un arricchimento significativo nella variante eterozigote C430T in pazienti con BBS. I pazienti portatori di mutazioni a carico del gene per BBS e con la variante C403T erano colpiti da una forma più severa di malattia se confrontati con fratelli senza questa variante (come ad esempio l'età di insorgenza della retinite pigmentosa)[123]. L'interazione positiva tra i geni BBS e la variante C430T di *MGC1203* sulla determinazione del fenotipo è stata dimostrata sul modello dello zebrafish.

Un esempio di interazione genetica rilevante per i CAKUT è stata recentemente riportata per mutazioni a carico di geni correlate a *HNF1B* e a PKD[128]. In questo report i pazienti affetti da severe forme di malattie renali cistiche con mortalità fetale o perinatale causate dalla precoce insorgenza delle lesioni cistiche, sono stati ritrovati essere carrier di mutazioni germinali in più di uno dei geni PKD e *HNF1B* dando una spiegazione a questa enorme e drammatica variabilità fenotipica intrafamiliare.

Un altro esempio di ereditarietà complessa lo si può trovare negli studi di CNV. Infatti, un recente lavoro sul ritardo di sviluppo psicomotorio ed il nostro studio sulle anomalie renali congenite mostrano che circa il 10% dei pazienti per i quali la malattia è causata da una variante strutturale nota (i.e. una disordine sindromico), è affetto da una seconda alterazione genomica strutturale[106, 129]. Questi pazienti, caratterizzati da un alto carico mutazionale, erano infatti più frequentemente affetti da fenotipi più gravi da un coinvolgimento patologico complesso rispetto a pazienti con lesione genetica singola.

7. Implicazioni cliniche dei test genetici.

I test genetici offrono l'unica opportunità di accertarsi della diagnosi molecolare per migliorare il counseling genetico e la pianificazione delle nascite nei genitori, e per individuare traiettorie terapeutiche per patologie dello sviluppo che tendono a manifestarsi in età più avanzata. Questo è particolarmente importante nelle malformazioni congenite dei reni e delle vie urinarie dove la routine utilizza l'ultrasonografia prenatale per diagnosticare molti dei casi di CAKUT, e dove quindi preventivamente si può identificare alla nascita un sottostante problema genetico e costruire così un programma di cure mirato

che vada a migliorare enormemente le possibili cure offerte al paziente fin dalla nascita. L'identificazione di mutazioni genetiche in pazienti con ipodisplasia renale isolata che risultino implicate nella patogenesi di sindromi complesse può portare alla rivalutazione clinica multidisciplinare del paziente per l'identificazione di difetti extra-renali potenzialmente prevenibili e trattabili, così come il diabete secondario a mutazione in *HNF1B* o il coloboma oculare associato a mutazioni a carico di *PAX2*[59]. In maniera ancora più significativa, i disordini associati alle copy number variations si riscontrano in quasi il 20% dei bambini portatori di anomalie dei reni e delle vie urinarie e sono stati trovati essere associati ad un alto rischio di anomalie a carico del sistema nervoso centrale, come la schizofrenia, l'autismo, il ritardo di sviluppo neuro-cognitivo, l'epilessia e altri[106]. Queste diagnosi se fatte nell'ambito di una famiglia possono potenzialmente influenzare il planning delle nascite di una coppia di genitori e possono guidare verso strategie di trattamento preventivo. Ad esempio la delezione del cromosoma 17q12, responsabile della sindrome con diabete e cisti renali (RCAD, che coinvolge il gene *TCF2*), è stata riscontrata conferire un rischio 14 volte superiore per lo sviluppo di autismo e schizofrenia[130]. L'utilizzo di una diagnostica molecolare precoce può infatti portare ad una attenta valutazione neuropsichiatrica per il rilievo di segni di autismo e può migliorarne l'outcome. E' infatti chiaramente dimostrato come un precoce e intenso intervento comportamentale possa significativamente migliorare lo sviluppo di questi bambini[131].

8. Conclusioni

In conclusione le anomalie congenite dei reni e delle vie urinarie sono condizioni relativamente frequenti con un alto impatto sulla sopravvivenza complessiva dei reni dei soggetti affetti. L'architettura genetica di queste condizioni implica sia mutazioni puntiformi che varianti strutturali con un ruolo potenzialmente significativo dell'interazione tra molti loci per spiegare l'alta variabilità interindividuale dei fenotipi. La frequente associazione delle lesioni genetiche causali per CAKUT con un alto rischio di sviluppo di patologie dello sviluppo neurocognitivo che si presentano in età più avanzata e il fatto che le malformazioni dei reni e delle vie urinarie possano essere riscontrata già in epoca prenatale rendono queste malattie sentinelle per potenziali altre malattie come quelle a carico del sistema nervoso centrale.

TESI SPERIMENTALE

Struttura della presente tesi sperimentale

Il materiale studiato nella presente tesi di dottorato si sviluppa a partire da un vasto programma di ricerca sulle malformazioni dei reni e delle vie urinarie svolto in collaborazione con il Dipartimento di Nefrologia della Columbia University di New York, USA. Il lavoro è sfociato negli ultimi anni in numerose pubblicazioni [25, 39, 47, 56, 78, 106, 132] e nell'ottenimento di numerosi finanziamenti pubblici che attualmente si assestano su circa 10 milioni di dollari disponibili per proseguire nella produzione scientifica in ambito CAKUT.

Il lavoro qui presentato è composto da due blocchi di ricerca, una prima parte di scienze di base e una seconda traslazionale che applica sul paziente i risultati prodotti in laboratorio. Nell'applicazione clinica uno spazio della tesi è stato ritagliato per descrivere l'introduzione in clinica della uro-risonanza funzionale.

Il lavoro di ricerca di base pone le sue radici in un primo studio pubblicato dal nostro gruppo che esplora il ruolo delle CNV nel CAKUT in una coorte di 522 pazienti con grave fenotipo renale (agenesia renale e ipodisplasia renale), dove per la prima volta veniva mostrato come le CNVs fossero una grossa fonte di variabilità genetica nelle anomalie malformative congenite a carico dei reni e delle vie urinarie, e veniva confermato come questi fenotipi siano strettamente associati alla simultanea anomalia di altri organi quali il sistema nervoso centrale e come possano fungere da sentinella per patologie che si manifestano solo più tardi nel corso della vita (come ad esempio schizofrenia, autismo, ritardo mentale o epilessia). I risultati di

questo primo studio sono stati validati su due ulteriori coorti, una costituita da 221 soggetti affetti da CAKUT e insufficienza renale cronica[107], la seconda da 80 casi di bambini portatori di monorene funzionale[108] descritta nella presente tesi. Le CNV risultate diagnostiche sono state rispettivamente del 7.7% e del 13.8% dei casi e i loci coinvolti hanno di nuovo mostrato la predisposizione per malattie extra-renali specie del neurosviluppo e cardiovascolari. In parallelo, sono stati prodotti nuovi risultati mediante gli approcci *in silico* e *in vivo* che identificano nuovi geni predisponenti per il CAKUT in casi sindromici e in casi isolati. Anche questi risultati saranno descritti nei prossimi paragrafi.

La coorte studiata nella presente tesi di dottorato è composta da più di 2000 pazienti affetti da CAKUT. E' costituita da soggetti con diversi fenotipi a cavallo dell'intero spettro del CAKUT, dall'ipodisplasia renale (RHD), all'uropatia ostruttiva (OU), reflusso vescicoureterale (VUR), doppi distretti escretori (DCS), e malformazioni delle vie urinarie inferiori. Il concetto di dosaggio genico è stato introdotto negli studi precedenti pubblicati dal nostro gruppo [106-108] dove era stato mostrato che, rispetto ai casi controllo, il DNA di pazienti affetti da ipodisplasia renale fossero soggetti a rare duplicazioni o delezioni geniche di dimensioni maggiori (ad esempio il 29.2% delle delezioni geniche deleterie erano di lunghezza maggiore di 500 kb nei casi, mentre solo il 7.3% erano maggiori di 500 kb nei controlli).

Su questa coorte caratterizzata geneticamente è stato costruito un nuovo protocollo di medicina personalizzata che verrà applicato nei prossimi anni. Visto l'alto impatto dei risultati in termini di salute pubblica abbiamo poi costruito un rete di nefrologi e urologi adulti e pediatrici che possano espandere il protocollo su tutto il territorio nazionale e rafforzare il reclutamento dei casi italiani per la prosecuzione

degli studi di genetica. Al fine di caratterizzare in dettaglio l'anatomia dei pazienti studiati abbiamo applicato l'uro-risonanza in una vasta coorte di soggetti. Una parte di questi casi affetta da uropatia ostruttiva è stata sottoposta a una nuova tecnica definita uro-risonanza funzionale (uro-RMf). Non tutti i dati prodotti dalla collaborazione con la Radiologia riescono ad essere inseriti nella presente tesi di dottorato. Qui mostreremo il lavoro applicato in questo sottogruppo anatomico dove viene rivelato come questa nuova tecnica di imaging - uro-RMf - sia sovrapponibile alla scintigrafia renale attualmente considerata gold standard nello studio del grading ostruttivo e nel calcolo della split renal function (SRF). Ci è sembrato opportuno riportare il lavoro svolto in questo piccolo sottogruppo di pazienti in quanto migliora la fenotipizzazione e elimina l'esposizione al mezzo di contrasto in soggetti maggiormente a rischio di esposizione radiologica anche a terapie immunosoppressive nel corso della vita in quanto predisposti a insufficienza renale cronica e terminale.

Studi di genetica sul CAKUT

Le analisi molecolari mirano all'identificazione di nuove anomalie genetiche responsabili della genesi di malformazioni congenite a carico dei reni e delle vie urinarie. L'approccio genetico è stato effettuato mediante lo studio di un'intera coorte di oltre 2000 casi affetti da CAKUT nei suoi vari spettri: anomalie del parenchima renale (agenesia renale e ipodisplasia), uropatia ostruttiva, (stenosi del giunto pielo-ureterale, megauretere, idronefrosi congenita), reflusso vescico-ureterale, valvole dell'uretra posteriore, doppio distretto collettore, rene ectopico e a ferro di cavallo, e anomalie delle basse vie urinarie (ipo/epispadia).

Successivamente sono stati applicati approcci multidisciplinari per identificare i driver sottostanti le CNVs rare e patogenetiche per identificare nuovi geni responsabili dello sviluppo di CAKUT. Questi studi hanno coinvolto l'uso di *in silico* prioritization, large-scale resequencing studies, e modelli funzionali nei vertebrati.

1) Analisi di CNV in oltre 2000 pazienti per definire l'architettura genetica del CAKUT

Materiali e Metodi. Lo studio genetico nel CAKUT è stato applicato su di una coorte internazionale di casi affetti da CAKUT, dove il contributo nel corso del dottorato di ricerca è stato di 600 casi (più del 25% dell'intera coorte). Tutti i soggetti arruolati hanno firmato un consenso informato approvato dai Comitati Etici regionali specifici per lo studio. Globalmente la coorte è costituita per il 90% da soggetti europei o americani di origine europea, i restanti sono afro-americani (circa 8%) e <2% originano da differenti razze/etnie. I casi di CAKUT sono stati considerati dapprima nell'insieme poi secondo le seguenti categorie fenotipiche: anomalie del parenchima renale (agenesia renale e ipodisplasia), uropatia ostruttiva (stenosi del giunto pielo-ureterale, megauretere, idronefrosi congenita), reflusso vescico-ureterale, valvole dell'uretra posteriore, doppio distretto collettore, rene ectopico e a ferro di cavallo, e anomalie delle basse vie urinarie (ipo/epispadia). Tutti i casi sono stati genotipizzati mediante high-density Illumina o Affymetrix DNA SNP arrays come effettuato nei lavori precedenti del nostro gruppo[106, 133]. I dati grezzi sono stati analizzati mediante GenomeStudio v2011 (Illumina). PennCNV è stato usato per determinare le calls di copy number variant (CNV)[134]. Le CNVs sono state mappate sullo human reference genome hg19 e

annotate con UCSC RefGene e RefExon usando il programma CNVision. Solo le CNVs con confidence scores ≥ 30 sono state considerate nell'analisi sulla base delle validazioni dei nostri studi precedenti. Allo stesso modo degli studi precedenti due CNVs sono state considerate come identiche se avevano lo stesso copy number value e un overlap reciproco di $\geq 70\%$, altrimenti sono state considerate come diverse.

Risultati. L'analisi del carico mutazionale (burden) per le CNVs rare e di grossa taglia ha mostrato un eccesso significativo nel CAKUT rispetto ai controlli ($p < 2.2 \times 10^{-16}$; non riportato nella presente tesi di dottorato). Questo eccesso di burden è stato ritrovato soprattutto nei casi affetti da ipodisplasia renale (RHD) e seguito dai casi affetti da valvole dell'uretra posteriore (PUV).

Globalmente il 4% dei pazienti con CAKUT è risultato portatore di CNV diagnostiche per sindromi da microdelezioni/microduplicazioni rispetto allo 0.5% dei controlli ($p < 2.2 \times 10^{-16}$; OR 8). Tra le diverse categorie di CAKUT, l'ipodisplasia renale (RHD), le valvole dell'uretra posteriore (PUV) e l'uropatia ostruttiva (OU) hanno dato il contributo maggiore nella patogenesi nei disturbi genomici (4% - 8%); il doppio sistema collettore (DCS) e il reflusso vescico ureterale (VUR) hanno mostrato avere un contributo moderato ma statisticamente significativo (2%-3%); mentre il gruppo rene ectopico - rene a ferro di cavallo (HK-HK) e le malformazioni del basso tratto urinario (LUTM, principalmente ipo/epispadia) hanno il più basso coinvolgimento in CNV (Fig.2).

I loci di CNV ritrovati (cromosomi 1q21.1, 16p11.2, 17q12, e 22q11.2) sono responsabili della maggior parte dei casi ($p\text{-val} < 2 \times 10^{-16}$; OR 45). Il confronto tra i nostri risultati e la proporzione di questi loci per CNV

in grossi studi[135, 136] di ritardo del neurosviluppo e nella Tetralogia di Fallot (ToF) mostrano molte similitudini e differenze tra questi differenti fenotipi (Fig. 3). Di grande importanza è che le diverse categorie di CAKUT hanno mostrato una diversa prevalenza di disordini genetici noti

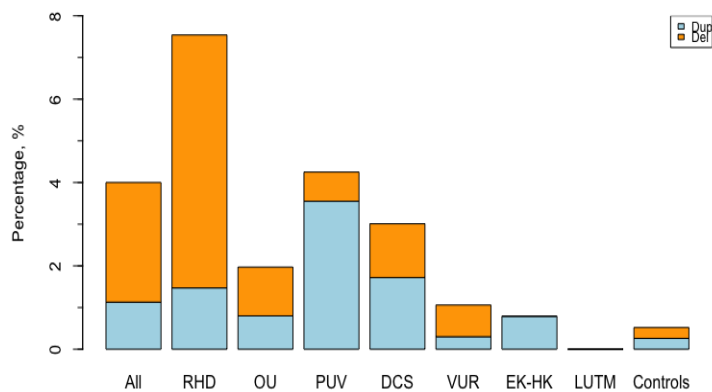


Fig. 2 L'analisi per CNV sulla coorte di 2,080 casi di CAKUT mostra che diverse categorie malformative sottendono una architettura genetica differente

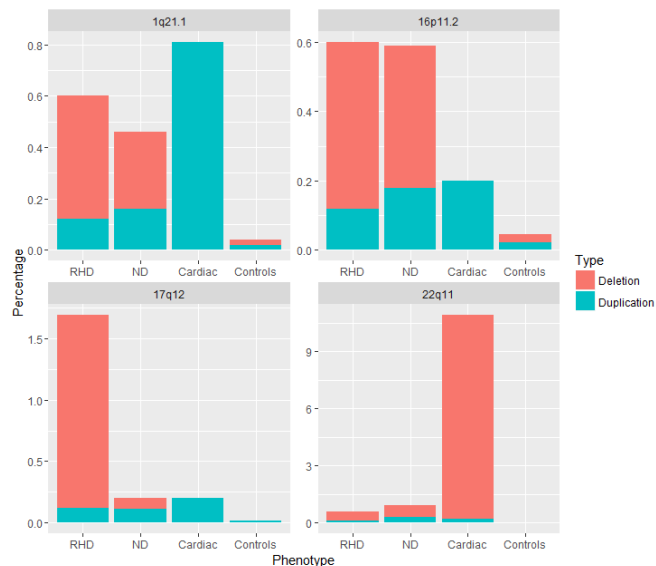


Fig.3 Prevalenza delle quattro sindromi da microdelezione/microduplicazione più frequentemente riscontrate nel CAKUT confrontate con quelle note per il neurosviluppo, le malformazioni cardiache e con casi controllo.

