







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΜΟΝΑΔΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ**  
**ΣΤΙΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΟΥ**  
**ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ (CAKUT)**

**ΑΡΤΕΜΙΣ ΜΗΤΣΙΩΝΗ**  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**





«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Μητσιώνη Αρτέμιδος:** 7-5-2008

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 640<sup>α</sup>/17-6-2008

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Γεωργίου Ιωάννης Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Σιαμοπούλου –Μαυρίδου Αντιγόνη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σοφικίτης Νικόλαος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 2-7-2008

*«Ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στις συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού (CAKUT)»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 737<sup>α</sup>/12-6-2012

<b>Γεωργίου Ιωάννης</b>	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σιαμοπούλου-Μαυρίδου</b>	Αντιγόνη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος</b>	Καθηγητής Παθολογίας -Νεφρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σοφικίτης Νικόλαος</b>	Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Τζούφη Μερόπη</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδονευρολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπαλτογιάννης Δημήτριος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σιώμου Αικατερίνη</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής με Έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-7-2012

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Μαργαρίτα Τζαφλίδου**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής  
  
**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**





**Σε αυτούς που  
δεν είναι πια εδώ**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού στα παιδιά αποτελούν νοσήματα που συχνά απαιτούν χειρουργική παρέμβαση ή μπορούν να οδηγήσουν, αν δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα και κατάλληλα, σε χρόνια νεφρική νόσο και στην ανάγκη εξωνεφρικής κάθαρσης και/ή μεταμόσχευση νεφρού. Ωστόσο λίγα είναι γνωστά για την μοριακή παθογένεια αυτών των νοσημάτων στον άνθρωπο, καθώς είναι πολυπαραγοντικά νοσήματα που προέρχονται από ανωμαλίες κατά τα στάδια της νεφρογένεσης στην ενδομήτρια ζωή. Εξαιτίας αυτού είναι δύσκολο να μελετηθούν, αλλά συγχρόνως η μελέτη τους είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα και μεγάλης κλινικής σημασίας<sup>1</sup>.

Σχετικά με την παθογένεια τους, έχει βρεθεί ότι η μη φυσιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ της ουρητηρικής καταβολής (ΟΚ) και του μετανεφρικού μεσεγγύματος (ΜΜ) οδηγεί σε νεφρική υποπλασία/δυσπλασία, κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση (ΚΟΠ) και έκτοπους ουρητήρες. Παρόλο που η γενετική και κυρίως η μοριακή ρύθμιση της ανάπτυξης της ΟΚ δεν είναι πλήρως κατανοητή<sup>2</sup> φαίνεται ότι αποτελεί κεντρικό και εξαιρετικά σημαντικό στάδιο για τη μετέπειτα ανάπτυξη των νεφρών και του ουροποιητικού συστήματος. Η ΟΚ υπόκειται σε μια περίπλοκη διαδικασία ανάπτυξης, διακλάδωσης και διαμόρφωσης για να σχηματιστεί τελικά το ουροποιητικό σύστημα<sup>3</sup>. Λανθασμένη ανάπτυξη, διακλάδωση, επικοινωνία και γενικότερα λειτουργία των κυττάρων της ΟΚ μπορεί να προκαλέσει συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, αλλά χωρίς να είναι γνωστός ο πλήρης μοριακός μηχανισμός. Πρέπει να αναφερθεί πως η μελέτη της μοριακής αιτιολογίας των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού στον άνθρωπο είναι δύσκολη, αφενός επειδή εμφανίζουν ευρύ ανατομικό φάσμα και αφετέρου επειδή το καλύτερο υλικό για μελέτη είναι από ιστό, δηλαδή υλικό προερχόμενο από βιοψία. Ωστόσο βιοψία γίνεται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις όπου υπάρχει κλινική ένδειξη και επομένως το διαθέσιμο υλικό για τη μελέτη των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού παραμένει το περιφερικό αίμα.

Τέσσερις είναι οι λόγοι που κάνουν απαραίτητη την επικέντρωση των μελετών στη μοριακή και γενετική βάση των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού στον άνθρωπο<sup>1</sup>:

(1) Με τη βελτίωση και εξάπλωση του προγεννητικού υπερηχογραφικού ελέγχου, όλο και περισσότερες συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού ανευρίσκονται, με ποσοστό που αποτελεί περίπου το 30% όλων των ανωμαλιών της διάπλασης που διαγιγνώσκονται προγεννητικά. Παρόλο που μερικές από αυτές τις ανωμαλίες φαίνεται να έχουν μικρή κλινική σημασία, η πρώιμη διάγνωση κάποιων σοβαρότερων ανωμαλιών, όπως είναι η αμφοτερόπλευρη νεφρική δυσπλασία/αγενεσία, η

αμφοτερόπλευρη απόφραξη της πυελοουρητηρικής συμβολής ή οι βαλβίδες οπίσθιας ουρήθρας δίνουν τη δυνατότητα κατάλληλης γενετικής καθοδήγησης των γονέων και σε επιλεγμένες περιπτώσεις ακόμη και τερματισμού της κύησης ή προγεννητικής παρέμβασης σε κέντρα με κατάλληλη εμπειρία.

(2) Οι σοβαρές συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συγκροτούν το κύριο αίτιο χρόνιας νεφρικής νόσου σε βρέφη και μικρά παιδιά. Το ποσοστό των παιδιών με χρόνια νεφρική νόσο από σοβαρές συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού σε ορισμένους πληθυσμούς φθάνει ακόμα και το 80%.

(3) Η περιγραφή περιπτώσεων συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού με οικογενή εμφάνιση κατέστησε εφικτή την πραγματοποίηση μελετών γενετικής σύνδεσης, και εν συνεχεία την αναζήτηση συγκεκριμένων μεταλλάξεων σε γονίδια.

(4) Η συνεχής προσθήκη δεδομένων για την ανάπτυξη του ουροποιητικού συστήματος στους μύες έχει προσθέσει γνώσεις για την κατανόηση των ανωμαλιών του ουροποιητικού στον άνθρωπο. Από μελέτες σε μύες βρέθηκε ότι η νεφρογένεση ελέγχεται από ένα περίπλοκο και ποικίλο σύστημα μορίων που συμπεριλαμβάνει μεταγραφικούς παράγοντες, αυξητικούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης, τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της επιβίωσης του κυττάρου, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και τη μορφογένεση κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης των θηλαστικών. Επιπλέον οι ανωμαλίες του ουροποιητικού σε πειραματόζωα με στοχευμένες μεταλλάξεις είναι εξαιρετικά όμοιες με τις αντίστοιχες ανωμαλίες στον άνθρωπο, οπότε και μπορούν να υποδείξουν κάποιο υποψήφιο γονίδιο. Μελέτες σε μύες με μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της νεφρογένεσης έχουν οδηγήσει στα ακόλουθα συμπεράσματα: (α) η ίδια ανωμαλία μπορεί να συμβεί από μεταλλάξεις διαφορετικών γονιδίων, (β) η εμφάνιση και σοβαρότητα των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού συχνά εξαρτώνται από το γενετικό υπόβαθρο του πειραματόζωου και (γ) σε κάποιες περιπτώσεις, περισσότερο από ένα σχετιζόμενο γονίδιο πρέπει να μεταλλαχθούν για να διαταραχθεί η νεφρογένεση.

Ειδικότερα όσο αφορά την πρωτοπαθή ΚΟΠ, η πρώιμη διάγνωση είναι σημαντική διότι η νεφροπάθεια από παλινδρόμηση βρίσκεται ανάμεσα στις πιο συχνές αιτίες για υπέρταση και χρόνια νεφρική νόσο σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η νεφροπάθεια από παλινδρόμηση βρέθηκε να αποτελεί τον δεύτερο πιο σημαντικό παράγοντα που οδηγεί σε τελικού σταδίου χρόνια νεφρική νόσο σε παιδιά, ηλικίας 2-15 ετών την περίοδο μεταξύ 1976-1989<sup>4</sup>. Δεδομένα δείχνουν ότι αγόρια με πρωτοπαθή ΚΟΠ και νεφρική υποπλασία/δυσπλασία (ΚΟΠ-ΝΥΔ) είναι η επικρατούσα ομάδα ασθενών με νεφρική νόσο σε ηλικία από 1-15 ετών. Παραμένει ωστόσο να εξηγηθεί γιατί τα αγόρια εμφανίζουν πιο συχνά ΚΟΠ-ΝΥΔ σε σχέση με τα κορίτσια<sup>5</sup>.



Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος για νουκλεοτιδικές αλλαγές στο γονίδιο *ROBO2* σε παιδιά με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, και συγκεκριμένα με πρωτοπαθή ΚΟΠ ή ΚΟΠ με συνοδό ΝΥΔ.