Mentre il CAKUT e le patologie del neurosviluppo mostrano circa la stessa prevalenza di delezioni e duplicazioni in 1q21, 16p11.2, e 22q11.2, pazienti con malformazioni cardiache sono risultati essere carrier di sole duplicazioni in 1q21, 16p11.2, e 17q12. Il locus 17q12 (RCAD) sembra più specifico per malattie dello sviluppo renale (RHD) e meno coinvolto nel neurosviluppo e nel ToF. Pazienti con ToF appaiono essere soprattutto portatori di CNVS al cromosoma 22q11.2. Complessivamente qui riportiamo un grosso studio genomico sullo sviluppo dei reni e delle vie urinarie che prova il ruolo delle CNV nella patogenesi di questo spettro di malattie. I nostri studi sulle CNVs hanno dimostrato che molti loci sono critici per lo sviluppo del CAKUT e che alcuni geni contenuti in questi loci potrebbero agire come principali responsabili genetici nello sviluppo dei reni e delle vie urinarie. Per questo abbiamo utilizzato approcci sperimentali e in silico per sezionare le CNVs così da identificare nuovi geni suscettibili per la determinazione del CAKUT. I risultati hanno inoltre mostrato un'enorme eterogeneità genetica e il rischio di sviluppo di patologie coinvolgenti altri organi e apparati anche a sviluppo più tardivo nel corso della vita. Nella maggior parte dei casi in cui sono state identificate lesioni genetiche i disordini riscontrati non erano stati identificati al momento del reclutamento, a dimostrazione di come queste malattie abbiano spesso un fenotipo sindromico che decorre in maniera subclinica e con manifestazioni che appaiono spesso nel corso della vita e di come le modalità diagnostiche attualmente adottate siano sub-ottimali. Infatti le lesioni risultate predisponenti per il CAKUT sono già note per essere predisponenti per altre patologie quali quelle del neurosviluppo (autismo, schizofrenia, epilessia, ritardo mentale) e alterazioni endocrine/metaboliche come il diabete

mellito, l'iperuricemia, che tendono a manifestarsi solo più tardivamente nel corso della vita e altri difetti anatomici congeniti come dismorfismi del massiccio facciale o cardiaci. Questo fa del rene un organo sentinella e pone la necessità di sviluppare nuovi protocolli clinici che vadano a migliorare l'outcome non solo renale ma anche globale del paziente.

B) Studi *in silico* e di espressione per identificare nuovi geni candidati nel CAKUT

Materiali e Metodi. L'analisi di CNV in 80 bambini dalla coorte del KIMONO-study analysis[27] ha identificato 118 CNVs larghe (definite come CNV di taglia >100 kb; 1.48 CNVs per caso). La larghezza media delle CNV era di 174,888 bp. La maggior parte di queste CNVs di grossa taglia erano duplicazioni (58% versus 42%). L'annotation di larghe (≥ 100 Kb) rare ($< 1:1,000$) CNVs ha identificato 5/80 individuals (6%) che portavano 6 genomic imbalances con significativo overlap con malattie genetiche note. Tra tali lesioni riscontrate un soggetto con displasia renale multicistica (MCKD), VUR, cleft palate e disturbo dell'attenzione era portatore di una sindrome da microdelezione in 3q29 di 1.61 Mb, che distruggeva diversi geni e che risultava assente in 23,362 controlli, mentre un altro soggetto con MCKD e ureterocele carrier di una duplicazione di 570 kb al *PKD1* locus sul cromosoma 16p13.3, che -di nuovo- era assente nei controlli. Una volta ristretta la ricerca per CNVs patogene a eventi molto rari (frequenza $< 1:4,000$) siamo stati in grado di identificare 7 nuove CNVs indipendenti e rare in 7/80 casi (9%), comprendenti tre delezioni per un singolo gene sui cromosomi 10q21.1, 13q21.32, e Xq12. La delezione in Xq12 è stata trovata in un soggetto maschio con VUR congenito, indicando completa loss-of-function. Così come nei nostri precedenti

lavori[106, 107]2/80 individui (2.5%) sono stati trovati avere più di una CNV rara e di grossa taglia. In totale, abbiamo identificato 13 note o nuove malattie genetiche in 11 pazienti (14%). Per identificare i driver molecolari dei fenotipi nelle CNV, abbiamo costruito un approccio sistematico *in silico* usando risorse bioinformatiche (Fig.4). Le 13 CNVs larghe e rare includevano 115 geni. Tutti i geni compresi nelle CNVs che corrispondevano a zone coinvolte in malattie genetiche note sono stati conservati (n=119). Nuove malattie genetiche sono state annotate rispetto ai database di ISCA e DECIPHER per selezionare CNVs che sovrapponevano con varianti di significato likely pathogenic. Dopo alignment abbiamo scartato le delezioni sul cromosoma 1q44 e le duplicazioni sul cromosoma 3p26, e le CNVs con overlap su varianti benigne. In totale 137 geni erano potenzialmente analizzabili per un ruolo patogenico.

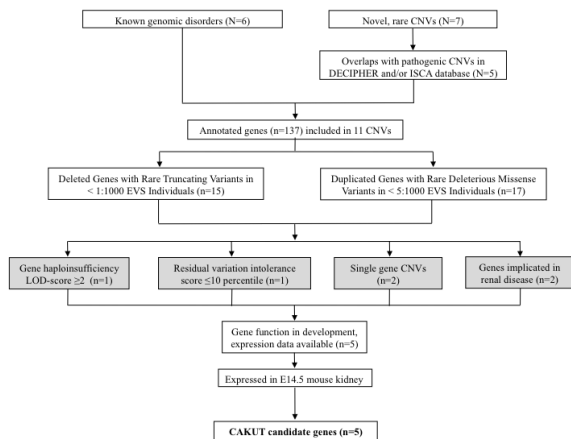


Fig. 4 Pipeline per identificare i driver genetici sottostanti le CNVs rare.

Abbiamo cross-annotated i nostri geni con il Exome Variant Server (EVS; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) ed escluso tutti i geni deleti che portano mutazioni troncanti in >1:1,000 soggetti e tutti i geni duplicati che portavano varianti missenso deleterie in >5:1,000 individui. I

risultanti 32 geni sono stati successivamente interrogati per alpoinsufficienza logaritmo di odds (HI-LOD) score e le variazioni restanti per variation intolerance (RVI)-score[137, 138]. Abbiamo definito lo HI-LOD score ≥ 2 il 10th percentile del RVI-score per geni che più probabilmente risultano in un fenotipo quando mutati. Il nostro approccio sistematico ha incluso tutte single-gene CNVs, siccome queste varianti potrebbero direttamente indirizzarci al difetto genico (n=2). Infine abbiamo incluso tutti i geni che sono implicate nelle malattie genetiche renali e geni ortologhi noti per dare anomalie di sviluppo nel topo quando mutati (n=2). La lista di geni candidati high-priority (n=5) risultante ha incluso: *DLG1* (MIM601014), *EDA2R* (MIM300276), *KIF12* (MIM611278), *PCDH9* (MIM605514), e *TRAF7* (MIM606692). Interessante è che le varianti troncanti in questi geni sono estremamente rare suggerendo che mutazioni deleterie sono state eliminate dal processo di selezione naturale. Abbiamo valutato i profili di espressione di geni dello sviluppo del rene nel topo per tutti i geni high-priority utilizzando i database GUDMAP (<http://www.gudmap.org>) e Genepaint (<http://www.genepaint.org/>). In accordo con questi database, tutti i 5 geni erano espressi nello sviluppo del tratto urinario del topo. Abbiamo quindi eseguito studi di localizzazione mediante immunofluorescenza nell'embrione di topo (day E14.5). Come atteso dai dati coinvolgenti il *Dlg1* nelle malformazioni delle vie urinarie nel topo (Abnormal development of urogenital organs in *Dlg1*-deficient mice, *Development*) questo gene è estremamente espresso nella gemma ureterale (UB) e nel mesenchima metanefrico (MM). L'immunoistochimica ha mostrato una forte espressione di *KIF12* nel UB in embrioni umani.

Risultati. I risultati della nostra ricerca mostrano un nuovo approccio sistematico per la prioritizzazione di geni candidate sottostanti le CNVs basato sull'uso di tools bioinformatici e dati genetici di popolazione. In questo studio abbiamo identificato DLG1 e KIF12 come geni candidati per il CAKUT (dettagli non inseriti nella presente tesi di dottorato).

C) Genetic dissection del coinvolgimento renale nella sindrome di DiGeorge

La sindrome di DiGeorge (DGS; OMIM #188400)/velo-cardio-faciale; OMIM #192430) è la sindrome da microdelezione più comune con una prevalenza di 1 ogni 2000-4000 nati vivi[139-141]. Il braccio lungo del cromosoma 22 multipli segmenti duplicati (low copy repeats, o LCRs) che predispongono al riarrangiamento genomico. La forma più comuni che causa la DGS è una delezione (Fig.5) in eterozigosi di ~2.5 Mb tra il segmento LCR22A e -D (che più frequentemente si presenta come *de novo*), e delezioni meno frequenti tra LCR22A e -B, LCR22B e -D, oLCR22C e -D(riportati a seguito come A-D, A-B, B-D o C-D)[22, 140-143](Fig. 5). Altri riarrangiamenti sul cromosoma 22 coinvolgono zone più distali di LCR22s da -E a-H, ma queste generalmente non si associano a DGS. Il CAKUT è presente in circa un terzo dei soggetti affetti da DGS suggerendo che l'aploinsufficienza di uno o più geni nella regione 22q11.2 A-D possa essere responsabile del fenotipo renale (Fig.5). Tali geni sono sconosciuti.

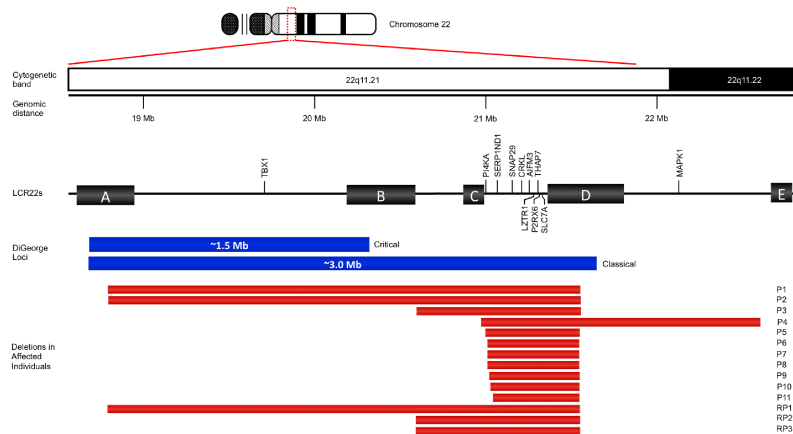


Fig.5 Delezione identificata in 14/2,080 pazienti affetti da CAKUT rappresentata nel contesto della regione cromosomica 22q11.2. LCR=low copy repeats; Mb=Megabases.

Materiali, metodi e risultati

-La delezione nella regione 22q11.2 C-D della Sindrome di DiGeorge è frequente nel CAKUT

La ricerca di CNVs nella nostra coorte di 2080 pazienti con CAKUT mediante genome-wide ha portato alla identificazione di 14 soggetti (0.7%) con delezione a livello del locus 22q11.2. La medesima delezione è risultata in solo 3 individui nella coorte di controllo di 22,094 (0.01%) analizzata ($p = 6.2 \times 10^{-13}$; OR = 49.8). L'analisi della mappatura ha indicato che tutte le delezioni sovrapponevano con la regione di DGS comune 22q11.2 LCR22A-LCR22D: 3 pazienti erano carrier della classica delezione di ~2.5Mb da A a D, 3 pazienti di una lesione compresa tra LCRs B e D, mentre i rimanenti 8 soggetti erano deleti per la regione più breve tra LCRs C e D (Fig.5). 12 pazienti su 14 mostravano agenesia renale o ipodisplasia renale (RHD) mentre solo 2 avevano un fenotipo coinvolgente solo l'uretere, indicando che il locus 22q11.2 C-D è critico per la nefrogenesi nell'uomo. Nell'insieme questi dati identificano delezioni a questo locus in 1.1% dei soggetti con agenesia renale o ipodisplasia (12/1,093 casi vs 3/22,094 controlli, $p = 4.5 \times 10^{-14}$; OR = 81.5) e

identificano nel locus di DGS la seconda causa più comune per lo sviluppo di CAKUT dopo la sindrome da microdelezione associata a 17q12 (renal cysts and diabetes syndrome, RCAD) nella nostra coorte.

L'analisi dei breakpoints basata su SNP array delle CNV hanno localizzato la regione critica per il fenotipo del CAKUT a una zona minima di overlap (MRO) di ~370 Kb, contenente 9 geni codificanti per proteine (Fig.5). Questa regione esclude *TBX1*, suggerendo che questo gene non sia coinvolto nella patogenesi del CAKUT nei soggetti con DGS/22q11.2 deletion syndrome. Infatti *Tbx1* non è stato osservato essere espresso nei reni dell'embrione di topo e i topi *Tbx1* null hanno una normale nefrogenesi iniziale (non mostrato).

-Modello funzionale con zebrafish mostra difetti nel pronefro per *aifm3*, *snap29*, e *crkl*.

I dati derivanti dagli studi del nostro gruppo di studio sull'uomo suggeriscono anomalie del dosaggio genico in uno o più dei 9 geni all'interno della delezione alla base dello sviluppo delle anomalie renali. La soppressione sistematica *in vivo* di tutti i geni trattabili con esperimenti all'interno della regione deleta CNV può informarci mediante l'analisi dei relativi fenotipi risultanti del contributo di fattori di trascrizione specifici associati alle patologie correlate a CNV nell'uomo. Abbiamo quindi creato un modello embrionale di zebrafish per il CAKUT con la microdelezione di ~370 Kb e sui 9 geni specifici mediante morfolino e CRISPR/Cas9 (Fig.6), che ha supportato la nostra ipotesi.

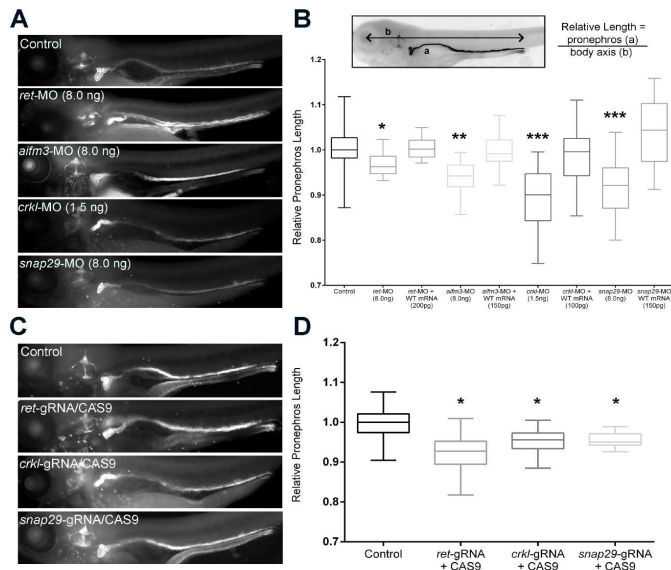


Fig.6 Modello con Zebrafisch:knockdown di *ret*, *aifm3*, *snap29*, e *crkl* effettuato con morfolino e G0 CRISPR mostra anomalie a carico del pronefro.

- L'uso di whole exome e targeted next-generation sequencing hanno identificato una mutazione deleteria in *CRKL*

Sulla base dei risultati nel modello zebrafish, abbiamo ripreso studi genetici sull'uomo valutando se soggetti affetti da CAKUT sporadici potessero essere carrier di mutazioni loss-of-function (LOF; definite come premature termination, splicing, e frameshift) in uno di questi 9 geni inclusi nella regione DGS MRO.

Abbiamo eseguito exome sequencing in 60 pazienti affetti da agenesia renale o ipodisplasia. Nessuno dei geni ha mostrato eccesso di burden di mutazioni rare troncanti o di varianti ovvie causanti malattia rispetto ai controlli della popolazione generale per *LZTR1*, *P2RX6*, e *SLC7A4*.

SERPIND1, SNAP29, CRKL, e THAP7 sono invece risultati essere affetti da LOF mutations in 2:10,000 individui, rendendoli quindi con più probabilità geni candidati. In particolare, i portatori di high-quality LOF variant in CRKL tra >60,500 individui si classificavano nel top 2nd centile per aploinsufficienza genomica.

Questi dati, quando confrontati con le nostre analisi di dosaggio genico sullo zebrafish hanno posto CRKL come gene a alta priorità per lo sviluppo del fenotipo renale nella malattia di DGS.