Η επιλογή των ασθενών και του γονιδίου βασίστηκε στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη διαδικασία της νεφρογένεσης<sup>6</sup>, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι πειραματόζωα με μεταλλάξεις στο *ROBO2* εμφανίζουν φαινότυπο παρόμοιο με την ΚΟΠ όπως αυτή παρουσιάζεται στον άνθρωπο<sup>7</sup>. Επιπλέον στη βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές με αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με το αν μεταλλάξεις του γονιδίου μπορούν να προκαλέσουν ΚΟΠ στον άνθρωπο<sup>8-13</sup>.

Η ιδιαιτερότητα της παρούσας μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι το γονίδιο *ROBO2* για πρώτη φορά εκτιμήθηκε σε ικανό αριθμό παιδιών που εμφάνιζαν εκτός από ΚΟΠ, και ΚΟΠ-ΝΥΔ, η οποία και μελετήθηκε ως ξεχωριστή ομάδα. Επίσης διαφοροποιήθηκε από τις άλλες μελέτες διότι η ομάδα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε δεν προερχόταν από τον γενικό πληθυσμό, αλλά από παιδιά που βεβαιωμένα δεν εμφάνιζαν συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού διότι είχαν υποβληθεί σε απεικονιστικό έλεγχο του ουροποιητικού, ο οποίος ήταν φυσιολογικός. Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σύνθετη βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδίου *ROBO2* με σκοπό να προσδιοριστεί: α) η παρουσία γενωμικών αλληλουχιών που είναι πλούσιες σε CpG νησίδες, καθώς αυτές οι περιοχές είναι ανθεκτικές εστίες μεθυλίωσης και σχετίζονται με την έκφραση των γονιδίων στα οποία εδράζονται β) η συμπληρωματικότητα αλληλουχιών του με συγκεκριμένα miRNA και γ) η περιεκτικότητά του σε μεταθετά στοιχεία. Οι παραπάνω είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων.

Η παρούσα μελέτη προσθέτει δεδομένα που θα συμβάλλουν στην περαιτέρω αποσαφήνιση της παθογένειας των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού συστήματος στον άνθρωπο και το σχεδιασμό νέων μελετών. Μακροπρόθεσμα, η κατανόηση της γενετικής βάσης των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού θα συμβάλλει στον προσδιορισμό συγκεκριμένων γενετικών δεικτών για τις ανωμαλίες αυτές ώστε να μπορέσουν να σχεδιαστούν γενετικά τεστ με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση, την άρτια γενετική καθοδήγηση, αλλά και την κατάλληλη εμβρυϊκή χειρουργική παρέμβαση σε επιλεγμένες περιπτώσεις σοβαρές ανωμαλιών.

Τμήματα της μελέτης έχουν παρουσιαστεί στο 32<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Καρπενήσι, 20-22 Μαΐου 2010, στο 33<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Έδεσσα 19-21 Μαΐου 2011, στο 44th Annual Scientific Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology September 14 - 17 2011 Dubrovnik - Cavtat,

Croatia, και δημοσιεύτηκε σε μορφή περίληψης στο *Pediatr Nephrol* 2012; 27:338 και στο 50<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ιωάννινα, 1-3 Ιουνίου 2012.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στη Μονάδα Γενετικής της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Χειρουργικού Τομέα, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η διάγνωση των συγγενών ανωμαλιών που μελετήθηκαν και η συλλογή των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε στην Παιδιατρική/Παιδονεφρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Στη συμβουλευτική επιτροπή επίβλεψης και καθοδήγησης συμμετείχαν ο Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής κος Ιωάννης Γεωργίου, ο Καθηγητής Ουρολογίας κος Νικόλαος Σοφικίτης και η Καθηγήτρια Παιδιατρικής κα Αντιγόνη Σιαμοπούλου-Μαυρίδου.

Με την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κο Ιωάννη Γεωργίου για την συμβολή του στην επιλογή του θέματος της μελέτης και στην οργάνωσή της, αλλά και για την πολύτιμη καθοδήγηση και στήριξη του, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Ουρολογίας κο Νικόλαο Σοφικίτη και την Καθηγήτρια Παιδιατρικής κα Αντιγόνη Σιαμοπούλου-Μαυρίδου. Ένα ιδιαίτερο και πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην κα Αικατερίνη Σιώμου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση την Παιδιατρική Νεφρολογία, μέλος της επταμελούς επιτροπής, αφενός για την παροχή των δειγμάτων αλλά κυρίως για τη διαρκή υποστήριξη, χωρίς αυτή δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής. Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής τον κο Κωνσταντίνο Σιαμόπουλο, Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας, την κα Μερóπη Τζούφη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδονευρολογία και τον κο Δημήτριο Μπαλτογιάννη, Επίκουρο Καθηγητή Ουρολογίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κα Ιωάννα Μπούμπα, Βιολόγο του εργαστηρίου Μοριακής Ουρολογίας και Γενετικής της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής, Ιατρικής σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της. Επίσης ευχαριστώ πολύ τους συναδέλφους στο εργαστήριο, για τη συνεργασία και συμπαράσταση Γκαλίδη Άννα, Κίτσου Χρυσούλα, Κωστούλα Χαρίλαο και Σακάλογλου Πρόδρομο, αλλά και όλα τα μέλη της Μονάδας Γενετικής της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	9
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Ουροποιητικό σύστημα	11
1.2 Νεφρογένεση	13
1.3 Μοριακή βάση της νεφρογένεσης	20
1.4 Συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος	26
1.4.1 Κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση (ΚΟΠ)	30
1.4.2 Νεφρική υποπλασία-δυσπλασία (ΝΥΔ)	32
1.5 Γονίδια σχετιζόμενα με ΚΟΠ	33
1.6 Γονίδια σχετιζόμενα με ΝΥΔ	34
1.7 Γονίδια Roundabout (ROBO)	35
1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων	37
1.8.1 Μεθυλίωση (CpG νησίδες)	38
1.8.2 microRNAs	38
1.8.3 Μεταθετά στοιχεία	38
2. ΣΚΟΠΟΣ	41
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
3.1 Υλικό μελέτης	43
3.2 Σύνοψη πειραματικής μελέτης	44
3.2.1 Απομόνωση DNA	45

3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)	46
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	51
3.2.4 Μέθοδος πολυμορφικών διαμορφώσεων μονόκλωνων μορίων (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism)	52
3.2.5 Μέθοδος πολλαπλών περιοριστικών κλασμάτων-πολυμορφικών διαμορφώσεων μονόκλωνων μορίων (MRF-SSCP, Multiple Restriction Fragment - Single Strand Conformation Polymorphism)	56
3.2.6 Ανάλυση αλληλουχίας DNA (DNA sequencing)	57
3.2.7 Μέθοδος πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών κλασμάτων (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism)	58
3.2.8 Στατιστική ανάλυση	59
3.2.9 <i>In silico</i> ανάλυση για τις νουκλεοτιδικές αλλαγές	59
3.2.10 <i>In silico</i> ανάλυση για μεθυλίωση (CpG νησίδες), miRNAs και μεταθετά στοιχεία	61
3.2.10.1 Μεθυλίωση (CpG νησίδες)	61
3.2.10.2 miRNAs	61
3.2.10.3 Μεταθετά στοιχεία	61
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
4.1 Ομάδα ασθενών	63
4.2 Ομάδα ελέγχου	66
4.3 Στατιστική ανάλυση	69
4.3.1 Πολυμορφισμός IVS1-53G>A	69
4.3.2 Πολυμορφισμός IVS5-31A>G	72
4.3.3 Κίνδυνος επανεμφάνισης των ανωμαλιών στην οικογένεια	72
4.4 <i>In silico</i> ανάλυση για τις νουκλεοτιδικές αλλαγές	73

4.4.1 Πολυμορφισμός IVS1-53G>A	73
4.4.2 Πολυμορφισμός IVS5-31A>G	75
4.5 <i>In silico</i> ανάλυση για μεθυλίωση (CpG νησίδες), miRNAs και μεταθετά στοιχεία	78
4.5.1 Μεθυλίωση (CpG νησίδες)	78
4.5.2 miRNAs	79
4.5.3 Μεταθετά στοιχεία	84
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	87
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	97
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	99
8. SUMMARY	101
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	103



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

OK	Ουρητηρική καταβολή
MM	Μετανεφρικό μεσέγγυμα
ΝΠ	Νεφροπάθεια από παλινδρόμηση
ROBO	Γονίδια Roundabout
ROBO2	Γονίδιο Roundabout, axon guidance receptor, homolog 2
CAKUT	Συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού
ΚΟΠ	Κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση
ΝΥΔ	Νεφρική υποπλασία-δυσπλασία





## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαδικασία σχηματισμού του ουροποιητικού συστήματος κατά την εμβρυική ανάπτυξη είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται από πολλαπλούς παράγοντες. Οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος είναι αποτέλεσμα σφαλμάτων κατά τη διάρκεια της νεφρογένεσης και αποτελούν πολυπαραγοντικό νόσημα, με φαινοτυπικό εύρος, το οποίο ελέγχεται από πολλούς και πολύπλοκους μοριακούς μηχανισμούς. Τα πολυπαραγοντικά νοσήματα οφείλονται σε ένα συνδυασμό γενετικών λαθών, τα οποία ενώ μεμονωμένα φαίνεται να έχουν μικρή επίδραση, μπορούν να προδιαθέσουν στην ανάπτυξη της νόσου, συνήθως σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα περισσότερα νοσήματα στον άνθρωπο χαρακτηρίζονται ως πολυπαραγοντικά, και ενώ έχουν την τάση να εμφανίζονται με οικογενή μορφή, δεν ακολουθούν αυστηρά Μενδελική κληρονομικότητα. Παρουσιάζουν σαφώς χαμηλότερα ποσοστά κινδύνου επανεμφάνισης, σε σχέση με αυτοσωμικά υπολειπόμενα νοσήματα, ωστόσο σε καμία περίπτωση ο κίνδυνος επανεμφάνισης δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέος, ενώ φαίνεται να σχετίζεται και με το φύλο.

#### 1.1. Ουροποιητικό σύστημα

---

Το ουροποιητικό σύστημα στον άνθρωπο διακρίνεται στο ανώτερο ουροποιητικό που αποτελείται από τους νεφρούς (α) και το κατώτερο ουροποιητικό αποτελούμενο από τους ουρητήρες (β), την ουροδόχο κύστη (γ) και την ουρήθρα (δ).

α) Οι νεφροί βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης, αντίστοιχα στο ύψος του 12<sup>ου</sup> θωρακικού, 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> οσφυϊκού σπονδύλου. Έχουν βάρος 115-170 g, αλλά αυτό ποικίλει μεταξύ των ατόμων και στα δύο φύλα. Ο νεφρός περιβάλλεται από το περινεφρικό λίπος, που λειτουργεί προστατευτικά για το νεφρικό παρέγχυμα και διακρίνεται σε δύο μοίρες, τη φλοιώδη περιφερικά και τη μυελώδη κεντρικά. Η μυελώδης αποτελείται από 7-20 κωνοειδείς σχηματισμούς, τις νεφρικές πυραμίδες, οι κορυφές των οποίων αποτελούν τις νεφρικές θηλές όπου εκβάλλουν τα αθροιστικά σωληνάρια και εισέρχονται στους ελάσσονες κάλυκες. Οι ελάσσονες κάλυκες καταλήγουν στους μείζονες κάλυκες (κάθε νεφρός έχει 2-3 μείζονες κάλυκες), οι οποίοι ενώνονται και σχηματίζουν τη νεφρική πύελο. Η φλοιώδης μοίρα περιέχει τους νεφρώνες, περιβάλλει τη μυελώδη μοίρα και προεκβάλλει μεταξύ των νεφρικών πυραμίδων. Κάθε νεφρική πυραμίδα με την αντίστοιχη φλοιώδη μοίρα παριστά ένα νεφρικό λοβίο (υπάρχουν περίπου 14 στον άνθρωπο)<sup>14</sup>

Η λειτουργική και ανατομική μονάδα των νεφρών είναι ο νεφρώνας. Κάθε νεφρώνας αποτελείται από την κοιλότητα του Bowman, που περιβάλλει το αγγειακό σπείραμα όπου γίνεται η αρχική διήθηση και ο σχηματισμός του προούρου, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Τα άπω εσπειραμένα σωληνάρια καταλήγουν στα αθροιστικά σωληνάρια πολλά από τα οποία συνενώνονται σε μεγαλύτερα και καταλήγουν στις θηλές των πυραμίδων, από όπου τα ούρα συλλέγονται στους ελάσσονες κάλυκες, μείζονες κάλυκες και νεφρική πύελο<sup>15</sup>.

β) Οι ουρητήρες είναι ινομύδεις σωλήνες, μήκους 25-28 cm στον ενήλικα, συνεχόμενοι με τη νεφρική πύελο οι οποίοι μεταφέρουν τα ούρα που αποβάλλονται από τους νεφρούς στην ουροδόχο κύστη. Ο ουρητήρας αποτελείται από τρεις στοιβάδες: το βλεννογόνο, τον μέσο ή μυϊκό χιτώνα (αποτελούμενο από λείες μυϊκές ίνες) και τον έξω χιτώνα.

γ) Η ουροδόχος κύστη είναι ένα κοίλο μύδεις όργανο που βρίσκεται χαμηλά στην πύελο. Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες που διατάσσονται σε δύο στοιβάδες, την έσω επιμήκη και την έξω κυκλωτήρη. Στην ουροδόχο κύστη υπάρχουν αισθητικά νεύρα/ίνες μέσω των οποίων γίνεται αντιληπτή η αίσθηση της πλήρωσης της κύστης από ούρα.

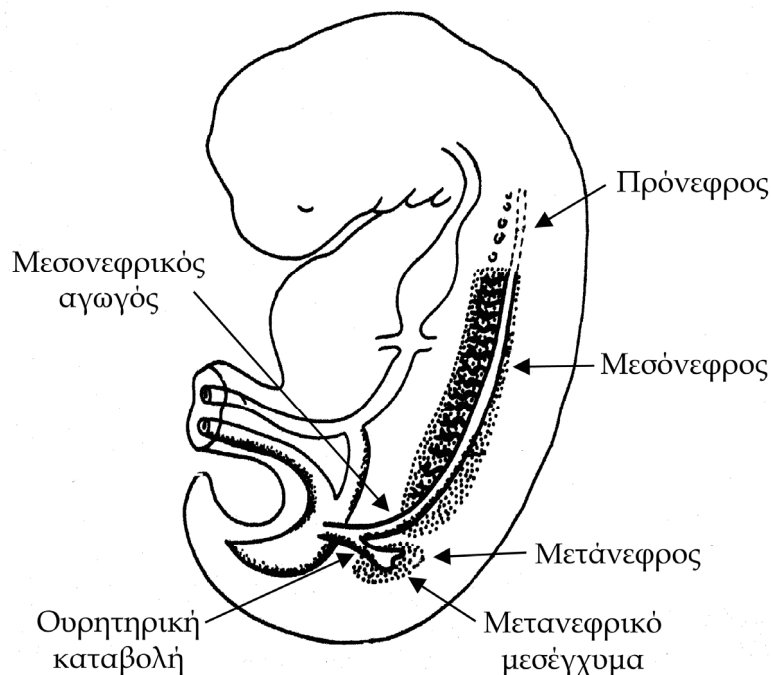
δ) Η ουρήθρα, διαφέρει στα δύο φύλα, γενικά όμως έχει δύο άκρα, το ένα συνδέεται με τον αυχένα της ουροδόχου κύστης και το άλλο με το εξωτερικό περιβάλλον. Η ουρήθρα, όπως και η ουροδόχος κύστη, περιβάλλεται από δύο μυϊκές στοιβάδες την έσω επιμήκη και την έξω κυκλωτήρη. Φέρει δύο σφιγκτήρες τον έσω (αποτελούμενο από λείες μυϊκές ίνες) και τον έξω σφιγκτήρα (αποτελούμενο από γραμμωτές μυϊκές ίνες) ο οποίος ρυθμίζει την αποβολή ούρων κατά βούληση<sup>14</sup>.

Το ουροποιητικό σύστημα στον άνθρωπο πραγματοποιεί ένα σύνολο λειτουργιών απαραίτητων για τη ζωή. Η κύρια λειτουργική αποστολή των νεφρών είναι η ομοιοστάση υγρών και ηλεκτρολυτών του εξωκυττάριου και ενδοκυττάριου χώρου. Επιτυγχάνεται αφενός δια της διήθησης του πλάσματος που επιτελείται στα τριχοειδή του σπειράματος, και αφετέρου δια της επαναρρόφησης και έκκρισης διάφορων ουσιών στα ουροφόρα σωληνάρια. Επίσης οι νεφροί ρυθμίζουν την αποβολή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού, των τοξινών και γενικά ξένων προς τον οργανισμό ουσιών. Επιπλέον παράγουν την ρενίνη που συμβάλλει στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και την ερυθροποιητίνη που συμβάλλει στην ερυθροποίηση<sup>16-18</sup>.