Come ulteriore test di conferma abbiamo eseguito il targeted next-generation resequencing mediante Fluidigm microfluidic PCR capture abbinato a massively parallel resequencing per tutti gli esoni codificanti (n=107) di PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, THAP7, P2RX6, e SLC7A4 in 526 soggetti con agenesia renale o ipodisplasia. Abbiamo così identificato una mutazione troncante in CRKL, p.Q31*, in un paziente con agenesia renale unilaterale e 4 ulteriori varianti missense assenti nel ExAC database, conservate nei vertebrati, e predittive per modificare la struttura proteica nel modello *in silico*. Sulla ipotesi che la mutazione in CRKL p.Q31* fosse il driver primario per il CAKUT nel primo paziente, abbiamo condotto su di lui il whole exome sequencing; non è stata ritrovata nessuna mutazione patogena nota già riportata in associazione al CAKUT né LOF mutations nei nuovi geni candidati. Infine, per escludere che la variante di CRKL postulata responsabile del fenotipo fosse un polimorfismo di popolazione specifico abbiamo eseguito il targeted resequencing in 576 ulteriori controlli e in 1,152 pazienti affetti ad IgA nephropathy con ecografia renale normale e della medesima etnia e sito di reclutamento. Tutte le varianti di CRKL sono risultate assenti nella popolazione di controllo di >60,500 nel Exome Aggregation Consortium (ExAC) e nei nostri 1,728 controlli appaiati. Mettendo insieme i nostri dati di sequenziamento e effettuando i test di

burden tra i nostri 586 casi e i controlli europei dal ExAC (n=33,352) o i controlli etnicamente e geograficamente abbinati (n=1,728), è risultato un eccesso significativo di varianti funzionali rare in CRKL nei nostri casi (Fisher's exact, $p=3.7 \times 10^{-3}$, OR 5.2; $p=4.9 \times 10^{-3}$, OR=14.8; rispettivamente). Questi dati hanno rinforzato la candidatura delle varianti di CRKL come lesioni genetiche causative.

-Studi di espressione e funzionali implicano CRKL come causa principale della genesi della malattia renale nella DGS

Come ulteriore test per determinare il ruolo di CRKL nella patogenesi della malattia renale in DGS, abbiamo effettuato studi di espressione di mRNA e proteine in tessuti rilevanti nella patologia renale e in un modello ingegneristico di topo che coinvolgevano due esoni di *Crkl*. Studi sull'uomo hanno mostrato che durante la sesta settimana di sviluppo CRKL esibiva un'espressione modesta citoplasmatica nei tessuti derivanti sia dalla gemma ureterale che dal mesenchima metanefrico. (Fig. 7A) Alla ventunesima settimana di sviluppo CRKL poteva essere ritrovato solo sui tubuli prossimali e collettori sul lato apicale delle cellule epiteliali (Fig.7B). In fase post natale (1.5 anni) il rene mostrava un abbondante segnale di CRKL nei tubuli prossimali e collettori sul lato apicale e un segnale diffuso citoplasmatico nelle cellule endoteliali glomerulari (podociti), nella capsula del Bowman e sui tubuli (Fig.7C). Nei reni embrionali di topo al momento E15.5, *Crkl* mostrava una forte e specifica espressione.

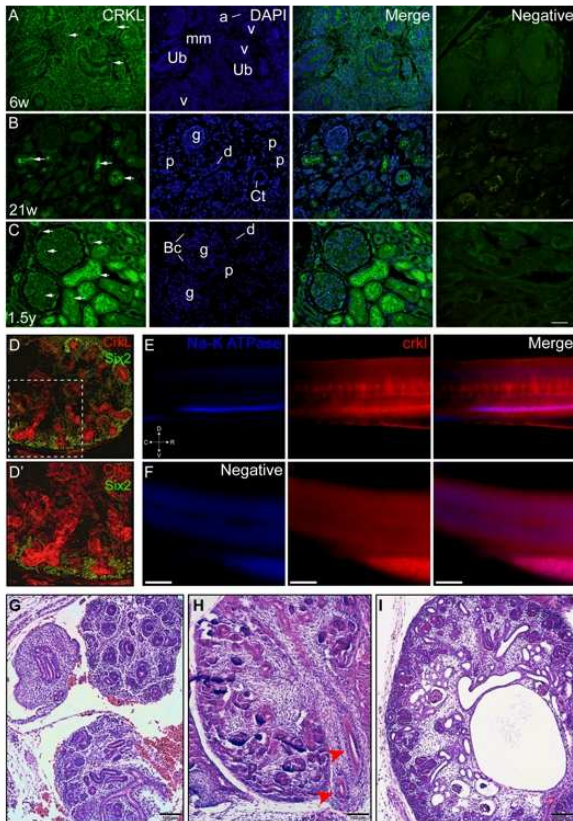


Fig.7(A-C) Espressione di CRKL alla sesta, dodicesima e ventunesima settimana nel rene embrionale umano e in un rene da paziente pediatrico di 18 mesi di vita. (D,D') Espressione di Crkl alla 15.5 giornata embrionale di rene di topo (rosso) in animali Six2-GFP reporter. (E,F) Immunostaining per Crkl (rosso) e la sua co-localizzazione mediante anticorpi verso la NaK-ATPase (blu) nel pronefro di zebrafisch all 96 hpf. (G-I) Inattivazione di Crkl nel topo risulta in reni doppi con segni di displasia in mouse results ($Crkl^{f/+}$ -Six2Cre), doppi ureteri a partenza da un unico ($Crkl^{f/+}$ -E2aCre), e displasia cistica con idronefrosi ($Crkl^{f/f}$ -Six2Cre).

Genetic dissection del coinvolgimento renale nella sindrome di DiGeorge: risultati complessivi

La sindrome di DiGeorge (DGS) è una malattia genetica classica con coinvolgimento multiorgano e la comprensione della patogenesi ha implicazioni in molti diversi ambiti medici. All'inizio degli anni 2000 la scoperta di *TBX1* come principale causa delle malformazioni cardiache nei soggetti con DGS ha rappresentato un importante avanzamento nella conoscenza sia dello sviluppo di anomalie cardiache nel DGS che della architettura genetica delle CNVs[144]. Qui abbiamo studiato una larga coorte di pazienti con

anomalie congenite dei reni e delle vie urinarie. Abbiamo scoperto come delezioni nella regione 22q11.2 responsabile per DGS, si associno significativamente anche ai CAKUT sporadici. Nella coorte di 2080 casi affetti da CAKUT la delezione in 22q11.2, con una zona di overlap minima tra LCR22C e LCR22D, è stata identificata nel 1.1% dei pazienti con malformazione renale. Le correlazioni genotipo-fenotipo suggeriscono che queste diverse varianti sono specifiche per anomalie a carico del parenchima renale piuttosto che per le patologie dell'uretere e delle vie urinarie e che possono essere predittive per malattie renali in soggetti con associate anomalie degli ureteri (come in uno degli otto pazienti descritti precedentemente). Questi dati mostrano come la delezione in 22q11.2 sia la seconda più comune variante strutturale predisponente per il CAKUT dopo la delezione in 17q12 responsabile per la sindrome chiamata renal cysts and diabetes (RCAD), identificata nel 2.2% dei casi con ipodisplasia renale (RHD) della stessa coorte. I nostri dati suggeriscono che la malattia renale nel DGS sia largamente dovuta alla aploinsufficienza di uno o più geni posti tra LCR22C e -D. L'analisi per il dosaggio genico nello sviluppo renale dello zebrafish ha portato alla luce tre geni locati nella regione minima di 370kb di overlap come potenziali responsabili della malattia renale: Crkl, Aifm3 e Snap29. Coerentemente con questi dati abbiamo ritrovato mutazioni altamente deleterie a carico di CRKL, includenti un allele che dà troncaggio prematuro nel 1% dei casi di CAKUT sporadici. Ulteriori studi hanno mostrato come questo trascritto sia coinvolto in eventi loss-of-function nell'uomo e come sia un fattore di espressione chiave durante lo sviluppo del tratto urinario nell'uomo, nel topo e nello zebrafish. Gli studi di inattivazione genica di Crkl nel topo sono risultati in alterazioni fenotipiche del rene e delle vie urinarie durante lo sviluppo compatibili con il CAKUT

nell'uomo, come duplicazione degli ureteri, duplicazione dei reni con anomalie della ramificazione della gemma ureterale, displasia renale microcistica con dilatazione tubulare e ridotta nefrogenesi. In conclusione, il nostro approccio suggerisce con forza il ruolo causale di CRKL nella patogenesi delle malformazioni renali, in particolare nel contesto della sindrome da microdelezione DGS/22q11.2 e più ad ampio spettro nei casi di CAKUT sporadici. Il nostro studio mostra infine come l'uso combinato di indagini cliniche, genomiche e funzionali su modelli animali multipli possa descrivere l'architettura genetica delle varianti strutturali di alta rilevanza clinica.

Precision in CAKUT: gruppo di studio italiano sulla patogenesi e le complicanze delle anomalie congenite dei reni e delle vie urinarie

Introduzione

Gli aspetti di ricerca traslazionale mirano a portare le nuove conoscenze genetiche in ambito clinico e a rivoluzionare l'approccio generale al CAKUT. L'ipotesi alla base è che la diagnosi genetica precoce nei pazienti portatori CAKUT possa migliorare l'outcome tramite lo sviluppo di nuove modalità personalizzate di fenotipizzazione e nuovi tool che guidino i percorsi diagnostico-terapeutici. I lavori pubblicati dal nostro gruppo di ricerca [25, 106, 107] hanno rivelato un link inaspettato tra il CAKUT e le patologie associate al neurosviluppo, malattie che spesso manifestano i loro primi sintomi più tardi nel corso della vita.

L'applicazione di studi genetici precoci o laddove possibile in epoca prenatale, riteniamo possa identificare soggetti a rischio per le patologie del neurosviluppo (come autismo, ritardo mentale, epilessia) e malattie a carico di altri apparati (quali endocrino, cardiovascolare). La diagnosi preventiva permetterà un trattamento precoce sulle malattie trattabili con alta probabilità di ottenere un miglioramento sull'outcome del paziente. Sia mutazioni puntiformi che copy number variation (CNVs; varianti strutturali) sono state descritte essere coinvolte nel determinare il CAKUT. I geni più comunemente coinvolti nel CAKUT sono *HNF1B*, *PAX2*, *EYA1*[59, 145]. Alcuni di questi geni quando mutati predispongono a malattie renali al di fuori del CAKUT e extra-renali che si manifestano non solo nell'infanzia ma anche nell'età adulta: *HNF1B* è responsabile per il maturity-onset diabetes of the young tipo 5 (MODY-5)[146]; mutazioni a carico di *PAX2* portano allo sviluppo del coloboma[29, 147] oculare e della glomerulosclerosi focale e segmentaria[148]; *EYA1*, quando mutato, determina ipoacusia e ritardo mentale[149, 150]. Le CNV sono state associate a svariati fenotipi nell'uomo, comprendenti le malattie del neurosviluppo, anomalie cardiache e altre[88-91, 94]. I risultati delle nostre ricerche hanno avuto un ruolo pilota nel dimostrare che CNVs rare sono una fonte significativa di variabilità genetica nel CAKUT. Oltre 40 loci (Fig. 8) sono coinvolti nella genesi del CAKUT e malattie genetiche note dovute a riarrangiamenti a livello delle regioni cromosomiche 1q21, 16p11.2, 17q12, e 22q11.2 sono responsabili della maggior parte dei casi[106].

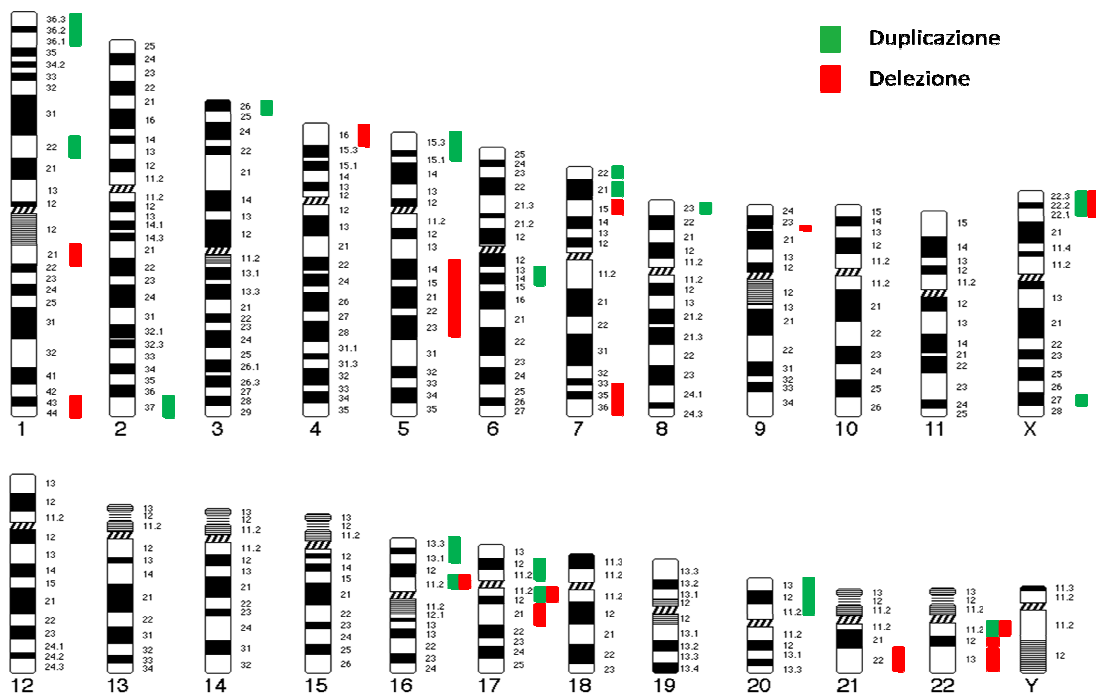


Fig.8 Rappresentazione dei loci genici individuati come responsabili di malformazioni dei reni e delle vie urinarie negli studi ad oggi pubblicati.

E' importante sottolineare come lo spettro completo dei fenotipi secondari a queste sindromi da CNV non sono accertabili in utero o alla nascita quando il CAKUT viene invece riscontrato. Quindi un difetto anatomico a carico dei reni e delle vie urinarie può agire da sentinella per patologie extra-renali che diventeranno completamente manifeste più tardivamente nel corso della vita. Per esempio la microdelezione ricorrente in 17q12, che causa la sindrome renal cysts and diabetes (RCAD) si caratterizza da CAKUT congenito e manifestazioni extra renali che appaiono in seguito (il diabete si presenta di solito nella terza decade di vita). La sindrome è anche associata con un aumentato rischio di autismo e schizofrenia. Anche la sindrome di DiGeorge data dalla microdelezione in 22q11.2 predispone al CAKUT e a malattie a esordio più tardivo come schizofrenia, ritardo mentale, malattie immunologiche ed

endocrine[151-156]. Molte di queste malattie hanno la possibilità di essere trattate nelle fasi iniziali con un miglioramento dell'outcome, specie per gli aspetti neurocognitivi[157, 158].

Presupposti e procedure allo studio

La ricerca di varianti patogeniche rare mediante test genetici nei pazienti affetti da CAKUT non è attualmente raccomandata e il Sistema Sanitario Nazionale non rimborsa questi test, determinando livelli di diagnosi sub-ottimali. Qui ipotizziamo che l'introduzione di una diagnosi molecolare mediante DNA microarray e exome sequencing possa significativamente migliorare la diagnosi, la stratificazione del rischio e la gestione clinica del CAKUT. Per dimostrare al meglio la nostra ipotesi il reclutamento e la caratterizzazione clinica di soggetti con CAKUT verrà esteso in diversi centri italiani. Le analisi di DNA microarray e di exome sequencing sui pazienti verranno effettuate in collaborazione con il laboratorio della Columbia University. Una volta disponibili i risultati molecolari questi, quando positivi, verranno confermati presso laboratori certificati italiani e verrà avviato il programma di medicina personalizzata.

Ipotesi, rationale e procedure al protocollo di Medicina Personalizzata

Ipotesi 1: il reclutamento di una vasta coorte di soggetti affetti da CAKUT e l'analisi genome-wide possono identificare individui con mutazioni che predispongono a malattie extra-renali

AIM1: reclutamento e diagnosi genetica di pazienti con CAKUT

1.a reclutamento di 3000 casi prevalenti e incidenti durante tre anni di progetto

Razionale. stabilire un grosso network per il reclutamento di pazienti e standardizzare i criteri diagnostici, sviluppare nuovi tool per la gestione clinica basati sull'eziologia della malattia.

Procedura. Il reclutamento dei pazienti e la caratterizzazione clinica iniziale sarà condotta in diversi centri italiani, utilizzando criteri standardizzati.

1.b ricerca di mutazioni diagnostiche via copy number variation studies e whole exome sequencing

Razionale. varianti rare con grosso effetto sul fenotipo che possono definire la diagnosi possono essere individuate utilizzando il DNA microarray e il whole exome sequencing.

Procedura. Verranno genotipizzati tutti i casi di CAKUT con DNA microarray per l'analisi CNV. Le CNV riscontrate nei casi studiate verranno confrontate con quelle di 80000 casi controllo disponibili presso la Columbia University. I casi CAKUT negativi per CNVs saranno studiati mediante exome sequencing per identificare mutazioni puntiformi. Tutti i casi risultati positivi ai test genetici verranno validati in un laboratorio di genetica medica certificato in Italia.

Ipotesi 2: la diagnosi di CAKUT spesso viene effettuata in utero o immediatamente dopo la nascita, prima che si manifestino altri segni o sintomi di malattie extra-renali che hanno invece uno sviluppo più tardivo nel corso della vita. Una fenotipizzazione approfondita nei casi affetti da CAKUT portatori di una diagnosi genetica verrà applicata per sviluppare nuovi schemi diagnostici e terapeutici e potrà portare alla identificazione di anomalie subcliniche aggredibili con interventi precoci.