## 1.2.Νεφρογένεση

Γενικά η οργανογένεση περιλαμβάνει πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική προσκόλληση, απόπτωση, κυτταρική διαφοροποίηση, αλλαγές του σχήματος των κυττάρων και κυτταρική μετανάστευση<sup>17</sup>. Ο όρος νεφρογένεση αυστηρά αναφέρεται μόνο στη διαφοροποίηση των σωληναρίων των νεφρώνων (δομική μονάδα των νεφρών) για το σχηματισμό των επιμέρους τμημάτων τους. Ωστόσο έχει πλέον επικρατήσει να χρησιμοποιείται για ολόκληρη τη διαδικασία της νεφρικής ανάπτυξης κατά την εμβρυική ζωή.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης του ανθρώπου και γενικότερα των θηλαστικών σχηματίζονται τρεις διαφορετικές δομές νεφρών: ο πρόνεφρος, ο μεσόνεφρος και ο μετάνεφρος (ΕΙΚΟΝΑ 1.1). Αναπτύσσονται διαδοχικά από το ενδιάμεσο μεσόδερμα, ενώ και οι τρεις μορφές χαρακτηρίζονται από μετάβαση των μεσεγγυματικών κυττάρων, τα οποία προέρχονται από το ενδιάμεσο μεσόδερμα, σε επιθηλιακά κύτταρα. Ο πρόνεφρος, που δεν έχει κάποιο εμφανή ρόλο στα έμβρυα των θηλαστικών και ο μεσόνεφρος, ο οποίος χρησιμεύει ως απεκκριτικό όργανο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, αποδομούνται κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής, ενώ ο μετάνεφρος αναπτύσσεται στους μόνιμους ενήλικους νεφρούς<sup>16,19-21</sup>.



ΕΙΚΟΝΑ 1.1: Σχηματική παράσταση που απεικονίζει τον πρόνεφρο, μεσόνεφρο και μετάνεφρο κατά την 5<sup>η</sup> εμβρυική εβδομάδα<sup>22</sup>.

## **Πρόνεφρος**

Ο πρόνεφρος είναι η πρώτη δομή που σχηματίζεται και είναι η πιο πρώιμη. Είναι λειτουργικός κατά την ανάπτυξη μόνο των κατώτερων σπονδυλωτών και αποτελείται από απλά προνεφρικά σωληνάκια που καταλήγουν στον πρώιμο νεφρικό αγωγό<sup>23</sup>. Τα προνεφρικά σωληνάκια σχηματίζονται από το ενδιάμεσο μεσόδερμα, στο στάδιο των 10 σωματιών, την 22<sup>η</sup> εμβρυική μέρα<sup>14,24</sup> και αρχικά δεν έχουν απεκκριτική λειτουργία, αλλά είναι κρίσιμα για την περαιτέρω ανάπτυξη των νεφρών, καθώς είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του προνεφρικού αγωγού από το ενδιάμεσο μεσόδερμα. Ο προνεφρικός αγωγός επιμηκύνεται ουραία και φτάνει το τοίχωμα της κλοάκης την 26<sup>η</sup> μέρα και καθώς τα μεσονεφρικά σωληνάκια αναπτύσσονται, μετονομάζεται σε μεσονεφρικό αγωγό ή Wolffian αγωγό. Στον άνθρωπο, τα προνεφρικά τμήματα του αγωγού υποστρέφονται πλήρως<sup>14</sup>.

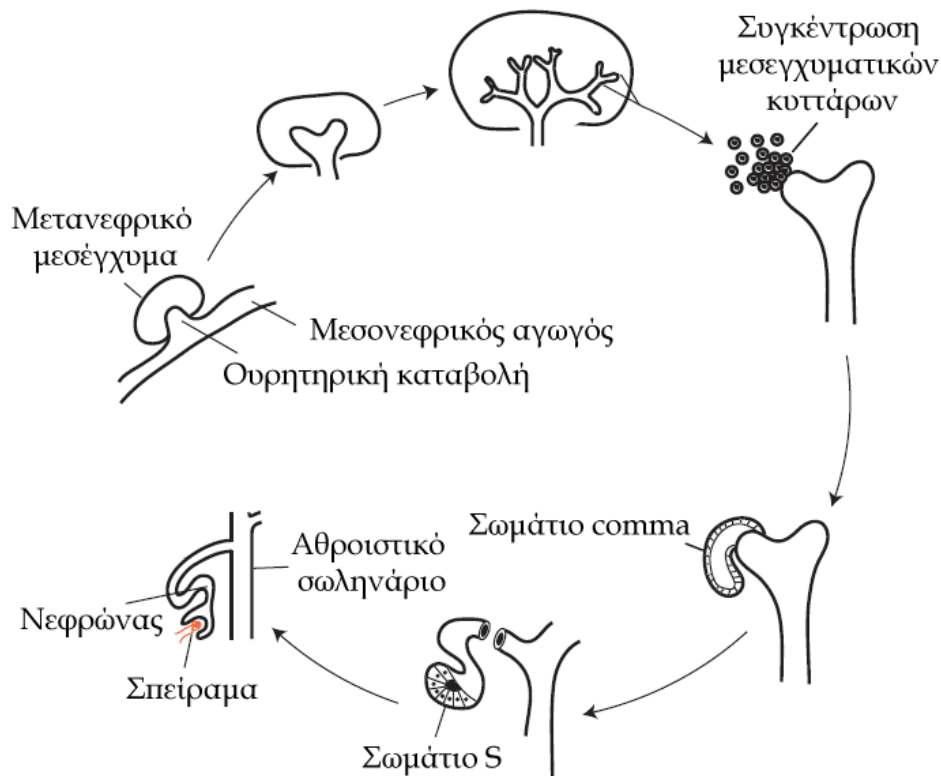
## **Μεσόνεφρος**

Ο μακρόστενος μεσόνεφρος αναπτύσσεται την 24<sup>η</sup> μέρα της κύησης, σε πιο καθοδική θέση κατά μήκος του νεφρικού αγωγού, καθώς ο πρόνεφρος εκφυλίζεται. Είναι λειτουργικός σε ενήλικους ανώτερους ιχθύες και αμφίβια, αλλά στα θηλαστικά μόνο κατά την εμβρυογένεση. Τα μεσονεφρικά σωληνάκια είναι πιο περίπλοκα και αποτελούνται από δομές που μοιάζουν με σπειράματα και εγγύς σωληνάκια<sup>23</sup>. Ο μεσονεφρικός αγωγός ξεκινά ως μια συμπαγής ράβδος από κύτταρα, που δημιουργεί κανάλια με ουραίο-κεφαλική κατεύθυνση μετά τη συγχώνευση με την κλοάκη. Τα μεσονεφρικά σωληνάκια αναπτύσσονται από το ενδιάμεσο μεσόδερμα, με διαφοροποίηση των μεσεγγυματικών κυττάρων σε επιθηλιακά. Στον άνθρωπο, παράγονται περίπου 40 μεσονεφρικά σωληνάκια, καθένα από τα οποία αποτελείται από τμήματα ισοδύναμα με τα μεταγενέστερα νεφρικά σπειράματα, εγγύς και άπω εσπειραμένα σωληνάκια. Ο μεσόνεφρος παράγει μικρές ποσότητες ούρων μεταξύ της 6<sup>ης</sup> και 10<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης, που διοχετεύονται μέσω του μεσονεφρικού αγωγού. Τα κεφαλικά μεσονεφρικά σωληνάκια υποστρέφονται τη στιγμή που σχηματίζονται τα ουραία, και κατά κανόνα εξαφανίζονται μέχρι τον τρίτο μήνα κύησης, αν και κατάλοιπα των ουραίων σωληναρίων και του μεσονεφρικού αγωγού συμμετέχουν στο σχηματισμό άλλων αγωγών (οργάνων) του γεννητικού συστήματος<sup>16</sup>.

## Μετάνεφρος

Ο πρόδρομος του ενήλικου νεφρού, ο μετάνεφρος, αρχίζει να σχηματίζεται από την 4<sup>η</sup>-5<sup>η</sup> εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης (περίπου 28-35<sup>η</sup> ημέρα κύησης). Αρχικά αποτελείται από δύο τμήματα: (1) την ουρητηρική καταβολή (ΟΚ), αποτελούμενη από επιθηλιακά κύτταρα, η οποία θα σχηματίσει το αποχετευτικό σύστημα (αθροιστικά σωληνάρια, νεφρικούς κάλυκες, πύελο και ουρητήρα) και (2) το μετανεφρικό βλάστημα ή μετανεφρικό μεσέγχυμα (ΜΜ), που αποτελείται από μεσεγγυματικά κύτταρα, που στη συνέχεια μετατρέπονται σε επιθηλιακά, και από τα οποία θα σχηματιστούν οι νεφρώνες (σπειράματα, εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια, αγκύλη του Henle και άπω εσπειραμένα σωληνάρια)<sup>16,24-27</sup>.

Υπό αυστηρές συνθήκες, η ανάπτυξη του μετάνεφρου μπορεί να χωριστεί σε διαφορετικές διαδικασίες όπως (1) επαγωγή ανάπτυξης της ΟΚ, (2) μετατροπή του μετανεφρικού μεσεγγύματος σε επιθήλιο, που ακολουθείται από τον σχηματισμό των επιθηλιακών σωληναρίων, (3) διακλαδιζόμενη μορφογένεση και (4) σπειραματογένεση<sup>28,29</sup>. Ο διαχωρισμός, παρόλα αυτά δεν είναι απόλυτος καθώς αυτές οι διαδικασίες δεν είναι ανεξάρτητες, η μία εξαρτάται από την άλλη και επιπλέον επικαλύπτονται χρονικά (ΕΙΚΟΝΑ 1.2).



ΕΙΚΟΝΑ 1.2: Σχηματική παράσταση των σταδίων της νεφρογένεσης<sup>30</sup>

*(1) Επαγωγή της ουρητηρικής καταβολής*

Ο σχηματισμός του μετάνεφρου ξεκινά με την ανάπτυξη της ΟΚ. Η διαδικασία πυροδοτείται όταν ένα σήμα που προέρχεται από το ΜΜ (ειδικότερα από τα κύτταρα του στρώματος), επάγει την ανάπτυξη της καταβολής από το μεσονεφρικό αγωγό. Η σήμανση από το μεσέγχυμα απαιτείται για την ακριβή τοποθέτηση του μετάνεφρου κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα του αναπτυσσόμενου εμβρύου<sup>20,22</sup>. Η ΟΚ αναπτύσσεται από την οπίσθια-έσω άποψη του περιφερικού άκρου του μεσονεφρικού αγωγού περίπου στις 28 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Είναι ένα σωληνοειδές κυστίδιο που επιμηκύνεται και εκτείνεται προς το ΜΜ το οποίο περιβάλλει τον χώρο. Για την επιμήκυνση της ΟΚ, απαιτείται κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αλλά και μετανάστευση των προγονικών κυττάρων κατά μήκος της αναπτυσσόμενης δομής. Το άκρο της ΟΚ, στη συνέχεια, διεισδύει στο μετανεφρικό μεσέγχυμα μέχρι την 32<sup>η</sup> μέρα<sup>16,22,37</sup>.

*(2) Μετατροπή του μετανεφρικού μεσεγγύματος σε επιθήλιο*

Με ανταποδοτικό τρόπο, το ΜΜ επάγεται από την εμβαλλόμενη ΟΚ, το οποίο με τη σειρά του συγκεντρώνεται γύρω από αναπτυσσόμενο άκρο της καταβολής. Το στάδιο αυτό, συνοδεύεται από μια σημαντική διαδικασία, κατά την οποία τα μεσεγγυματικά κύτταρα του μεσεγγύματος πολώνονται και σχηματίζουν το νεφρικό επιθήλιο. Δηλαδή το μεσέγχυμα, απαντώντας σε σήματα που προέρχονται από τα άκρα της αναπτυσσόμενης ΟΚ, υφίσταται επιθηλιακή μετατροπή για να σχηματίσει τα σώματα comma (comma shaped bodies), τα σώματα σχήματος S (S-shaped bodies) και στη συνέχεια τους νεφρώνες<sup>16,20,31-34</sup>. Η επιθηλιακή μετατροπή λαμβάνει χώρα περίπου την 5<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης<sup>35</sup>.

*(3) Διακλαδιζόμενη μορφογένεση*

Ως διακλαδιζόμενη μορφογένεση ορίζεται η ανάπτυξη και η διακλάδωση των επιθηλιακών σωληναρίων που σχηματίζει με την επιμήκυνση της η ΟΚ. Το τμήμα της ΟΚ που εισέρχεται στο ΜΜ, αρχίζει να γίνεται οιδηματώδες, σχηματίζοντας μια δομή σε σχήμα φιαλιδίου και αποτελείται από τον ουρητηρικό μίσχο (ureteric stalk) και το ουρητηρική κορυφή (ureteric tip). Η ΟΚ διχοτομείται και σχηματίζει δύο νέες διακλαδώσεις, οι οποίες με τη σειρά τους θα διακλαδωθούν και αυτές. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι από τις αρχικές διακλαδώσεις το 75% είναι συμμετρικές, δηλαδή ίδιου μήκους και σε 90° κλίση σε σχέση με τις αρχικές και ένας μικρός μόνο αριθμός των αρχικών διακλαδώσεων είναι ασύμμετρες. Το άκρο της ΟΚ παρουσιάζει υψηλότερο

ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με το μίσχο<sup>34,36</sup>. Οι πολλαπλές διακλαδώσεις της καταβολής προκαλούνται από μια σειρά αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των αθροιστικών σωληναρίων, των καλύκων, της νεφρικής πυέλου και του ουρητήρα. Η ΟΚ υπόκειται σε επαναλαμβανόμενες διακλαδώσεις περίπου 15 φορές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μετάνεφρου για τον σχηματισμό περίπου 65.000 αθροιστικών σωληναρίων<sup>30,36</sup>. Οι πρώτες τέσσερις γενιές διακλαδώσεων ενώνονται και σχηματίζουν τους μείζονες κάλυκες, οι έξι έως οχτώ συντήκονται και σχηματίζουν τους ελάσσονες κάλυκες και οι τελευταίες οκτώ διακλαδώσεις σχηματίζουν το τελικό αποχετευτικό σύστημα<sup>16,29</sup>.

#### *(4) Σπειραματογένεση*

Οι νεφρώνες που σχηματίζονται τροφοδοτούνται από διακλαδώσεις της έσω λαγόνιας αρτηρίας και έτσι σχηματίζεται το δίκτυο τριχοειδών του αγγειακού σπειράματος των μαλπιγγειανών σωμάτων<sup>16</sup>. Η επακόλουθη συγχώνευση του απομακρυσμένου αναπτυσσόμενου μετανεφρικού σωλήνα με μία διακλάδωση της ΟΚ ολοκληρώνει τον σχηματισμό του νεφρώνα<sup>36</sup>. Η κορυφή των σχήματος S σωμάτων (S-shaped bodies) ενώνεται με τα αθροιστικά σωληνάκια και τα εγγύς μέρη αυτών των νέων δομών και σχηματίζουν τα σπειράματα<sup>31,32</sup>. Το πρώτο αγγειακό σπείραμα σχηματίζεται στις πρώτες 8-9 εβδομάδες. Οι διακλαδώσεις και η νεφρογένεση συνεχίζονται στον περιφερικό φλοιό του νεφρού, τον καλούμενο νεφρογενετικό φλοιό (nephrogenic cortex) μέχρι την 34<sup>η</sup>-36<sup>η</sup> εβδομάδα. Η περαιτέρω ωρίμανση, αφορά μόνο την αύξηση και τη διαφοροποίηση, και όχι το σχηματισμό νέων νεφρώνων, διαδικασία η οποία συνεχίζεται και μετά τη γέννηση<sup>1,16,37</sup>.

Η ΟΚ επίσης δίνει γένεση στο επιθήλιο της νεφρικής πυέλου, του ουρητήρα και του κυστικού τριγώνου (ουροθήλιο). Ωστόσο το κύριο μέρος του κυστικού τριγώνου προέρχεται από το μεσонеφρικό αγωγό και απορροφάται μέσα στο ακραίο τοίχος της κλοάκης<sup>1,38</sup>. Το ουρηθήλιο, παλιότερα γνωστό ως μεταβατικό επιθήλιο, καλύπτει σχεδόν ολόκληρη την επιφάνεια του ουρητηρικού σωλήνα, δηλαδή της νεφρικής πυέλου, του ουρητήρα, της ουροδόχου κύστεως και του εγγύς τμήματος της ουρήθρας<sup>39</sup>. Η ουροδόχος κύστη αναπτύσσεται από το ουρογεννητικό κόλπο και το περιβάλλον μεσέγχυμα, παράλληλα με το μετάνεφρο. Και στα δύο, νεφρό και ουροδόχο κύστη, αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών τύπων ιστών είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη, ένας δε αριθμός από ρυθμιστικά μόρια έχουν αναγνωρισθεί πρόσφατα από περιγραφικές μελέτες σε μύες<sup>16</sup>.