AIM2:stabilire un protocollo clinico per la fenotipizzazione accurata dei pazienti con CAKUT carrier di mutazioni genetiche.

Razionale. CNVs e mutazioni puntiformi che causano il CAKUT possono predisporre a malattie extra-renali che si manifestano più tardivamente nella vita. Quindi la caratterizzazione fenotipica approfondita è indispensabile nei pazienti portatori di mutazioni per definire nuovi protocolli terapeutici utili a costruire nuovi tool clinici. Questo dovrebbe migliorare l'outcome clinico.

Procedura. Soggetti con diagnosi validata nei laboratori certificati italiani verranno richiamati per la restituzione del dato genetico e per il counseling, verranno sottoposti a test di base di laboratorio e clinici per individuare un coinvolgimento extra-renale, saranno sottoposti a test neurocognitivi.

2.a Restituzione dei risultati genetici e counseling.

La restituzione dei risultati genetici verrà condotta dal medico del centro di appartenenza del paziente e dal genetista clinico. I pazienti e i loro familiari verranno informati sulla modalità di trasmissione della malattia, il rischio di ricorrenza in gravidanze future, il rischio di sviluppo di altre malattie extra-renali, quando noto. Le informazioni principali sulla malattia genetica e la sua gestione verranno trasmesse anche tramite brochure come riferimento a ogni famiglia.

2.b Protocollo Clinico Base.

Ogni paziente con un test genetico positivo verrà sottoposto a un gruppo di test diagnostici base comprendente: test endocrini sul metabolismo osseo, parametri di crescita, studio della funzionalità renale su sangue e urine, misura della pressione arteriosa e altri (Tab. 4 e Fig. 9).

Genomic analyses to guide diagnosis and treatment in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)
GENETIC AND CLINICAL PROTOCOL

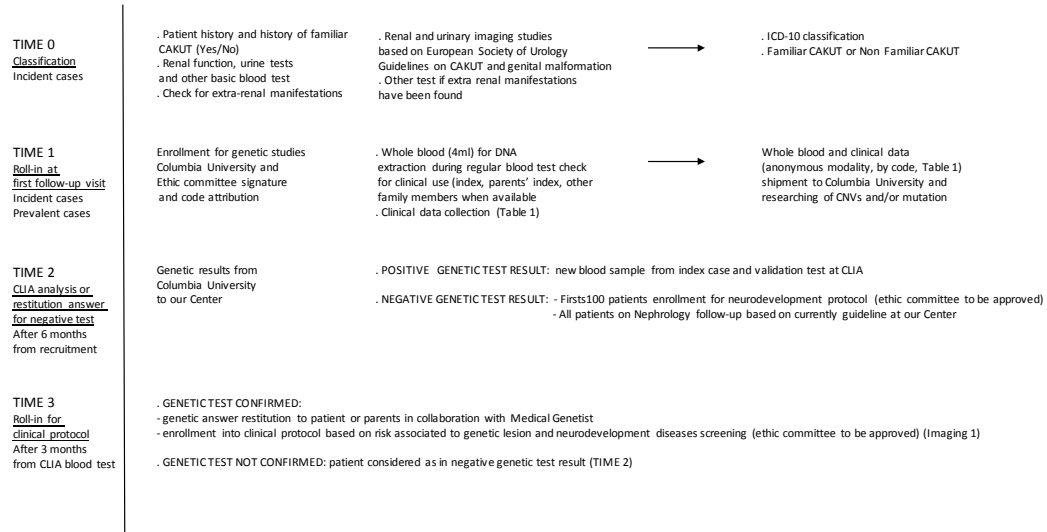


Fig. 9 Schema del protocollo clinico e genetico

Unique_ID	ESEMPIO1	ESEMPIO2	ESEMPIO3	Necessary
Family_ID	NA	NA	NA	
Individual_ID	T9-14	T1-71	T8-23	Necessary
Father_ID	NA	T1-72	T8-24	Necessary
Mother_ID	T9-15	T1-73	T10-11	Necessary
RELATIONSHIP TO INDEX	INDEX	INDEX	INDEX	Necessary
SEX	F	F	M	Necessary
DOB (Month/Day/Year)	10/26/05	8/5/08	3/20/92	Necessary
PLACE OF BIRTH (CITY)	torino	-	salerno	Necessary
PLACE OF BIRTH (REGION/COUNTY/STATE)	piemonte	-	campania	Necessary
NATIONALITY	ITALIAN	ITALIAN	ITALIAN	Necessary
ETHNICITY	CAUCASIAN	CAUCASIAN	CAUCASIAN	Necessary
RECRUITMENT_CENTER	Parma	Parma	Parma	Necessary
Recruiter_Name	xxxxx	xxxxx	xxxxx	Necessary
FAM HISTORY (Y/N/U)	N	N	Y	Necessary
FAMILY MEMBER 1	-	-	T9-81	Good if available
FAMILY MEMBER 2	-	-	T11 72	
FAMILY MEMBER 3	-	-	-	
FAMILY MEMBER 4	-	-	-	
FAMILY MEMBER 5	-	-	-	
CONSAQUINITY (Y/N/U)	N	-	-	Necessary
RECRUITMENT DATE (Month/Day/Year)	6/16/09	2/19/09	6/1/09	Useful
DATE OF DIAGNOSIS (Month/Day/Year)	-	-	6/1/05	Useful
AGE AT DIAGNOSIS (Y, M, D, -1)	-	-	4Y	Useful
PRIMARY PHENOTYPE (DESCRIPTIVE)	VUR B	Renal Agensis	RHD	Necessary
PRIMARY PHENOTYPE (CODE)	Q62.7	Q60.0	Q60.4	Necessary
SIDE (R, L, B)	B	R	B	Useful
RENAL DEFECT (Parenchymal description)	-	Renal Agensis	RHD L, dysplasia R	Useful
MISCELLANEOUS	-	-	-	
Additional Urinary Defect (Y/N)	N	Y	N	Necessary
Additional Urinary Defect (DESCRIPTIVE)	-	SMU L	-	Necessary
Non-Urinary Defects (Y/N/U)	N	U	Y	Necessary
Additional Defect 1	-	-	pulmonary valve stenosis	description
Additional Defect 2	-	-	EEG conduction defects	
Additional Defect 3	-	-	-	
Additional Defect 4	-	-	-	
Additional Defect 5	-	-	-	
Additional Defect 6	-	-	-	
Additional Defect 7	-	-	-	
OTHER	-	-	-	
HEIGHT (cm)	99	NA	NA	not necessary
WEIGHT (kg)	-	-	-	not necessary
DIAGNOSTIC MODALITY (USG, CM, CT, MRI)	USG,VUCUG	USG	USG	Useful
DIAGN CLINICAL SYMPTOMS (Y/N)	N	Y	N	Useful
UTI AT DIAGN. (Y/N)	N	Y	N	Useful
INCONTINENCE AT DIAGN. (Y/N)	-	NA	NA	Useful
HEMATURIA AT DIAGN. (Y/N)	-	NA	NA	Useful
PROTEINURIA AT DIAGN. (Y/N)	-	NA	NA	Useful
RENAL INSUFFICIENCY AT DIAGN. (Y/N)	-	NA	NA	Useful
USG (Yes/No)	Y	NA	Y	Useful
R SIZE (cm)	7.2	NA	10.0	Useful
L SIZE (cm)	8.3	NA	8.0	Useful
ECHOGENICITY (R, L, B, N)	-	NA	NA	not necessary
PELVIC DILATATION (R, L, B, N)	0.8-2.3	L	N	not necessary
URETER DILATATION (R, L, B, N)	-	N	N	not necessary
CYSTS (R, L, B, N)	-	N	N	not necessary
OTHER	-	-	-	not necessary
VUCUG (Yes/No)	Y	N	N	Useful
R VUR GRADE	3	NA	NA	Useful
L VUR GRADE	4	NA	NA	Useful
SCARS (Y/N)	-	N	N	Useful
OTHER	-	-	-	not necessary
OTHER DIAGNOSTICS (CT, MRI)	-	NA	NA	not necessary
DESCRIPTION	-	NA	NA	not necessary
BP (Y/N)	-	-	Y	not necessary
Cr (mg/dl)	0.39	NA	1.35	not necessary
BUN (mg/dl)	-	NA	NA	not necessary
Uprotein (Y/N)	-	NA	NA	not necessary
Uheme (Y/N)	-	NA	NA	not necessary
THERAPY (DESCRIPTIVE)	No therapy	-	ACEi	not necessary
SURGERY (Y/N)	Y	N	N	Useful
SURGERY (DESCRIPTIVE)	SDING B 01/09	-	-	description
GFR AT RECRUITMENT (CrCl)	-	-	58	not necessary
OUTCOME AT RECRUITMENT	-	-	CRF	not necessary
Age ESRD	-	NA	NA	not necessary
ADDITIONAL COMMENTS	-	-	-	
MUTATION DISCOVERED (Y/N)	-	-	-	not necessary
TYPE OF MUTATION (SNP, CNV)	-	-	-	not necessary
GENE/LOCUS	-	-	-	not necessary
MUTATION NAME	-	-	-	not necessary
GENOTYPING (Y/N)	-	Y	Y	not necessary
GT PLATFORM	-	610-Quad	610-Quad	not necessary
GT_ID	-	4861545153_R02C01	-	not necessary

Tab. 4 Dati clinici del protocollo clinico di base con esempi

2.c Protocollo sulle patologie delneurosviluppo.

Ogni paziente con un test genetico positivo sarà soggetto a test mirati a indagare le funzioni cognitive complesse e le funzioni esecutive, a risonanza magnetica cerebrale per ricercare anomalie strutturali che possono coesistere o per meglio definire condizioni neurocognitive o deficit comportamentali già clinicamente manifesti laddove clinicamente indicato (protocollo neurologico, Tab.5, Tab.6 vedi pag.64,65,66)

2.d Approccio multidisciplinare basato sul rischio genetico

Nei pazienti in cui il test genetico ha mostrato risultati di valore altamente predittivo per patologie extra-renali verrà effettuata una valutazione base da specialisti indirizzata a screenare le patologie sospette.

Ipotesi 3: strumenti per la guida decisionale diagnostica e terapeutica, costruiti sotto forma di algoritmi o pienamente integrati nella cartella informatica dei pazienti, miglioreranno la gestione standardizzata e la pratica clinica dei pazienti affetti da CAKUT.

AIM 3: sviluppare e validare strumenti di supporto decisionale per guidare la diagnosi e il trattamento

Razionale. Incorporare i riscontri clinici e genetici negli strumenti di supporto decisionale aumenta i mezzi utili al clinico per la diagnosi e il trattamento dei pazienti con CAKUT. In particolare questi strumenti permetteranno: a) l'identificazione automatica dei pazienti maggiormente qualificati per il test genetico; b) gestire materiale educativo per i medici di famiglia/pediatri di libera scelta per migliorare le capacità di interpretare i test clinici e genetici e prevedere le situazioni a rischio; c) inquadrare i casi di soggetti affetti da CAKUT e con test genetico positivo che necessitano di una fenotipizzazione approfondita.

Procedura. I tool di supporto decisionale verranno generati in forma di algoritmi con flow chart e materiale educativo e/o come materiale integrato nella cartella clinica elettronica del paziente sotto forma di pop-up window, flag e infobutton. Nella fase iniziale del progetto questi strumenti saranno preparati solo in forma cartacea e disseminati nei centri di reclutamento per essere testati. Successivamente lavoreremo con il Dipartimento di Bioinformatica per incrementare al meglio la cartella clinica informatizzata dei pazienti.

3.a Strumenti per l'identificazione di pazienti per i quali test clinici o genetici sono indicati. Nel sistema delle cartelle cliniche informatiche verrà esposto un flag a tutti i pazienti che abbiano segni clinici o immagini radiologiche compatibili con CAKUT in modo da facilitare gli accertamenti mirati e l'avvio delle indagini genetiche e le cure cliniche.

3.b Strumenti utili al clinico per l'interpretazione dei risultati genetici. Il materiale educativo fungerà da guida al clinico nella restituzione dei risultati genetici per le condizioni autosomiche dominanti, recessive e X-linked; per fornire il counseling sul rischio di ricorrenza di malattia in future gravidanze in caso di mutazioni ereditate e *de novo*, lo screening nei familiari di primo grado; per aumentare l'attenzione mediche in caso di condizioni cliniche complesse. Pop-up window verranno installate nei tool informatici.

3.c Linee guida generali per la gestione dei pazienti affetti da CAKUT con test genetici positivi. Una volta stabilita la diagnosi, un set standard di screening guiderà il medico nel condurre test basali di laboratorio e clinici per valutare anomalie extra-renali. Il set sarà identico per tutti i pazienti portatori di lesioni genetiche. Pop-up window guideranno il clinico sulla cartella clinica informatizzata.

3.d Linee guida per la gestione di lesioni genetiche specifiche. Diagnosi genetiche specifiche supporteranno set di strumenti guida basandosi sulla correlazione genotipo-fenotipo e sulla prevalenza delle manifestazioni associate attese (esempi 1-6 a seguito)

Index cases will be clinically evaluated following the risk associated with CNVs or SNVs lesion found by genetic test. Here some example of the most frequent syndromes in CAKUT.

1. 17q12 Deletion and Duplication Syndrome (Renal cysts and Diabetes syndrome, RCAD)

Test for researching extra-renal clinical phenotype consistent with:

- maturity-onset diabetes of the young type, pancreatic hypoplasia ⇒ ⇒ [metabolic analysis and abdomen ultrasonography](#)
- various genital tract abnormalities (complete absence of uterus/vagina, unicornuate uterus, uterus didelph, non cavitating rudimentary horn) ⇒ [gynecologist evaluation and pelvic ultrasonography. Pelvic MRI where adressed](#)
- central nervous system involvement (ranging from speech delay to moderately severe mental retardation, complex partial seizures, autism spectrum disorder, macrocephaly, schizophrenia) ⇒ [neurodevelopment disease protocol](#)
- facial dysmorphism (epicanthal folds, downslanting palpebral fissures, arched and high eyebrows, slightly depressed nasal bridge, and malar flattening)
- abnormal liver function ⇒ [metabolic analysis and abdomen ultrasonography](#)
- early-onset gout ⇒ [metabolic analysis](#)
- electrolyte abnormalities ⇒ [blood and urinary test](#)

The same test will be apply for intragenic *HNFIβ* mutation despite the lower risk of neurodevelopmental disorder and other associated phenotypes.

2. 22q11 Deletion and Duplication Syndrome (DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome/ DGS/VCFS)

Test for researching extra-renal clinical phenotype consistent with:

- hypocalcemia secondary to hypoplasia of the parathyroid glands and other Endocrine and Metabolic disorder (short stature, hypothyroidism, obesity) ⇒ [calcemia serum levels, parathyroid glands scintigraphy, auxology evaluation and endocrine test as in Table1](#)
- hypoplasia or aplasia of the thymus gland followed by susceptibility to infection due to a deficit of T cells ⇒ [immunological test \(like Ig serum level, T-cell counts in the peripheral blood\)](#)
- variety of cardiac malformations are seen in particular affecting the outflow tract (tetralogy of Fallot, type B interrupted aortic arch, truncus arteriosus, right aortic arch and aberrant right subclavian artery, milder spectrum of cardiac defect with ventricular septal defect ⇒ [accurate Pediatric Cardiologist evaluation and heart ultrasonography by a specialized Pediatric Cardiologist](#)
- facial dysmorphism in newborn (micrognathia, ears with low set and deficient in the vertical diameter with abnormal folding of the pinna, telecanthus with short palpebral fissures, upward or downward slanting eyes, philtrum is short and the mouth relatively small) and velocardiofacial syndrome in the older child (rather bulbous nose and square nasal tip and hypernasal speech associated with submucous or overt palatal clefting) ⇒ [maxillo-facial surgery evaluation](#)
- neurodevelopmental disorder (variable mild to moderate learning difficulties, variety of psychiatric disorders included paranoid schizophrenia and major depressive illness) ⇒ [neurodevelopment protocol](#)
- autoimmune disease (Juvenile rheumatoid arthritis, idiopathic thrombocytopenia purpura, autoimmune hemolytic anemia, psoriasis, vitiligo, inflammatory bowel disease, adult rheumatoid arthritis, Graves disease) ⇒ [specific evaluation](#)
- other: hearing deficits, cholelithiasis, scoliosis, and dermatologic abnormalities (severe acne, seborrhea), genital tract abnormalities (uterus didelph, noncavitating rudimentary horn) ⇒ [specific evaluation](#)

3. **1q21 Deletion and Duplication Syndrome**

Test for researching extra-renal clinical phenotype consistent with:

- neurodevelopment disease (mild to moderate mental retardation, microcephaly, attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD), aggressive behavior, seizure disorders, learning disabilities) ⇒ [neurodevelopment protocol](#)
- cardiac abnormalities ⇒ [accurate Cardiologist evaluation and heart ultrasonography by a specialized Cardiologist](#)
- ocular disease (cataracts) ⇒ [Oculist evaluation](#)
- facial dysmorphic features (frontal bossing, deep-set eyes, bulbous nose) ⇒ [maxillo-facial surgery evaluation](#)
- other: polydactyly, ligamentous laxity, joint hypermobility ⇒ [specific evaluation](#)

4. **16p11.2 Duplication and Deletion Syndrome**

Test for researching extra-renal clinical phenotype consistent with:

- intrauterine growth retardation
- neurodevelopment disease (autism, mild to moderate mental retardation, microcephaly, speech/language delay, seizures, attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD), aggressive behavior, seizure disorders, learning disabilities) ⇒ [neurodevelopment protocol](#)
- cardiac abnormalities (tetralogy of Fallot with pulmonary atresia) ⇒ [accurate Pediatric Cardiologist evaluation and heart ultrasonography by a specialized Pediatric Cardiologist](#)
- ocular disease (coloboma, chorioretinitis) ⇒ [oculist evaluation](#)
- facial dysmorphic features (flat facies, microretrognathia, blepharophimosis, micrognathia, hypertelorism, short nose with hypoplastic nasal alae and absent nasal bridge, low-set and malformed ears, posteriorly rotated ears, narrow palpebral fissures) ⇒ [maxillo-facial surgery evaluation](#)
- skeletal and joint anomalies (cubital deviation of the hands, small hands with distally tapered fingers, talipes varus, articular limitation, single hemivertebra at level L1, multiple hemivertebrae, missing ribs) ⇒ [specific evaluation](#)
- genitalia abnormalities (inguinal hernia, and hydrocele testis, cryptorchidism, micropenis) ⇒ [urology evaluation](#)
- other: obesity) ⇒ [specific evaluation](#)

Compared with the microduplications, the microdeletions were more likely to be penetrant and to be associated with nonspecific major or minor dysmorphism. The results also indicated incomplete penetrance and supported the concept that sex difference provides a relative advantage in protecting females against the development of ASD even when a rare CNV is present. Despite this difference we will apply the same protocol to all the deletion or duplication carrier.

5. **Mutation in PAX2 (Papillorenal Syndrome and Focal Segmental Glomerulosclerosis)**

Test for researching extra-renal clinical phenotype consistent with:

- mono or bilateral eye defects (microphthalmia, retinal degeneration, retinal coloboma, optic nerve colobomas, myopia, isotropy, excavation of the optic disc, esotropia, exophthalmos) ⇒ [oculist evaluation](#)
- focal segmental glomerulosclerosis ⇒ [24 h proteinuria evaluation, renal biopsy if addressed](#)
- central nervous system abnormalities (moderately mentally retarded, microcephalic) ⇒ [neurodevelopment protocol](#)

6. **Mutation in EYA1 (Brachiootorenal Syndrome 1, BOR1)**

Test for researching extra-renal clinical phenotype consistent with ear diseases:

- sensorineural, conductive, or mixed hearing loss
- structural defects of the outer, middle, and inner ear,
- branchial fistulas or cysts
- central nervous system abnormalities (mental retardation has been reported in few cases) ⇒ [neurodevelopment protocol](#)

[All patients will be evaluated by a Otorhinolaryngologist](#)

NEURODEVELOPMENTAL PROTOCOL

All recruited patients will undergo under Pediatric Neuropsychiatric clinical examination and they will be checked by the following psychological protocol (children of 3-6 years of age) and brain magnetic resonance

Psychological protocol.

A. Cognitive Complex functions (Intelligence)

- Raven's Matrices

By age:

1. WPPSI-III
2. WISC-IV
3. WAIS-IV

B. Neuropsychological assessment and Executive Functions

- NEPSY-II

According to the User Manual, the General Battery (follow called: BVG) provides 13 subtest, to investigate all neuropsychological domains + some optional subtests (follow called: FST). The protocol was restricted to the following tests.

1) Attention and executive functions Domain

A1. Visual Attention (3-16 years) BVG: identify and mark in a short time visual target stimuli inserted in a series of distractor stimuli.

A2. Graphics Fluency (5-16 years) FST: produce more and different designs by connecting five points that are presented in a structured or random matrix.

A3. Listening Attention and Response Set (5-16 years) BVG: listen to a word list and tap the appropriate colored circle when they hear the name, according to rules that include congruent and incongruent responses.

A4. Inhibition (5-16 years) BVG: This is a timed test. It assesses the ability to inhibit automatic responses. The subject is looking at a series of forms or black and white arrows and calls the shape or direction or alternating gives a response, based on the shape's color and arrow's color.

2) Language Domain

L5. Verbal Fluency (3-16 years) FST: produce many words as possible in 60 seconds within specific semantic and phonological categories.

3) Memory and Learning Domain

M1. Short and delayed Faces Memory (5-16 years) BVG: after a random learning sequence of faces, in the short and delayed recall tests, the child is shown three photographs from which to choose the face view previously.

M7. Phrases Retrieving (3 -16 years) FST: This test assesses the ability to repeat the growing complexity and length of sentences.

4) Sensorimotor functions Domain

SM1. Fingers' Tapping (5-16 years) FST: run as fast as possible repetitive finger movements or sequences using the dominant or non-dominant hand.

SM2. Hand postures imitation (3-16 years) FST: this tests to be administered in place of SM1 if the child is between 3 and 5 years. Evaluates the ability to mimic postures of the hands / fingers, which implies the visual-spatial analysis of the postures shown by the examiner, a correct and flexible motor planning, and consideration of kinesthetic feedback in planning and correction movements.

SM3. Visual motor precision (3-12 years) BVG: draw as fast as possible of the lines within a track.

5) Social Perception Domain

SO2. Recognition of Emotions (3-16 years) BVG: visual discrimination of a series of facial emotional expressions.

6) Visual - Spatial Processing Domain

V4. Geometric puzzle (3-16 years) BVG: match, turning them mentally, two external shapes with two internal shape in a grid that contains different geometric shapes.

C. PARENTS

1. Child Behavior Checklist (CBCL)
2. Raven's Matrices

Global Assessment (index case and parent) has a duration of about 4 hours total. The evaluated parameters are collected in Table 3 and Table 4

Brain magnetic resonance imaging (MRI) 3 TESLA in patients when clinically recommended subjects.

Brain magnetic resonance imaging (MRI) will be used in patients looking for brain structure abnormalities. MRI is the principal non-invasive method for in vivo assessment of neurologic disorders. Conventional MRI studies may reveal macroscopic brain structure abnormalities in CAKUT carriers with neurocognitive positive test and or specific neurologic signs and symptoms. In the absence of gross neuropathological changes, new MRI techniques (3 Tesla) may detect subtle microstructural anomalies and may be used to study structural and functional brain connectivity in these patients.

	N°	1	2	
Case	Id	T1	T2	
	date of birth	8/25/09	10/13/05	
	DATA TEST	11/14/16	12/6/16	
	Prematurity Birth	Y	N	
	Age at test administration	7	11	
	Age at test administration	3	2	
	School Year			
	Raven test- right	28/36	28/36	
	Raven - Centil	86°	49°	
WISC IV	Qitot	116	97	
	ICV	128	98	
	IRP	115	106	
	IML	100	88	
	IVE	97	97	
	Armonic	SI	SI	
NEPSY II	A1 - visual	10	8	
	A2 - Draw ability	8	7	
	A3 - hearing	11° - 25°	26° - 50°	
	A3 - SET of	11° - 25°	26° - 50°	
	A4 Inhibition-DENOMINATION	11	7	
	A4 Inhibition-DENOMINATION	26° - 50°	51° - 75°	
	A4 Inhibition-DENOMINATION combined	9	9	
	A4 Inhibition-DENOMINATION	12	7	
	A4 Inhibition-DENOMINATION mistakes	26° - 50°	26° - 50°	
	A4 Inhibition-DENOMINATION combined	9	8	
	A4 Inhibition - SWITCHING time	12	9	
	A4 Inhibition-SWITCHING	51° - 75°	26° - 50°	
	A4 Inhibition - SWITCHING	11	8	
	L5 verbal ability	13	8	
	L5 verbal ability phonological	10	6	
	M1 - immediate face memory	8	4	
	M1 - delay face	2	10	
	M1 - total face	4	7	
	M7 - repeating	ND	ND	
	SM1 - fingers	1	5	
	SM2 - copy manual postures	ND	ND	
	SM3 - visual and motor precision	3	6	
	SM3 - visual and motor precision	11° - 25°	6° - 10°	
	SM3 - visual and motor precision	3	3	
	SO2 - emotions identification	7	13	
	V4 - GEOMETRIC	13	12	
	Behavior note		descriptive	descriptive

Tab. 5 Score test neuropsicologici bambini

Case	N°	1	2	
	ID	T1_Mother	T2_Mother	
	Age (years)	42	39	
	DATE TEST	(d/m/y)	12/6/16	
Raven	Raven Test - Right answers	36/60	34/60	
	Raven - Centil	10°	67°	
Expertise scale	Activity	93°	6°	
	Social	37°	55°	
	School	40°	5°	
	TOTAL	49°	7°	
DMS IV	AffetiveProblems	>98°	96°	
	Anxiety	>98°	98°	
	SomaticProblems	98°	<50°	
	ADHD symptoms	>98°	>98°	
	opposite/challenging	70°	69°	
	conductbehaviorproblems	50°	69°	
Syndromic scale	Anxiety/Depression	98°	93°	
	retirement/depression	96°	69°	
	Somaticsymptoms	99°	<50°	
	Social Problems	97°	93°	
	ThoughtProblems	100°	95°	
	AttentionProblem	93°	95°	
	notregulatedbehavior	70°	84°	
	aggressive behavior	97°	72°	
	tot internalizationsymptoms		73 T	59 T
	tot outsourcing symptoms		67 T	58 T
TOTAL		74 T	66T	

Tab. 6 Score test neuropsicologici genitori

Significato e innovazione dello studio

Questo studio si basa sull'osservazione riportata in letteratura dal nostro gruppo di studio che lesioni genetiche, specie le copy number variations che causano le malformazioni dei reni e delle vie urinarie, suggeriscono anche il rischio di ulteriori malattie che si manifestano più tardivamente nel corso della vita, comprendenti malattie endocrine (obesità, diabete), cardiovascolari (ipertensione sistemica e polmonare), e, di particolare importanza malattie associate al neurosviluppo (ritardo mentale, autismo, schizofrenia, epilessia, depressione). Queste malattie non possono essere diagnosticate in utero o precocemente alla nascita, quando generalmente viene posta diagnosi di CAKUT, indicando che un'anomalia strutturale del rene e delle vie urinarie riscontrata prima o subito dopo la nascita possa fungere da sentinella per patologie che daranno se lasciate a sé segni della loro presenza solo più avanti nel corso della vita. Un test genetico precoce ha quindi la potenzialità di informare sui rischi di sviluppo di tali malattie e una serie di interventi diagnostici e terapeutici può essere prontamente applicata al paziente portando potenzialmente un miglioramento dell'outcome clinico globale dei pazienti portatori di CAKUT. Qui proponiamo uno studio su di una larga coorte di bambini e giovani adulti affetti da CAKUT per identificare un grosso repertorio di mutazioni genetiche, come singolo nucleotide o come copy number variation, che causano l'anomalia del rene o del tratto urinario e che predispongono a sviluppo più tardivo di malattie del neurosviluppo, cardiovascolari, endocrine. Proponiamo poi di applicare un deep phenotyping per sviluppare strumenti di supporto decisionale che guidino la scelta gestionale e terapeutica. Infine questo studio è disegnato per tradurre le scoperte genetiche nella pratica clinica, definire un nuovo *standard of care* di medicina

personalizzata per la diagnosi e il trattamento di pazienti con CAKUT e potenzialmente migliorare l'outcome neurologico e globale del paziente.

Risultati preliminari

Ad oggi 15 centri italiani hanno l'approvazione del comitato etico per lo studio e stanno attivamente arruolando pazienti ed ulteriori 15 centri sono in fase di sottomissione o di attivazione del comitato etico così da avviare il reclutamento dei casi (Tab. 7). Ad oggi abbiamo reclutato e caratterizzato clinicamente 1482 casi di CAKUT e più di 1000 familiari (circa il 50% sono stati arruolati al IRCCS G. Gaslini di Genova, il 18% presso l'Università degli Studi di Parma, 15% dall'Università di Brescia e 8% dall'Università di Bari). Tra questi il DNA di 658 pazienti (corrispondenti al 44.4%) è stato sottoposto a indagine molecolare mediante microarray per studi GWAS e CNVs, mentre 393 (26.5%) sono stati studiati mediante whole exome sequencing (WES) prendendo parte a uno studio internazionale costituito globalmente da 2,080 casi e 21,498 controlli (Fig. 10). Le lesioni CNVs identificate più frequenti sono state la delezione in 17q12 (RCAD), la delezione in 22q11.2 (Sindrome di DiGeorge), la delezione 1q21 e quella in 16p11.2. Le mutazioni puntiformi più comuni erano in PAX2, EYA1, HNF1B, SIX5, e GATA3. La maggior parte di queste lesioni, sia CNVs che SNVs, predispongono a malattie extra-renali che si manifestano più tardivamente nel corso della vita e che possono beneficiare di strategia di intervento precoce. I restanti campioni sono attualmente in fase di studio per DNA microarrays e WES.

	CAKUT (n=2,824)	Controls (n=21,498)
Males (%)	1618 (57.2%)	11103 (51.8%)
Ethnicity		
Asian	10 (0.4%)	897 (4.2%)
Black	169 (5.9%)	2336 (10.9%)
White	2537 (89.8%)	18116 (84.3%)
Other/More than one race	38 (1.3%)	118 (0.5%)
Unassigned/Unknown	70 (2.4%)	31 (0.1%)
CAKUT phenotypes		
Renal hypodysplasia	1,088 (38.5%)	-
Vesicoureteral reflux	660 (23.4%)	-
Obstructive uropathy	512 (18.1%)	-
Duplication of the ureter, pelvis and kidney	233 (8.3%)	-
Posterior urethral valves	141 (5.0%)	-
Horseshoe kidney and/or ectopic kidney	127 (4.5%)	-
Other lower urinary tract malformations	63 (2.2%)	-
Complex CAKUT (%)	738 (26.1%)	-
Extra-renal anomalies (%)	570 (20.2%)	-
Family history of CAKUT (%)	413 (14.8%)	-

Fig.10 Caratteristiche dei pazienti affetti da CAKUT analizzati nello studio internazionale e della coorte di controllo

Center	City
Nefrologia, Dialisi e Trapianto IRCCS Gaslini, Genova	Genova
Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliero Universitaria Sant'Orsola-Malpighi, Bologna	Bologna
Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto, Ospedale Universitario di Padova, Padova	Padova
Nefrologia e Dialisi, Ospedale pediatrico Santobono, Napoli	Napoli
Dipartimento della donna e del bambino, e della chirurgia generale e specialistica, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli	Napoli
Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Università di Milano, Milano	Milano
Nefrologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Regina Margherita, Torino	Torino
Nefrologia, Università di Parma, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Parma	Parma
Divisione di Pediatria, Dipartimento della Vita e delle Scienze della Riproduzione, Università di Verona, Verona	Verona
Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedali Riuniti, Ancona	Ancona
Nefrologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico 'G. Di Cristina', A.R.N.A.S. 'Givico', Palermo	Palermo
Unità di Nefrologia pediatrica e Reumatologia, Università di Messina	Messina
Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale St Orsola, Università di Bologna, Bologna	Bologna
Nefrologia, Ospedale Universitario di Verona, Verona	Verona
Nefrologia e Trapianto, Università del Piemonte dell'Est, Novara	Novara
Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Trieste, Trieste	Trieste
Università di Milano, Milano; Ospedale Maggiore-Policlinico, Milano	Milano
Nefrologia e Dialisi Pediatrica, Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, Azienda Ospedaliero-Universitaria Consorziale Policlinico, Bari	Bari
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Foggia, Foggia	Foggia
SC di Pediatria, Ospedale Fatebenefratelli, Milano	Milano
Clinica Nefrologica e Dialisi, Università di Chieti-Pescara, Chieti	Chieti-Pescara
Dialisi e Trapianto Policlinico, IRCCS Fondazione San Matteo e Università di Pavia, Pavia	Pavia
Cattedra di Nefrologia, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli	Napoli
Urologia e Nefrologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera G. Brotzu - Cagliari	Cagliari
Istituto di Tecnologie Biomedicali, Centro di Ricerca Nazionale (ITB-CNR), Segrate-Milano	Milano
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Messina AOU G. Martino, Messina	Messina
Centro Regionale Trapianti, Piemonte, Ospedale Molinette, Torino	Torino
Divisione di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Università di Bari, Bari	Bari
Divisione di Nefrologia, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia, Ospedale di Montichiari, Università di Brescia, Brescia	Brescia
Divisione di Chirurgia Pediatrica, Università D'Annunzio e Ospedale dello Spirito Santo, Chieti-Pescara	Chieti-Pescara
Unità di Chirurgia Pediatrica, IRCCS Gaslini, Genova	Genova
Divisione di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Policlinico di Modena	Modena

Tab.7 Centri Nefrologici e Urologici attualmente coinvolti nel gruppo di studio italiano sulle malformazioni dei reni e delle vie urinarie

Future directions

Ci aspettiamo di arruolare 5000 casi di CAKUT nei prossimi 4 anni. La caratterizzazione clinica e fenotipica approfondita permetterà una classificazione anatomica precisa. I dati genetici verranno utilizzati per guidare la fenotipizzazione approfondita (studi di imaging di ultima generazione quali la risonanza magnetica 3T, i test metabolici, i test neurologici, ecc). Il disegno di studio longitudinale permetterà l'identificazione di fattori prognostici genetici e non-genetici. E' infatti noto come il CAKUT sia responsabile di circa il 10% e il 50% dei casi di insufficienza renale terminale rispettivamente nell'adulto e nel bambino[46, 49]. Tuttavia la classificazione anatomica non permette di predire chi evolverà verso il danno renale nel corso della vita[27, 47]. Spesso i casi diagnosticati e seguiti in età pediatrica vengono inoltre persi al follow-up in età adulta e la malattia renale decorre in maniera subdola con danni documentati sul paziente[159]. Il gruppo di studio costruito a ponte tra le nefrologie pediatriche e quelle dell'adulto avvierà un programma di transizione (inteso come un processo che comporta tentativi pianificati per preparare il paziente pediatrico a muoversi verso l'autogestione delle cure nei centri adulti[160]) al termine del quale si arriverà al trasferimento del paziente nel centro adulto (dove per trasferimento si intende un evento che avviene al termine della transizione e che si manifesta in un tentativo concreto di preparare il giovane paziente con una condizione cronica ad accettare le responsabilità per la gestione della sua malattia[161, 162]). Consensi internazionali sulla gestione del passaggio dai servizi nefrologici da pediatrici a adulti sono stati redatti dalle principali associazioni di nefrologia pediatrica e sul tema della transizione è stato posto

un focus durante una delle ultime giornate dedicate alla prevenzione delle malattie renali[162, 163].