Η εκβολή του ουρητηρικού στομίου στην κύστη εξαρτάται από τη θέση που η ΟΚ εξέρχεται από το μεσонеφρικό αγωγό, το οποίο με τη σειρά του εξαρτάται από τη χρονική στιγμή και την τοποθεσία της επαφής με το μετανεφρικό μεσέγγυμα<sup>35</sup>. Σημαντική δεν είναι μόνο η φυσική αλληλεπίδραση των δύο βασικών ιστών (μεσонеφρικός αγωγός-MM), αλλά και τα σήματα, δηλαδή οι βιολογικά ενεργές ουσίες που ανταλλάσσουν μεταξύ τους για να προάγουν τη νεφρογένεση και ανάπτυξη του ενδονεφρικού αποχετευτικού συστήματος. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο διακριτά σήματα που προέρχονται από τα κύτταρα της ΟΚ και διεγείρουν τη νεφρογένεση: (1) τα εκκρινόμενα μόρια που αποτρέπουν το μεσέγγυμα να οδηγηθεί σε απόπτωση, αλλά δεν έχουν καμία επίδραση στην επιθηλιακή διαφοροποίηση και (2) τα περιοριζόμενα από τη διάχυση μόρια που προκαλούν την επιθηλιακή διαφοροποίηση του μεσεγγύματος, κάτω από την άμεση επαφή με το μεσόδερμα<sup>2</sup>. Κάθε σήμα προερχόμενο από την ΟΚ, χρειάζεται έναν υποδοχέα στο μετανεφρικό βλάστημα. Αυτοί οι υποδοχείς δεν είναι ακόμα γνωστοί, αλλά θεωρείται ότι σχηματίζονται από γλυκοσυλίωση πρωτεογλυκάνων, δεδομένου ότι μελέτες *in vitro* απέδειξαν ότι η παρεμπόδιση της γλυκοσυλίωσης παρεμβαίνει στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων στην ΟΚ, γεγονός που υποδεικνύει ότι πρωτεογλυκάνες συμμετέχουν στη σηματοδότηση του MM<sup>20</sup>.

Εκτός από τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρώνων και του ουρητήρα, υπάρχει και ένας τρίτος τύπος κυττάρων στον αναπτυσσόμενο νεφρό, που ονομάζονται στρωματικά κύτταρα. Τα στρωματικά κύτταρα προέρχονται όπως και οι νεφρώνες από το MM και συμμετέχουν σημαντικά στη διαμόρφωση των επιθηλιακών κυττάρων που απαιτείται για τη σωστή ανάπτυξη του ουροποιητικού<sup>2,40</sup>. Η ΟΚ εκτός από τα σήματα που στέλνει για την αποτροπή της απόπτωσης και της μετατροπής των κυττάρων από μεσεγγυματικά σε επιθηλιακά, επάγει και το σχηματισμό προγονικών στρωματικών κυττάρων από το μεσέγγυμα<sup>36</sup>. Τμήματα του MM που περιβάλλουν το καλούμενο ως νεφρογενετικό μεσέγγυμα και την αναπτυσσόμενη ΟΚ αποτελούν το στρωματικό μεσέγγυμα. Το στρωματικό μεσέγγυμα θεωρείται ότι διαφοροποιείται στα νεφρικά διάμεσα κύτταρα του διάμεσου νεφρικού ιστού και μυϊκά κύτταρα που περιβάλλουν τον ουρητήρα<sup>41</sup>. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι τμήματα του στρωματικού μεσεγγύματος περιβάλλουν τους αναπτυσσόμενους νεφρώνες<sup>42</sup>.



### *Κυτταρική απόπτωση κατά τη διάρκεια της νεφρογένεσης*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το MM φυσιολογικά θα οδηγούταν σε κυτταρικό θάνατο, χωρίς μηνύματα από την OK που αποτρέπουν την απόπτωση. Στις άκρες της διακλαδιζόμενης OK εκκρίνονται παράγοντες για το συγκεκριμένο σκοπό και παρατηρείται έντονος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ενώ η απόπτωση είναι σχετικά περιορισμένη, σε αντίθεση με τα μεταγενέστερα στάδια όπου επιτελείται η ανάπτυξη των καλύκων, της νεφρικής πυέλου και των νεφρικών θηλών, και τα αποπτωτικά φαινόμενα είναι πιο έντονα. Ο βαθμός που συμμετέχει η απόπτωση στη διακλαδιζόμενη μορφογένεση δεν είναι σαφής. Από μελέτες φαίνεται όμως ότι τα αποπτωτικά φαινόμενα έχουν καθοριστικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση των πρώτων 3-5 γενεών διακλαδώσεων, στο τμήμα του αναπτυσσόμενου νεφρού που σχηματίζει τη νεφρική πυέλο<sup>36,40,43</sup>. Επίσης έχει προταθεί ότι συγκεκριμένοι δεσμευτικοί παράγοντες ηπαρίνης (TIMP-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2) είναι τα εκκρινόμενα μόρια που επιτρέπουν στην OK να «ελέγχει» την απόπτωση των κυττάρων του MM και επομένως να καθορίζουν τον αριθμό των διαθέσιμων μονάδων νεφρώνων. Αντιστρόφως, άλλοι έχουν προτείνει ότι συγκεκριμένοι παράγοντες που πηγάζουν από το MM ελέγχουν ορισμένες λειτουργίες της OK<sup>2</sup>. Το τμήμα του μεσονεφρικού αγωγού που βρίσκεται μεταξύ του ουρογεννητικού κόλπου και του νεοσχηματισμένου ουρητήρα απομακρύνεται με απόπτωση, οπότε και το ελεύθερο πια άκρο του ουρητήρα εισέρχεται στο τοίχωμα της κύστης, ώστε να σχηματιστεί η κυστεοουρητηρική βαλβίδα<sup>44</sup>.

### *Πιθανοί τρόποι πρόκλησης ανωμαλιών*

Γνωστές και πιθανές αιτίες των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού συστήματος (CAKUT, Congenital anomalies of kidney and urinary tract) είναι η μη φυσιολογική ή ελλειμματική λειτουργικότητα της OK, όπως έκτοπη διακλάδωση του αρχικού ουρητήρα, η μη φυσιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ επιθηλίου της OK και MM και αποτυχία σχηματισμού των νεφρώνων, καθώς και ο μη σχηματισμός των αθροιστικών σωληναρίων<sup>45</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια ανωμαλία στην πρώιμη εμβρυική διαδικασία πριν το σχηματισμό νεφρώνων μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική δυσγενεσία με πολλαπλούς τρόπους. Πειραματική παρέμβαση στην αλληλεπίδραση της OK με το MM, το οποίο αποτελεί κεντρικό βήμα για το σχηματισμό του νεφρού και του ουρητήρα, μπορεί παράλληλα να προκαλέσει δυσγενεσία στο νεφρικό παρέγχυμα καθώς και στένωση/ατρησία της OK. Επομένως είναι πιθανό οι αλλαγές στο νεφρικό παρέγχυμα να προκαλούνται εξαιτίας μη φυσιολογικής αλληλεπίδρασης της OK και του MM, και η παρεμπόδιση να είναι ένα δευτερογενές φαινόμενο<sup>2</sup>. Βλάβες στη