Tuttavia nessun protocollo *ad hoc* costruito sulle singole patologie è ad oggi disponibile.

Lo studio è disegnato per cambiare la pratica clinica e introdurre i test genetici, metodi di fenotipizzazione fenotipica e nuovi tools di supporto omogenei sul territorio nazionale.

Imaging studies in CAKUT

Il lavoro radiologico mira all'introduzione di nuove tecniche radiologiche nella pratica clinica in soggetti portatori di anomalie dei reni e delle vie urinarie.

La nuova tecnica di risonanza magnetica urologica funzionale (uro-RM funzionale) è stata validata per lo studio dell'uropatia ostruttiva rispetto al gold standard della scintigrafia con Mag3 in 52 casi di soggetti affetti da uropatia ostruttiva congenita del rene. Il lavoro radiologico ha portato successivamente all'applicazione di un totale di 372 uro-RM pediatriche con la nuova tecnica funzionale.

Materiali e Metodi

600 casi di CAKUT che hanno avuto accesso presso la Nefrologia dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova sono stati caratterizzati anatomicamente mediante tecniche di imaging tradizionali quali l'ecografia dei reni e delle vie urinarie e altre indagini laddove raccomandato secondo le vigenti linee guida della European Society of Pediatric Urology. I casi idonei sono stati reclutati mediante firma di un consenso informato per studio genetico.

52 soggetti affetti da uropatia ostruttiva sono stati sottoposti a scintigrafia renale con mercaptoacetiltriglicina (Mag3) per valutare il livello di ostruzione e successivamente a uro-RM funzionale.

L'intervallo di tempo tra lo studio tradizionale con scintigrafia e l'uro-RMN sul medesimo paziente è stato di massimo sei mesi. La RM funzionale renale si basa su due sequenze. La prima definita single shot coronale T2 a GAP zero che mediante l'utilizzo di un software dedicato permette di ricostruire il volume

renale. La seconda sequenza detta GRE 3D T1 pesato, viene acquisita dopo la somministrazione di mezzo di contrasto (gadolinio 0.01 mmol/ μ g) e della durata di 15-16 minuti con acquisizione temporale ogni 5 secondi per i primi 5 minuti e ogni minuto nei successivi 10-12 minuti. Mediante questa seconda sequenza è possibile valutare: 1) la split renal function (SRF) mediante due metodi: il primo è il calcolo dell'area sotto la curva (AUC) ricavata posizionando una ROI sul parenchima; il secondo, il Patlak, calcolato posizionando una ROI sull'aorta e valutando in maniera integrata la dinamica del mezzo di contrasto a livello aortico e renale; 2) la curva renografica al pari della scintigrafia che evidenzia tre pattern di curva: renale, borderline e in accumulo (Fig. 11)

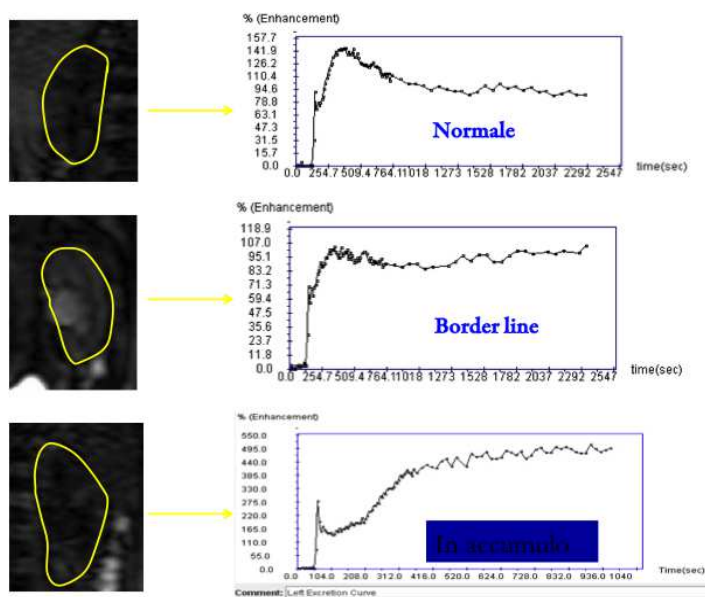


Fig.11 Pattern di curve renografiche: normale, borderline e in accumulo

Le curve scintigrafiche sono state valutate da un unico medico di Medicina Nucleare con doppia lettura.

Le curve di uro-RM sono state interpretate da due medici radiologi in doppia lettura ciascuna.

Lo studio valida la tecnica di uro-RM valutando la riproducibilità intra-reader e inta-reader delle curve e la sovrapposizione dei risultati tra le due tecniche. La coorte era costituita da 52 pazienti. La statistica è stata calcolata in base al totale degli emisistemi reni-ureteri destro e sinistro in fenotipi misti di CAKUT secondo quanto riportato nella tabella 8.

Fenotipi clinici studiati	
Lato destro	Lato sinistro
Normali 25	Normali 13
Stenosi del giunto pielo-ureterale 14	Stenosi del giunto pielo-ureterale 26
Megauretere stenotico 8	Megauretere stenotico 10
Stenosi ureterale (tratto medio) 1	Stenosi ureterale (tratto medio) 1
Altri 4	Altri 2

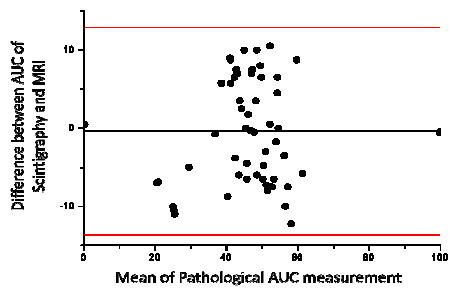
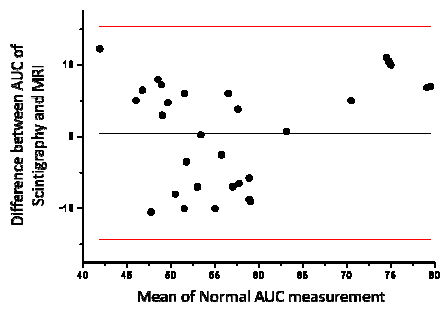
Tab.8 Ripartizione destra-sinistra dei 52 pazienti studiati per uropatia ostruttiva

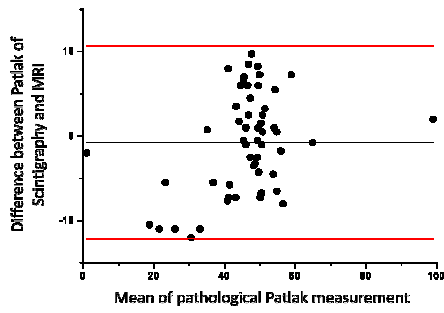
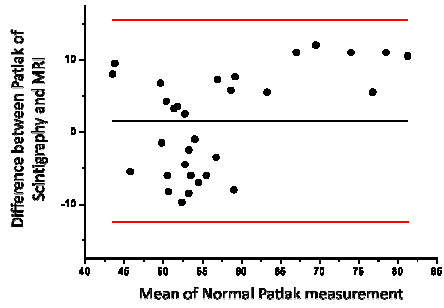
Dei 38 emisistemi normali studiati 32 curve sono risultate interpretabili e idonee. Dei 66 emisistemi patologici (ostruiti) studiati 56 sono risultati idonei. Una volta validata la tecnica in 52 casi è stata applicata in clinica in ulteriori 372 soggetti nel periodo compreso tra 01/01/2012 e il 30/06/2016 (dati non riportati nella presente tesi di dottorato).

Analisi statistica

La distribuzione normale dei dati è stata valutata mediante il test D'Agostino-Pearson. Il coefficiente di correlazione è stato usato per identificare la ripetibilità dell'interpretazione intra-reader del medesimo revisore e la riproducibilità inter-reader tra i due revisori per tutti i parametri considerati. Il test non parametrico di Friedmand per campioni accoppiati e il test di Kruskall-Wallis per campioni non accoppiati sono stati usati rispettivamente per stabilire le differenze dei parametri della AUC o del Patlak sulle tecniche replicate e i metodi. Bland-Altman plot è stato utilizzato per visualizzare le corrispondenze tra le due tecniche. I limiti delle corrispondenze sono stati calcolati usando una media di ± 1.96 x deviazione standard e il loro intervallo di confidenza (CI). Una tavola di contingenza è stata usata per determinare la capacità della uro-RM di stabilire l'outcome della capacità escretoria renale in confronto alla scintigrafia Mag3. Abbiamo utilizzato come riferimento i valori determinati dalle medie delle scintigrafie. L'efficacia diagnostica (intesa come proporzione di pazienti correttamente categorizzati mediante l'uro-RM) e il rate di mis-classificazione (ossia la proporzione di pazienti che erano stati classificati in maniera scorretta tramite uro-RM) sono stati calcolati dalla tavola. Nello studio statistico il valore significativo della p è stato considerato < 0.05 per le due code. Tutta l'analisi è stata effettuata mediante R software.

		AUC%	Ptk%
RMI Intraobserver - reviewer 1	R^2	0.61	0.63
RMI Intraobserver - reviewer 2	R^2	0.80	0.82
Scintigraphy - Intraobserver	R^2	0.98	0.94
Interobserver			
Scintigraphy vs RMI	R^2	0.67	0.72
Scintigraphy vs RMI	P	0.92	0.96





	Scintigraphy	MRI		
		Normal	Borderline	Accumulation
Normal				
Normal	28	27	1	
Borderline	4	3	1	
Accumulation				
P	0.67			

	Scintigraphy	MRI		
		Normal	Borderline	Accumulation
Pathological				
Normal	7	6	1	
Borderline	26	2	19	5
Accumulation	23		14	9
P	0.19			

normal kidney = 28
 normal kidney with both secretion evaluation = 22
 kidney with uropaty = 56
 kidney with uropaty and both excretion evaluation = 56

Risultati

1. Riproducibilità intra-reader. Per ogni lettore, l'alto coefficiente di correlazione indica un'eccellente ripetibilità intra-reader per la lettura delle misure della AUC e per il Patlak. Il metodo scintigrafico ha un più alto coefficiente di correlazione rispetto al metodo uro-RM per la determinazione del medesimo parametro. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella comparazione dei valori delle tecniche una volta ripetute.

2. Riproducibilità inter-reader. Il coefficiente di relazione ottenuto tra i due metodi per ogni parametro indica una buona riproducibilità inter-reader. Inoltre, nessuna differenza significativa è stata determinata quando sono stati comparati i risultati dei due metodi

3. Bias analysis. I due metodi dimostrano una buona concordanza tra le misure dei parametri della AUC e della Patlak. La differenza media, i loro limiti di agreement e l'intervallo di confidenza sono stati descritti nel plot di Bland-Altman il quale indica che entrambi i metodi hanno buona corrispondenza. Nessuna differenza di corrispondenza è stata dimostrata sulla base dei parametri considerati. L'efficienza diagnostica e la proporzione di mis-classification e per l'uro-RM nella valutazione della funzione della escrezione renale sono risultate idonee. Nessuna delle valutazioni di outcome ha mostrato variazioni significative tra la scintigrafia Mag3 e la uro-RM. La capacità della uro-RM nel determinare l'escrezione normale è più accurata rispetto alle condizioni patologiche. I risultati globalmente mostrano una minima discrepanza tra le due tecniche ma non significativa. Mediante questo studio pilota abbiamo quindi validato la lettura della tecnica di uro-RM. Resta da stabilire il valore predittivo positivo della metodica nei

casi ostruiti e borderline mediante correlazione anatomica da effettuarsi retrospettivamente con l'analisi dei report chirurgici degli stessi pazienti quando sottoposti ad intervento (coorte in corso di analisi costituita da 372 casi, dati non riportati).

DISCUSSIONE

La nefrogenesi richiede una sequenza complessa di segnali tra due progenitori mesenchimali: il mesenchima metanefrico e la gemma ureterale[64]. In maniera concorde alla complessa cascata di segnali coinvolti in questi processi, sono stati identificate diverse lesioni genetiche risultanti in difetti dello sviluppo renale. I risultati ottenuti con il presente studio mostrano una significativa eterogeneità genetica che non era stato possibile riscontrare con la sola valutazione clinica del paziente e, inoltre, molti dei difetti trovati ricadono al di sotto della risoluzione delle tecniche standard di citogenetica indicando che i metodi di genomica ad alta risoluzione sono necessari per identificare l'eziologia specifica dei pazienti affetti da CAKUT nella popolazione generale.

Diversa significatività è stata riscontrata nei sottotipi e i pazienti affetti da RHD, forma malformativa con peggior morbilità e mortalità tra i CAKUT, sono risultati portatori di difetti di taglia maggiore rispetto alle altre categorie coerentemente con il concetto di dosaggio genico. La presenza di differente livello di significatività nei vari sottotipi conferma come lo squilibrio genomico giochi un ruolo principe in questi disordini, e di come una differente architettura genetica sia alla base dell'ampia gamma fenotipica in queste malformazioni.

Una buona percentuale di casi è risultata essere affetta da sindromi note (in particolare la Sindrome di DiGeorge-Velocardiofaciale e renal cysts and diabetes, RCAD) principalmente associate a casi di RHD a conferma dei dati già descritti, tuttavia non diagnosticate con la sola valutazione clinica.

L'applicazione delle tecniche di analisi basate sul microarray per ricercare anomalie cromosomiche quantitative ha permesso di identificare *imbalance* cromosomici che sottendono a fenotipi di CAKUT spesso sovrapponibili da un punto di vista clinico che tuttavia mostrano diversi outcome[39] e che si associano a differente potenziale rischio di sviluppo di patologie associate. Concetto questo ancora più applicabile nel caso del solo gruppo dei CAKUT dove l'anomalia è diagnosticabile sempre di più in fase prenatale grazie al miglioramento delle tecniche ecotomografiche di screening, e può fungere da sentinella per la diagnosi precoce di ulteriori patologie note per essere ad essa associate come quelle legate allo sviluppo del sistema nervoso centrale.

L'applicazione di queste nuove tecnologie basate sul microarray riveste un ruolo di alto impatto nella diagnostica renale. Le limitazioni si associavano fino a ora all'elevato costo delle tecniche che tuttavia stanno mostrando una rapida riduzione e risulteranno presto più accessibili. L'ostacolo principale per l'utilizzo in maniera idonea di queste tecnologie risiede ad oggi nella capacità di effettuare controlli di qualità, analisi e interpretazione dei dati su larga scala in maniera appropriata, specie nell'ottica del futuro prossimo aumento dei genomi sequenziati e del conseguente maggior numero di geni associati a suscettibilità per una data malattia in presenza di CAKUT.

La Nefrologia è una disciplina per molti versi di nuova leva nella diagnostica molecolare legata alle tecnologie di microarray, e solo una piccola percentuale di Nefrologi clinici è attualmente pronto a applicare la Medicina Personalizzata nei suoi pazienti. Questo limita la possibilità di fornire un counseling

genetico adeguato ai pazienti e alle famiglie, basato sulla corretta interpretazione dei risultati ottenuti in laboratori correlate al caso clinico in studio.

E' necessario proseguire nel reclutamento e nell'analisi di pazienti adulti e pediatrici affetti da CAKUT: una più ampia casistica permetterà l'identificazione di disordini renali associati a perdita o acquisizione di materiale cromosomico e parteciperà a implementare la conoscenza dello sviluppo dei reni e delle vie urinarie nell'Uomo.

I risultati di genetica molecolare sono attualmente applicabili in clinica ad un programma di medicina personalizzata. Il gruppo di studio nazionale *Precision in CAKUT* offre per la prima volta la possibilità di applicare questa nuova metodologia in ambito Nefrologico in maniera coordinata e omogenea sul territorio nazionale.

L'avvio di studi long-time a ponte tra le Nefrologie Pediatriche e le Nefrologie dell'adulto di pazienti sottoposti a caratterizzazione genotipo-fenotipo uniforme sul territorio nazionale permetterà di descrivere fattori prognostici ad oggi non disponibili sulla base della sola classificazione anatomica.

I centri Nefrologici dell'adulto quando si ritrovano a gestire pazienti con complicanze renali e extra-renali secondarie al CAKUT hanno in genere maggiori difficoltà gestionale data dalla minor confidenza in patologie ereditarie storicamente gestite da Nefrologi e Urologi pediatri (dato documentato indirettamente dalla mancanza di letteratura sul follow-up a lungo termine nel CAKUT[39, 47]). Lo studio permetterà di colmare queste lacune e servirà da modello per ulteriori patologie Nefrologiche.

BIBLIOGRAFIA

1. A, F., *Medical Education in the United States and Canada: A report to the Carnegie Foundation for the Advancement of teaching*. Boston: Mass, 1910.
2. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
3. Tugwell, P., *Evidence-based medicine. A new approach to teaching the practice of medicine*. JAMA, 1992. **268**((17)): p. 2420-2425.
4. Whitcomb, D.C., *What is personalized medicine and what should it replace?* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(7): p. 418-24.
5. Reardon, S., *Fast genetic sequencing saves newborn lives*. Nature, 2014. **514**(7520): p. 13-4.
6. Iglesias A, e.a., *The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice*. Genet. Med., 2014, Dec. **16**(12): p. 922-31.
7. Saunders CJ, e.a., *Rapid whole-exome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units*. Sci. Trans. Med., 2012 OCT. **4**(154): p. 154-135.
8. S., R., *Fast genetic sequencing saves newborn lives*. Nature, 2014 Oct. **514**(7520): p. 14-4.
9. Tomasetti C, e.a., *Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*. Science 2015 Jan. **2**(347): p. (6217).
10. JS, d.B., *Translating cancer research into targeted therapeutics*. Nature, 2010 Sep. **30**(467(7315)): p. 543-9.
11. Sawyers CL, e.a., *Imatinib induces hematologic and cyogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study*. Blood, 2002. **99**: p. 3530-3539.
12. Snyder A, e.a., *Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blokade in melanoma*. N Engl J Med, 2014 Dec. **371**((23)): p. 2189-99.
13. Iglesias, C.G., et al., *Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980*. Am J Kidney Dis, 1983. **2**(6): p. 630-9.
14. Gee, H.Y., et al., *Whole-exome resequencing distinguishes cystic kidney diseases from phenocopies in renal ciliopathies*. Kidney Int, 2014. **85**(4): p. 880-7.
15. Ashkinadze, E., et al., *Combining fetal sonography with genetic and allele pathogenicity studies to secure a neonatal diagnosis of Bardet-Biedl syndrome*. Clin Genet, 2013. **83**(6): p. 553-9.
16. Boyden, L.M., et al., *Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities*. Nature, 2012. **482**(7383): p. 98-102.
17. Lipska, B.S., et al., *Genetic screening in adolescents with steroid-resistant nephrotic syndrome*. Kidney Int, 2013. **84**(1): p. 206-13.
18. Kiryluk, K., et al., *Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens*. Nat Genet, 2014. **46**(11): p. 1187-96.
19. Bu, F., et al., *Comprehensive genetic analysis of complement and coagulation genes in atypical hemolytic uremic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(1): p. 55-64.
20. Legendre, C.M., et al., *Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome*. N Engl J Med, 2013. **368**(23): p. 2169-81.
21. Sathananthan, A. and A. Vella, *Personalized pharmacotherapy for Type 2 diabetes mellitus*. Per Med, 2009. **6**(4): p. 417-422.
22. Magnasco, A., et al., *Rituximab in children with resistant idiopathic nephrotic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(6): p. 1117-24.
23. Ji, W., et al., *Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 592-9.

24. Noris, M. and G. Remuzzi, *Managing and preventing atypical hemolytic uremic syndrome recurrence after kidney transplantation*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013. **22**(6): p. 704-12.
25. Sanna-Cherchi, S., et al., *Mutations in DSTYK and dominant urinary tract malformations*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(7): p. 621-9.
26. Zhao, X., et al., *Molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease: utility and limitations*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. **3**(1): p. 146-52.
27. Westland, R., et al., *Renal injury in children with a solitary functioning kidney--the KIMONO study*. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(5): p. 1533-41.
28. Loane, M., et al., *Paper 4: EUROCAT statistical monitoring: identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies in Europe*. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2011. **91 Suppl 1**: p. S31-43.
29. Eccles, M.R. and L.A. Schimmenti, *Renal-coloboma syndrome: a multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations*. *Clin Genet*, 1999. **56**(1): p. 1-9.
30. Mefford, H.C., et al., *Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(5): p. 1057-69.
31. Ulinski, T., et al., *Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(2): p. 497-503.
32. Sanna-Cherchi, S., et al., *Localization of a gene for nonsyndromic renal hypodysplasia to chromosome 1p32-33*. *Am J Hum Genet*, 2007. **80**(3): p. 539-49.
33. Garne, E., et al., *EUROCAT website data on prenatal detection rates of congenital anomalies*. *J Med Screen*. **17**(2): p. 97-8.
34. *Birth Defects Monitoring Program (BDMP)/Commission on Professional and Hospital Activities (CPHA) surveillance data, 1988-1991*. *Teratology*, 1993. **48**(6): p. 658-75.
35. *Metropolitan Atlanta Congenital Defects Program surveillance data, 1988-1991*. *Teratology*, 1993. **48**(6): p. 695-709.
36. Schulman, J., et al., *Surveillance for and comparison of birth defect prevalences in two geographic areas--United States, 1983-88*. *MMWR CDC Surveill Summ*, 1993. **42**(1): p. 1-7.
37. Thom, R.P. and N.D. Rosenblum, *A translational approach to congenital non-obstructive hydronephrosis*. *Pediatr Nephrol*, 2013. **28**(9): p. 1757-61.
38. Dudley, J.A., et al., *Clinical relevance and implications of antenatal hydronephrosis*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1997. **76**(1): p. F31-4.
39. Westland, R., et al., *Clinical implications of the solitary functioning kidney*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014. **9**(5): p. 978-86.
40. Cheng, A.M., et al., *Outcome of isolated antenatal hydronephrosis*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2004. **158**(1): p. 38-40.
41. Schreuder, M.F., R. Westland, and J.A. van Wijk, *Unilateral multicystic dysplastic kidney: a meta-analysis of observational studies on the incidence, associated urinary tract malformations and the contralateral kidney*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(6): p. 1810-8.
42. Wikstad, I., et al., *Kidney function in adults born with unilateral renal agenesis or nephrectomized in childhood*. *Pediatr Nephrol*, 1988. **2**(2): p. 177-82.
43. Abou Jaoude, P., et al., *Congenital versus acquired solitary kidney: is the difference relevant?* *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(7): p. 2188-94.
44. Dursun, H., et al., *Ambulatory blood pressure monitoring and renal functions in children with a solitary kidney*. *Pediatr Nephrol*, 2007. **22**(4): p. 559-64.
45. *State-specific trends in chronic kidney failure--United States, 1990-2001*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2004. **53**(39): p. 918-20.
46. Ardissino, G., et al., *Epidemiology of chronic renal failure in children: data from the Italkid project*. *Pediatrics*, 2003. **111**(4 Pt 1): p. e382-7.

47. Sanna-Cherchi, S., et al., *Renal outcome in patients with congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. *Kidney Int*, 2009. **76**(5): p. 528-33.
48. Corbani, V., G.M. Ghiggeri, and S. Sanna-Cherchi, '*Congenital solitary functioning kidneys: which ones warrant follow-up into adult life?*'. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(5): p. 1458-60.
49. Collins, A.J., et al., *US Renal Data System 2012 Annual Data Report*. *Am J Kidney Dis*, 2013. **61**(1 Suppl 1): p. A7, e1-476.
50. McDonald, S.P., et al., *Long-term survival of children with end-stage renal disease*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(26): p. 2654-62.
51. Ichikawa, I., et al., *Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT*. *Kidney Int*, 2002. **61**(3): p. 889-98.
52. Nakanishi, K. and N. Yoshikawa, *Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)*. *Pediatr Int*, 2003. **45**(5): p. 610-6.
53. Pope, J.C.t., et al., *How they begin and how they end: classic and new theories for the development and deterioration of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(9): p. 2018-28.
54. Vats, A.N., et al., *Steroid-resistant nephrotic syndrome and congenital anomalies of kidneys: evidence of locus on chromosome 13q*. *Kidney Int*, 2003. **64**(1): p. 17-24.
55. Goodyer, P.R., *Renal dysplasia/hypoplasia*, in *Pediatric nephrology*, 5th ed., E.D. Avner, W.E. Harmon, and P. Niaudet, Editors. 2004, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia p. 83-91.
56. Sanna-Cherchi, S., et al., *Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia*. *Pediatr Nephrol*, 2007. **22**(10): p. 1675-84.
57. Fletcher, J., et al., *Multicystic dysplastic kidney and variable phenotype in a family with a novel deletion mutation of PAX2*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(9): p. 2754-61.
58. Nishimoto, K., et al., *PAX2 gene mutation in a family with isolated renal hypoplasia*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(8): p. 1769-72.
59. Weber, S., et al., *Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(10): p. 2864-70.
60. Yoshida, J., et al., *Mass screening for early detection of congenital kidney and urinary tract abnormalities in infancy*. *Pediatr Int*, 2003. **45**(2): p. 142-9.
61. Grobstein, C., *Inductive epitheliomesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse*. *Science*, 1953. **118**(3054): p. 52-5.
62. Costantini, F. and R. Kopan, *Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development*. *Dev Cell*, 2010. **18**(5): p. 698-712.
63. Dressler, G.R., *The cellular basis of kidney development*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. **22**: p. 509-29.
64. Schedl, A., *Renal abnormalities and their developmental origin*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(10): p. 791-802.
65. Vainio, S. and Y. Lin, *Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(7): p. 533-43.
66. Bates, C.M., *Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **301**(2): p. F245-51.
67. Chen, F., *Genetic and developmental basis for urinary tract obstruction*. *Pediatr Nephrol*, 2009. **24**(9): p. 1621-32.
68. Drummond, I.A. and A.J. Davidson, *Zebrafish kidney development*. *Methods in cell biology*, 2010. **100**: p. 233-60.
69. Woolf, A.S., et al., *Evolving concepts in human renal dysplasia*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(4): p. 998-1007.

70. Woolf, A.S. and P.J. Winyard, *Advances in the cell biology and genetics of human kidney malformations*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(6): p. 1114-25.
71. Woolf, A.S. and P.J. Winyard, *Molecular mechanisms of human embryogenesis: developmental pathogenesis of renal tract malformations*. Pediatr Dev Pathol, 2002. **5**(2): p. 108-29.
72. Airik, R. and A. Kispert, *Down the tube of obstructive nephropathies: the importance of tissue interactions during ureter development*. Kidney Int, 2007. **72**(12): p. 1459-67.
73. Little, M.H. and A.P. McMahon, *Mammalian kidney development: principles, progress, and projections*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(5).
74. Pulkkinen, K., S. Murugan, and S. Vainio, *Wnt signaling in kidney development and disease*. Organogenesis, 2008. **4**(2): p. 55-9.
75. Manolio, T.A., et al., *Finding the missing heritability of complex diseases*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 747-53.
76. McCarroll, S.A., et al., *Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation*. Nat Genet, 2008. **40**(10): p. 1166-74.
77. Itsara, A., et al., *De novo rates and selection of large copy number variation*. Genome Res, 2010. **20**(11): p. 1469-81.
78. Sanna-Cherchi, S., et al., *Familial vesicoureteral reflux: testing replication of linkage in seven new multigenerational kindreds*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(6): p. 1781-7.
79. Peters, P.C., D.E. Johnson, and J.H. Jackson, Jr., *The incidence of vesicoureteral reflux in the premature child*. J Urol, 1967. **97**(2): p. 259-60.
80. Scott, J.E., et al., *Screening of newborn babies for familial ureteric reflux*. Lancet, 1997. **350**(9075): p. 396-400.
81. Weng, P.L., et al., *A recessive gene for primary vesicoureteral reflux maps to chromosome 12p11-q13*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(7): p. 1633-40.
82. Privett, J.T., W.D. Jeans, and J. Roylance, *The incidence and importance of renal duplication*. Clin Radiol, 1976. **27**(4): p. 521-30.
83. Hartman, G.W. and C.J. Hodson, *The duplex kidney and related abnormalities*. Clin Radiol, 1969. **20**(4): p. 387-400.
84. Conrad, D.F., et al., *Origins and functional impact of copy number variation in the human genome*. Nature. **464**(7289): p. 704-12.
85. Sebat, J., et al., *Large-scale copy number polymorphism in the human genome*. Science, 2004. **305**(5683): p. 525-8.
86. Redon, R., et al., *Global variation in copy number in the human genome*. Nature, 2006. **444**(7118): p. 444-54.
87. Iafrate, A.J., et al., *Detection of large-scale variation in the human genome*. Nat Genet, 2004. **36**(9): p. 949-51.
88. Cooper, G.M., et al., *A copy number variation morbidity map of developmental delay*. Nat Genet. **43**(9): p. 838-46.
89. Greenway, S.C., et al., *De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot*. Nat Genet, 2009. **41**(8): p. 931-5.
90. Osoegawa, K., et al., *Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation*. J Med Genet, 2008. **45**(2): p. 81-6.
91. Serra-Juhe, C., et al., *Contribution of rare copy number variants to isolated human malformations*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e45530.
92. Brunetti-Pierri, N., et al., *Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1466-71.

93. Sanders, S.J., et al., *Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism*. *Neuron*, 2011. **70**(5): p. 863-85.
94. Sebat, J., et al., *Strong association of de novo copy number mutations with autism*. *Science*, 2007. **316**(5823): p. 445-9.
95. Stefansson, H., et al., *Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia*. *Nature*, 2008. **455**(7210): p. 232-6.
96. Lupski, J.R., *Genomic rearrangements and sporadic disease*. *Nat Genet*, 2007. **39**(7 Suppl): p. S43-7.
97. Lee, J.A., C.M. Carvalho, and J.R. Lupski, *A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders*. *Cell*, 2007. **131**(7): p. 1235-47.
98. Groenen, P.M., et al., *Rearrangement of the human CDC5L gene by a t(6;19)(p21;q13.1) in a patient with multicystic renal dysplasia*. *Genomics*, 1998. **49**(2): p. 218-29.
99. Ogata, T., et al., *Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26*. *Kidney Int*, 2000. **58**(6): p. 2281-90.
100. Vats, K.R., et al., *A locus for renal malformations including vesico-ureteric reflux on chromosome 13q33-34*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(4): p. 1158-67.
101. Shprintzen, R.J., *Velocardiofacial syndrome and DiGeorge sequence*. *J Med Genet*, 1994. **31**(5): p. 423-4.
102. Burtey, S., *22q11.2 microdeletion syndrome is a common cause of renal tract malformations*. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2008. **4**(8): p. E1.
103. Decramer, S., et al., *Anomalies of the TCF2 gene are the main cause of fetal bilateral hyperechogenic kidneys*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(3): p. 923-33.
104. Bellanne-Chantelot, C., et al., *Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5*. *Diabetes*, 2005. **54**(11): p. 3126-32.
105. Weber, S., et al., *Mapping candidate regions and genes for congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT) by array-based comparative genomic hybridization*. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(1): p. 136-43.
106. Sanna-Cherchi, S., et al., *Copy-number disorders are a common cause of congenital kidney malformations*. *Am J Hum Genet*, 2012. **91**(6): p. 987-97.
107. Verbitsky, M., et al., *Genomic imbalances in pediatric patients with chronic kidney disease*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(5): p. 2171-8.
108. Westland, R., et al., *Copy number variation analysis identifies novel CAKUT candidate genes in children with a solitary functioning kidney*. *Kidney Int*, 2015. **88**(6): p. 1402-1410.
109. Thomas, R., et al., *HNF1B and PAX2 mutations are a common cause of renal hypodysplasia in the CKiD cohort*. *Pediatr Nephrol*, 2011. **26**(6): p. 897-903.
110. Madariaga, L., et al., *Severe prenatal renal anomalies associated with mutations in HNF1B or PAX2 genes*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013. **8**(7): p. 1179-87.
111. Hoskins, B.E., et al., *Missense mutations in EYA1 and TCF2 are a rare cause of urinary tract malformations*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. **23**(2): p. 777-9.
112. Heidet, L., et al., *Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. **5**(6): p. 1079-90.
113. Sanna-Cherchi, S., et al., *Mutations in DSTYK and Dominant Urinary Tract Malformations*. *N Engl J Med*, 2013.
114. Abe, G., H. Ide, and K. Tamura, *Function of FGF signaling in the developmental process of the median fin fold in zebrafish*. *Dev Biol*, 2007. **304**(1): p. 355-66.
115. Griffin, K.J. and D. Kimelman, *Interplay between FGF, one-eyed pinhead, and T-box transcription factors during zebrafish posterior development*. *Dev Biol*, 2003. **264**(2): p. 456-66.