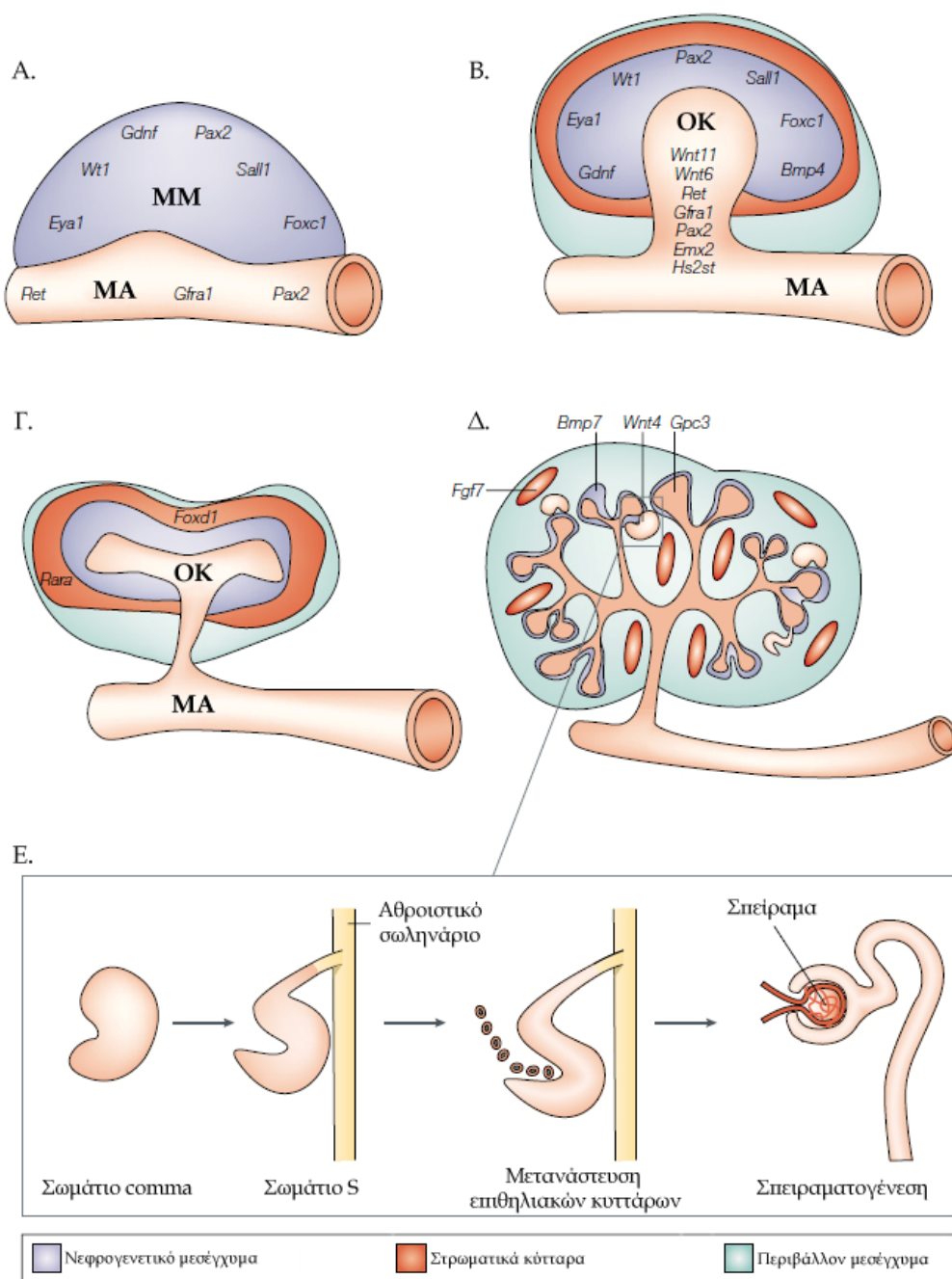
διακλαδιζόμενη μορφογένεση, με τη μορφή ακόμα και μεμονωμένων μεταλλάξεων, προκαλούν ένα φάσμα από ανωμαλίες στη νεφρική ανάπτυξη, όπως νεφρική δυσπλασία και/ή υποπλασία<sup>36,46</sup>. Από τη στιγμή που η ανάπτυξη της OK και του MM εξαρτάται από αμοιβαίες επαγωγικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι έκπληξη που μια πρωτογενής ατέλεια/βλάβη σε ένα από τα δύο, θα επηρεάσει την ανάπτυξη του άλλου. Αυτό δίνει μια εξήγηση για την κλινική παρατήρηση ότι η μη-φυσιολογική είσοδος του ουρητήρα στην κύστη, σχετίζεται με συγγενείς βλάβες του νεφρικού παρεγχύματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αλλαγή του σημείου εισόδου δύναται να αντικατοπτρίζει μία καθυστερημένη ή πρόωρη διακλάδωση της OK από το μεσονεφρικό αγωγό<sup>1</sup>. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση διαταραχής της φυσιολογικής ανάπτυξης της OK έχει παρατηρηθεί σε διάφορες μελέτες σε πειραματόζωα, ποικιλία στο είδος των ανωμαλιών του ουροποιητικού που εμφανίζονται<sup>47</sup>.

### **1.3.Μοριακή βάση της νεφρογένεσης**

---

Η ανατομία της φυσιολογικής ανθρώπινης νεφρογένεσης έχει περιγραφεί από πολλούς συγγραφείς, σε αντίθεση με τη μοριακή βάση αυτής της διαδικασίας, για την οποία είναι γνωστά πολύ λιγότερα. Αναλύσεις σε πειραματόζωα (αμφίβια, ιχθύες, πτηνά και μύες) έδειξαν ότι και τα τρία εκκριτικά όργανα (πρόνεφρος, μεσόνεφρος, μετάνεφρος) έχουν κοινές μονάδες που αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας συντηρημένα κατά την εξέλιξη μοριακά μονοπάτια<sup>20</sup>.

Η διαδικασία του φυσιολογικού σχηματισμού των νεφρών περιγράφηκε λεπτομερώς στην προηγούμενη ενότητα. Είναι σαφές ότι πρόκειται για μία πολύπλοκη διαδικασία με πολλά στάδια, στα οποία εκφράζονται διαφορετικές ομάδες γονιδίων, ανάλογα με το φυσιολογικό ρόλο που πρέπει να επιτελέσουν (ΕΙΚΟΝΑ 1.3).



ΕΙΚΟΝΑ 1.3: Στάδια και γονιδιακή έκφραση κατά τη νεφρογένεση<sup>17</sup>.

Τα γονίδια που απεικονίζονται αποτελούν μέρος του συνόλου των γονιδίων που εκφράζονται στα στάδια της νεφρογένεσης.

- OK: ουρητηρική καταβολή,
- MA: μεσονεφρικός αγωγός,
- MM: μετανεφρικό μεσέγγυμα

### *Ανάπτυξη ουρητηρικής καταβολής (OK)*

Το πιο κρίσιμο στάδιο στη νεφρογένεση είναι η σηματοδοτική πορεία που επάγει τον σχηματισμό και την ανάπτυξη της OK από τον μεσονεφρικό αγωγό, για να συνεχίσει στη συνέχεια η διακλάδωση και η διαφοροποίηση μέχρι να σχηματιστεί η τελική μορφή των νεφρών. Σημαντικό μόριο είναι ο νευροτροφικός παράγοντας GDNF (glial-derived neurotrophic factor), του οποίου η ρύθμιση είναι σημαντική για τη φυσιολογική διεργασία. Παρότι ο GDNF είναι νευροτροφικός παράγοντας, μπορεί να εντοπιστεί και σε εμβρυικό μη-νευρικό ιστό<sup>55,56</sup>. Ο GDNF είναι μία εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται στο MM. Μετά την εισβολή της OK, η έκφραση της περιορίζεται στο MM και αυτό το πρότυπο έκφρασης διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του ουροποιητικού συστήματος<sup>34</sup>.

Η ανάπτυξη της OK ξεκινά όταν το μόριο GDNF, εκκρίνεται από το μεσέγχυμα και δεσμεύεται στο μεσονεφρικό αγωγό μέσω του υποδοχέα RET (Rearranged during Transfection) και του συν-υποδοχέα GFRA1 (glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha), οι οποίοι βρίσκονται σε όλο το μήκος του μεσονεφρικού αγωγού<sup>27,48-50</sup>. Ο Ret εντοπίζεται στις αναπτυσσόμενες μεσονεφρικές καταβολές και ο Gfra1 στα επιθήλια της OK. Δεδομένα δείχνουν ότι το Gfra1 είναι ένας κρίσιμος σύνδεσμος για τη σωστή σηματοδότηση των GDNF-RET στις αλληλεπιδράσεις επιθηλίου-μεσεγγύματος<sup>55,56</sup>. Με τη σειρά του το RET, όταν προσδεθεί το GDNF, ενεργοποιεί την έναρξη άλλων σηματοδοτικών διεργασιών. Επομένως είναι ξεκάθαρο ότι και τα τρία μόρια, GDNF, RET και GFRA1, είναι απαραίτητα και για την επαγωγή της ανάπτυξης της OK και για τη διακλάδωση της<sup>22,51-53</sup>. Καθώς ο GDNF αποτελεί κεντρικό μόριο στη διαδικασία, η ενεργοποίηση, η έκφραση και ο τόπος έκφρασης του, ελέγχεται από ένα περίπλοκο μοριακό δίκτυο, ενώ η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, έχει δομικά συγγένεια με την οικογένεια πρωτεϊνών TGF (transforming growth factor protein family)<sup>54</sup>. Για το GDNF έχει προταθεί ότι το ομοδιμερές του δεσμεύεται στο GFRA1 και στη συνέχεια το σύμπλεγμα συνδέεται με το RET για να επάγει ενδοκυτταρικά διαδοχικά σηματοδοτικά μονοπάτια<sup>55,56</sup>. Σημειώνεται ότι κατά την επαγωγή, είναι απαραίτητο η δέσμευση του GDNF στο μεσονεφρικό αγωγό να περιοριστεί κοντά στην περιοχή της φυσιολογικής ανάπτυξης της OK. Σε αντίθετη περίπτωση, επειδή οι υποδοχείς του GDNF βρίσκονται σε όλο το μήκος του μεσονεφρικού αγωγού, θα μπορούσαν να σχηματιστούν πολλαπλές OK.