116. Nissen, R.M., et al., *Zebrafish foxi one modulates cellular responses to Fgf signaling required for the integrity of ear and jaw patterning*. *Development*, 2003. **130**(11): p. 2543-54.
117. Gribouval, O., et al., *Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis*. *Nat Genet*, 2005. **37**(9): p. 964-8.
118. Weber, S., et al., *Muscarinic Acetylcholine Receptor M3 Mutation Causes Urinary Bladder Disease and a Prune-Belly-like Syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2011. **89**(5): p. 668-74.
119. Matsui, M., et al., *Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(17): p. 9579-84.
120. Barak, H., et al., *FGF9 and FGF20 maintain the stemness of nephron progenitors in mice and man*. *Dev Cell*, 2012. **22**(6): p. 1191-207.
121. Saisawat, P., et al., *Whole-exome resequencing reveals recessive mutations in TRAP1 in individuals with CAKUT and VACTERL association*. *Kidney Int*, 2013.
122. Zaghoul, N.A. and N. Katsanis, *Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(3): p. 428-37.
123. Badano, J.L., et al., *Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome*. *Nature*, 2006. **439**(7074): p. 326-30.
124. Beales, P.L., et al., *New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey*. *J Med Genet*, 1999. **36**(6): p. 437-46.
125. Zaghoul, N.A., et al., *Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(23): p. 10602-7.
126. Katsanis, N., *The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13 Spec No 1**: p. R65-71.
127. Beales, P.L., et al., *Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(5): p. 1187-99.
128. Bergmann, C., et al., *Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(11): p. 2047-56.
129. Girirajan, S., et al., *Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(14): p. 1321-31.
130. Moreno-De-Luca, D., et al., *Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia*. *Am J Hum Genet*, 2010. **87**(5): p. 618-30.
131. Klintwall, L., S. Eldevik, and S. Eikeseth, *Narrowing the gap: Effects of intervention on developmental trajectories in autism*. *Autism*, 2013.
132. Lopez-Rivera, E., et al., *Genetic Drivers of Kidney Defects in the DiGeorge Syndrome*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(8): p. 742-754.
133. Verbitsky, M., et al., *Genomic imbalances in pediatric patients with chronic kidney disease*. *J Clin Invest*, 2015.
134. Wang, K., et al., *PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data*. *Genome Res*, 2007. **17**(11): p. 1665-74.
135. Cooper, G.M., et al., *A copy number variation morbidity map of developmental delay*. *Nat Genet*, 2011. **43**(9): p. 838-46.
136. Silversides, C.K., et al., *Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(8): p. e1002843.
137. Huang, N., et al., *Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(10): p. e1001154.

138. Petrovski, S., et al., *Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes*. PLoS Genet, 2013. **9**(8): p. e1003709.
139. Burn, J. and J. Goodship, *Developmental genetics of the heart*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(3): p. 322-5.
140. Robin, N.H. and R.J. Shprintzen, *Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2*. J Pediatr, 2005. **147**(1): p. 90-6.
141. Dupont, C., et al., *Prenatal diagnosis of 24 cases of microduplication 22q11.2: an investigation of phenotype-genotype correlations*. Prenat Diagn, 2015. **35**(1): p. 35-43.
142. Shaikh, T.H., et al., *Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 489-501.
143. Burnside, R.D., *22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features*. Cytogenet Genome Res, 2015. **146**(2): p. 89-99.
144. Yagi, H., et al., *Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome*. Lancet, 2003. **362**(9393): p. 1366-73.
145. Vivante, A., et al., *Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans*. Pediatr Nephrol, 2014. **29**(4): p. 695-704.
146. Clissold, R.L., et al., *HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(2): p. 102-12.
147. Parsa, C.F., M.F. Goldberg, and D.G. Hunter, *Papillorenal ("renal coloboma") syndrome*. Am J Ophthalmol, 2002. **134**(2): p. 300-1; author reply 301.
148. Barua, M., et al., *Mutations in PAX2 associate with adult-onset FSGS*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(9): p. 1942-53.
149. Chang, E.H., et al., *Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences*. Hum Mutat, 2004. **23**(6): p. 582-9.
150. Legius, E., J.P. Fryns, and H. Van den Berghe, *Dominant branchial cleft syndrome with characteristics of both branchio-oto-renal and branchio-oculo-facial syndrome*. Clin Genet, 1990. **37**(5): p. 347-50.
151. Bingham, C., et al., *Atypical familial juvenile hyperuricemic nephropathy associated with a hepatocyte nuclear factor-1beta gene mutation*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1645-51.
152. Gilboa, Y., et al., *Prenatal diagnosis of 17q12 deletion syndrome: from fetal hyperechogenic kidneys to high risk for autism*. Prenat Diagn, 2016. **36**(11): p. 1027-1032.
153. Moreno-De-Luca, D., et al., *Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia*. Am J Hum Genet, 2010. **87**(5): p. 618-30.
154. Murphy, K.C., L.A. Jones, and M.J. Owen, *High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome*. Arch Gen Psychiatry, 1999. **56**(10): p. 940-5.
155. Mlynarski, E.E., et al., *Rare copy number variants and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome*. Hum Genet, 2016. **135**(3): p. 273-85.
156. Gao, S., et al., *TBX1 protein interactions and microRNA-96-5p regulation controls cell proliferation during craniofacial and dental development: implications for 22q11.2 deletion syndrome*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(8): p. 2330-48.
157. Dawson, G., et al., *Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: the Early Start Denver Model*. Pediatrics, 2010. **125**(1): p. e17-23.
158. Eack, S.M., et al., *Cognitive enhancement therapy for early-course schizophrenia: effects of a two-year randomized controlled trial*. Psychiatr Serv, 2009. **60**(11): p. 1468-76.
159. Holmberg, C. and H. Jalanko, *Long-term effects of paediatric kidney transplantation*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(5): p. 301-11.

160. Blum, R.W., et al., *Transition from child-centered to adult health-care systems for adolescents with chronic conditions. A position paper of the Society for Adolescent Medicine.* J Adolesc Health, 1993. **14**(7): p. 570-6.
161. Bell, L.E., et al., *Health care transition for adolescents with CKD-the journey from pediatric to adult care.* Adv Chronic Kidney Dis, 2011. **18**(5): p. 384-90.
162. Watson, A.R., et al., *Transition from pediatric to adult renal services: a consensus statement by the International Society of Nephrology (ISN) and the International Pediatric Nephrology Association (IPNA).* Kidney Int, 2011. **80**(7): p. 704-7.
163. Ingelfinger, J.R., K. Kalantar-Zadeh, and F. Schaefer, *World Kidney Day 2016: Averting the Legacy of Kidney Disease--Focus on Childhood.* Am J Kidney Dis, 2016. **67**(3): p. 349-54.

Genova, 19/07/2017





**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CICLO XXIX

Dr Monica Bodria

Relazione conclusiva dell'attività svolta nel corso del Dottorato di Ricerca

TRAINING E ESPERIENZA DI RICERCA

11/2015-11/2016 Post-doctoral Research Scientist presso il laboratorio di Nefrologia, Columbia University, College of Physicians & Surgeons, Department of Medicine, Division of Nephrology, New York, NY, USA sotto il coordinamento del dottor Krzysztof Kiryluk incentrato sullo studio delle malattie renali genetiche. Partecipazione ai seguenti corsi/seminari:

- 38th annual postgraduate medicine course Renal Biopsy in medical Disease of the Kidneys, 2015, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA.

- Precision Medicine Seminar Series (programma della durata di un anno) presso Irving Institute for clinical and translational research, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA

Il **20/05/2015** concluso il percorso di formazione specialistica e ottenuto il Diploma di Specializzazione in Nefrologia (SAS-5002 - Classe Medicina specialistica D.M: 1/8/2005) con votazione 50/50 e lode. Tesi di specializzazione dal titolo Medicina personalizzata nelle anomalie congenite del rene e delle vie urinarie: prima applicazione clinica in una coorte italiana.

2016 - oggi Nefrologo presso la Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Istituto Gaslini, Genova per i progetti:

- Precision in CAKUT: the Italian study group

- Joint Italian Ministry of Health and NIH Young Investigators Finalized Research 2012, Grant MSALRF DEL. 10/13 (244.000 Euro), PI Gian Marco Ghiggeri, PI estero Simone Sanna-Cherchi, Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): definition of genetic and structural backgrounds based on high through-put innovative approaches.

- Genetics of Human Renal Hypodysplasia, National Institute of Health, Grant R01DK080099 (525,000 \$), PI Gian Marco Ghiggeri, PI estero Ali Gharavi

ORGANIZZAZIONI PROFESSIONALI, SOCIETA', GRUPPI DI STUDIO

2010 - oggi membro di American Society of Nephrology (ASN)

2011 - 2015 membro di Società Italiana di Nefrologia (SIN)

2016 - oggi membro di Società Italiana di Nefrologia Pediatrica (SINePe)

2009 - oggi membro di *PodonNet. European research consortium to investigate diseases affecting podocyte*

2016 costruito e avviato il Gruppo di Studio all'interno di (SINePe)

2016 - oggi coordinatore del gruppo di studio italiano sulle malformazioni congenite dei reni e delle vie urinarie *Precision in CAKUT: the Italian study group*, all'interno di SINePe

2017 - oggi membro di *ERKnet. The European Rare Kidney Diseases Reference Network*

FINANZIAMENTI

A) Bando per progetti ricerca scientifica 2017, fondi destinati alla Regione Liguria, Compagnia San Paolo

Titolo del progetto: Screening di patologie del neurosviluppo in soggetti portatori di malformazioni dei reni e delle vie urinarie: test neuropsichiatrici e mappe neuronali con risonanza magnetica 3 Tesla.

PI: Dr Monica Bodria, Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Istituto Gaslini, Genova

In fase di valutazione

B) Telethon research project - 2017

Titolo del progetto: Precision Medicine in Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT): from structural variants discovery to clinical application

PI : Dr Gian Marco Ghiggeri, Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Istituto Gaslini, Genova

In fase di valutazione

C) Bando per la Ricerca Finalizzata 2016, Giovani Ricercatori, Ministero della Salute

Titolo del progetto: Medicine in Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT): focus on the new kidney-brain spectrum disorders

PI: Dr Monica Bodria, Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Istituto Gaslini, Genova

In fase di valutazione

ABSTRACT

A) *Kidney Week 2017 - America society of Nephrology*

TITOLO: Precision in CAKUT: the Italian Study Group on the genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract

Primo autore: Dr MonicaBodria

In fase di valutazione

B) 58° Congresso Nazionale, Società Italiana di Nefrologia, 2017

TITOLO: Precision in CAKUT: the Italian Study Group on the genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract

Primo autore: Dr MonicaBodria

Accettato come presentazione orale

C) 58° Congresso Nazionale, Società Italiana di Nefrologia, 2017

TITOLO: Applicazione di nuove tecniche radiologiche nel CAKUT: validazione della uro-RM funzionale nell'uropatia ostruttiva

Primo autore: Dr MonicaBodria

Accettato come presentazione orale

PUBBLICAZIONI

1) Rare GREB1L mutations contribute to the genetic heterogeneity of congenital kidney malformations
Sanna-Cherchi S, Khan K, Westland R, Krithivasan P, Fievet L, Milo Rasouly H, Ionita-Laza I, Capone

VP, Fasel DA, Kiryluk K, **Bodria M**, Otto EA, Sampson MG, Gillies CE, Vega-Warner V, Vukojevic K, Padiaditakis I, Maka GS, Mitrotti A, Verbitsky M, Jeremiah Martino J, Goj V, Ardissino G, Gigante M, Gesualdo L, Mendelsohn CL, Shril S, Hildebrandt F, van Wijk JAE, Saraga M, Allegri L, Scolari F, Tasic V, Ghiggeri GM, Latos-Bielenska A, Materna Kiryluk A, Goldstein DB, Lifton RP, Katsanis N, Davis E, and Gharavi AG.

JCI 2017 *Sottomesso*

2) Long-Term Outcome of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Children.

Trautmann A, Schnaidt S, Lipska-Ziętkiewicz BS, **Bodria M**, Ozaltin F, Emma F, Anarat A, Melk A, Azocar M, Oh J, Saeed B, Gheisari A, Caliskan S, Gellermann J, Higueta LMS, Jankauskiene A, Drozd D, Mir S, Balat A, Szczepanska M, Paripovic D, Zurowska A, Bogdanovic R, Yilmaz A, Ranchin B, Baskin E, Erdogan O, Remuzzi G, Firszt-Adamczyk A, Kuzma-Mroczkowska E, Litwin M, Murer L, Tkaczyk M, Jardim H, Wasilewska A, Printza N, Fidan K, Simkova E, Borzecka H, Staude H, Hees K, Schaefer F; PodoNet Consortium.

J Am Soc Nephrol. 2017 May 31

3) ANCA-associated vasculitis in childhood: recent advances

Calatroni M, Oliva E, Gianfreda D, Gregorini G, Allinovi M, Ramirez GA, Bozzolo EP, Monti S, Bracaglia C, Marucci G, **Bodria M**, Sinico RA, Pieruzzi F, Moroni G, Pastore S, Emmi G, Esposito P, Catanoso M, Barbano G, Bonanni A, Vaglio A.

Ital J Pediatr. 2017 May

4) Genetic dissection of the renal disease of DiGeorge syndrome

Lopez-Rivera E, Liu YP, Verbitsky M, Anderson BR, Capone VP, Otto EA, Yan Z, Mitrotti A, Martino J, Steers NJ, Fasel DA, Vukojevic K, Deng R, Racedo SE, Liu Q, Werth M, Westland R, Vivante A, Makar GS, **Bodria M**, Sampson MG, Gillies CE, Vega-Warner V, Maiorana M, Petrey DS, Honig B, Lozanovski VJ, Salomon R, Heidet L, Carpentier W, Gaillard D, Carrea A, Gesualdo L, Cusi D, Izzi C, Scolari F, van Wijk JA, Arapovic A, Saraga-Babic M, Saraga M, Kunac N, Samii A, McDonald-McGinn DM, Crowley TB, Zackai EH, Drozd D, Miklaszewska M, Tkaczyk M, Sikora P, Szczepanska M, Mizerska-Wasiak M, Krzemien G, Szmigielska A, Zaniew M, Darlow JM, Puri P, Barton D, Casolari E, Furth SL, Warady BA, Gucev Z, Hakonarson H, Flogelova H, Tasic V, Latos-Bielenska A, Materna-Kiryluk A, Allegri L, Wong CS, Drummond IA, D'Agati V, Imamoto A, Barasch JM, Hildebrandt F, Kiryluk K, Lifton RP, Morrow BE, Jeanpierre C, Papaioannou VE, Ghiggeri GM, Gharavi AG, Katsanis N, Sanna-Cherchi S.

N Engl J Med. 2017 Feb

5) Ofatumumab-associated acute respiratory manifestation: clinical characteristics and treatment.

Bonanni A, Bertelli E, Moscatelli A, Lampugnani E, **Bodria M**, Ravani P, Ghiggeri GM.

Br J Clin Pharmacol. 2016 Jun 28.

6) Genetic Basis of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract.

Bodria M, Sanna-Cherchi S.

G Ital Nefrol. 2015;32 Suppl 64.

7) Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort.

Trautmann A, **Bodria M**, Ozaltin F, Gheisari A, Melk A, Azocar M, Anarat A, Caliskan S, Emma F, Gellermann J, Oh J, Baskin E, Ksiazek J, Remuzzi G, Erdogan O, Akman S, Dusek J, Davitaia T, Özkaya O, Papachristou F, Firszt-Adamczyk A, Urasinski T, Testa S, Krmar RT, Hyla-Klekot L, Pasini A, Özcakar ZB, Sallay P, Cakar N, Galanti M, Terzic J, Aoun B, Caldas Afonso A, Szymanik-Grzelak H, Lipska BS, Schnaidt S, Schaefer F; PodoNet Consortium.

Clin J Am Soc Nephrol. 2015 Apr 7.

8) Rituximab in Children with Steroid-Dependent Nephrotic Syndrome: A Multicenter, Open-Label, Noninferiority, Randomized Controlled Trial.

Ravani P, Rossi R, Bonanni A, Quinn RR, Sica F, **Bodria M**, Pasini A, Montini G, Edefonti A, Belingheri M, De Giovanni D, Barbano G, Degl'Innocenti L, Scolari F, Murer L, Reiser J, Fornoni A, Ghiggeri GM.

J Am Soc Nephrol. 2015 Jan 15.

Genova, 19/07/2017