### *Επαγωγικοί ρυθμιστές του GDNF*

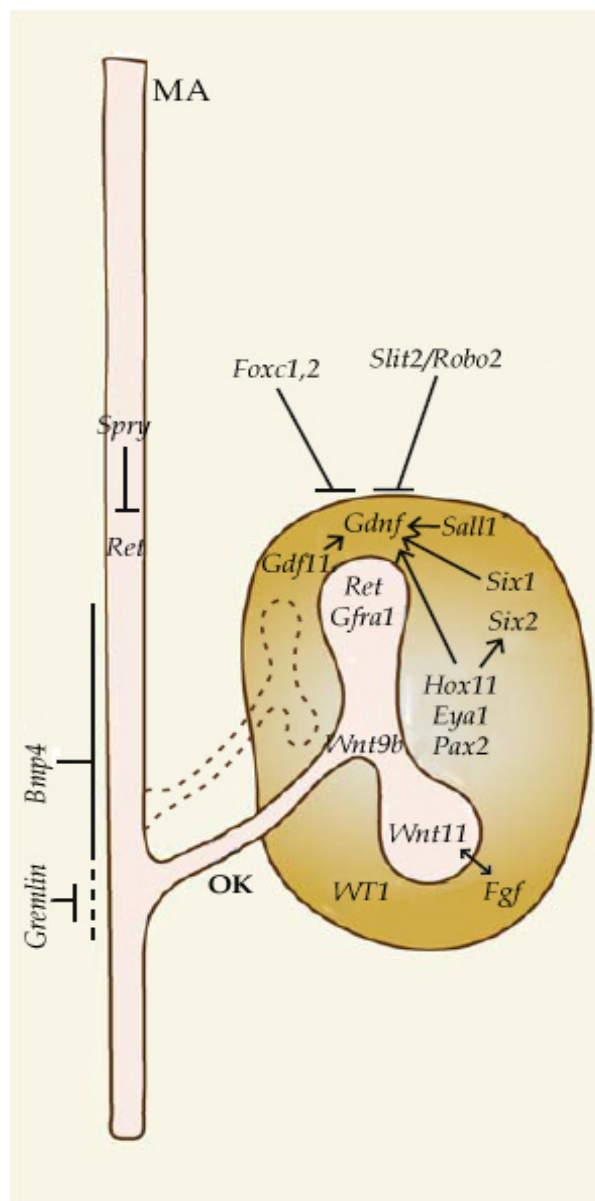
Όπως αναφέρθηκε ο GDNF ρυθμίζεται από πολλαπλούς παράγοντες. Μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται στο μετανεφρικό μεσόδερμα επάγουν την έκφραση του GDNF, όπως το EYA1 (eyes-absent homolog 1) του οποίου η περιοχή έκφρασης επικαλύπτεται με του GDNF και το PAX2 (paired-box 2), το οποίο εκφράζεται στο ενδιάμεσο μεσόδερμα και ενεργοποιεί άμεσα τη μεταγραφή του GDNF<sup>50</sup>. Επαγωγικό ρόλο έχουν και τα μέλη της οικογένειας των γονιδίων HOX11 (homeobox 11), τα οποία απαιτούνται για την έκφραση του GDNF στο MM<sup>48,51</sup>. Επίσης το WNT11 (wingless-type MMTV integration site family, member 11), το οποίο παράγεται στα άκρα της ΟΚ, συμμετέχει στο σύστημα ελέγχου της έκφρασης GDNF στο μεσέγχυμα, επάγοντας την έκφρασή του<sup>48,49</sup>. Γενικά μέλη της οικογένειας WNT θεωρείται ότι συμμετέχουν στη διαδικασία της νεφρογένεσης<sup>58</sup>. Στην κατηγορία των θετικών ρυθμιστών θα μπορούσε επιπλέον να καταταχθεί και το GREM1 (gremlin 1), με τη λογική ότι αποτελεί αναστολέα του BMP4 (bone morphogenetic protein 4)<sup>48,51</sup>, το οποίο με τη σειρά του ανταγωνίζεται την ενεργότητα του GDNF<sup>52</sup>.

### *Ανασταλτικοί ρυθμιστές του GDNF*

Ο περιορισμός της δράσης του GDNF ελέγχεται επίσης από διάφορες ομάδες γονιδίων. Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXC1 (forkhead box protein c1), καταστέλλει τη μεταγραφή του EYA1 και του GDNF, στο ενδιάμεσο μεσόδερμα. Επίσης το SLIT2 (Slit homologue 2), που εκφράζεται στο μεσονεφρικό αγωγό και ο υποδοχέας του, ROBO2 (Roundabout homologue 2), που εκφράζεται στο MM, εμποδίζουν την έκτοπη έκφραση του GDNF κατά μήκος του μεσονεφρικού αγωγού<sup>50</sup>. Η δράση των παραπάνω μορίων, για τον περιορισμό του GDNF, πραγματοποιείται ανοδικά της έκφρασης του, κατά μήκος του σηματοδοτικού μονοπατιού. Αρνητική ρύθμιση του GDNF πραγματοποιείται επίσης και από μόρια που δρουν καθοδικά του RET, υποδοχέα του GDNF<sup>59</sup>, όπως το SPRY1 (sprouty homolog 1). Το μόριο αυτό δρα καθοδικά και το προϊόν του, μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη, εκφράζεται κατά μήκος του μεσονεφρικού αγωγού, αλλά και στη διακλαδιζόμενη ΟΚ. Φαίνεται ότι η παρουσία του RET, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση υψηλών επιπέδων SPRY1, το οποίο με τη σειρά του περιορίζει τη δεκτικότητα του νεφρικού αγωγού στο GDNF<sup>46,50,60</sup>. Εξωτερικά από το MM, αρνητικός έλεγχος στη δράση του GDNF πραγματοποιείται από το BMP4, το οποίο είναι μέλος της υπεροικογένειας TGF- $\beta$  εκκρινόμενων πρωτεϊνών<sup>50</sup>. Το BMP4 αναστέλλει την έκφραση του WNT11, το οποίο είναι μόριο στόχος για το GDNF<sup>61</sup>. Η έκφραση του BMP4, με τη σειρά της φαίνεται να ελέγχεται από το GATA-2<sup>62</sup>. Το BMP4 εμπλέκεται στην εμβρυική

ανάπτυξη από πολλές απόψεις, καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και καθορισμό της πορείας των κυττάρων<sup>61,63</sup>.

Όπως φαίνεται, το κύριο μόριο για τη διαδικασία της επαγωγής της ανάπτυξης της ΟΚ κατά την εμβρυογένεση είναι το GDNF, χωρίς όμως να είναι το μοναδικό (ΕΙΚΟΝΑ 1.4). Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, όλα τα δείγματα από τους εμβρυικούς νεφρούς βρέθηκε να περιέχουν GDNF, σε αντίθεση με τα δείγματα από ενήλικους νεφρούς που δεν ανιχνεύθηκε καθόλου<sup>56</sup>.



ΕΙΚΟΝΑ 1.4: Θετική και αρνητική ρύθμιση που υπόκειται το κεντρικό μόριο GDNF<sup>64</sup>

Συγκεντρωτικά, κάποια από τα κύρια μόρια ρυθμιστές που ελέγχουν άμεσα ή έμμεσα το GDNF στη συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1: Κύριοι ρυθμιστές του GDNF κατά τη διαδικασία της νεφρογένεσης<sup>65</sup>

Αρνητική ρύθμιση GDNF	Θετική ρύθμιση GDNF
Foxc1	Pax2
Foxc2	Eya1
Slit2-Robo2	Sall1
Sprouty1	Hox11
Bmp4	Six1
Angiotensin II	Grem1

#### *Διακλάδωση OK*

Ακολουθώς στη φάση της διακλάδωσης της OK, θετικός ρυθμιστής θεωρείται το PAX2, το οποίο εκφράζεται στο μεσонеφρικό αγωγό και σε κύτταρα του MM τα οποία έχουν επαχθεί από τα άκρα της αναπτυσσόμενης OK. Στη θετική ρύθμιση της διαδικασίας συμβάλλουν επίσης και η βιταμίνη A και ο υποδοχέας της RAR (retinoic acid receptor), που επάγουν την έκφραση του RET. Όσο αφορά την αρνητική ρύθμιση στα αρχικά στάδια της διακλάδωσης θεωρείται ότι συμμετέχει η σηματοδότηση BMP-ALK3. Το ALK3 (activin-like kinase 3) είναι υποδοχέας επιφανείας, εκφράζεται στον μεσонеφρικό αγωγό και προσδένει τα BMP2 και BMP4 με μεγάλη συγγένεια. Σε πειραματόζωα απενεργοποίηση του Alk3 σε κύτταρα της OK, προκαλεί αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων κατά την πρώτη και δεύτερη γενιά<sup>50</sup>.

#### *Επιθηλιακή μετατροπή μεσεγχύματος*

Για την επιθηλιακή μετατροπή του μεσεγχύματος, συμμετέχουν εκκρινόμενα μόρια από την OK. Η OK σηματοδοτεί το MM, με τον εκκρινόμενο αναπτυξιακό παράγοντα Wnt9b, ο οποίος μέσω της β-κατενίνης και άλλων επάγει την έκφραση του Wnt4. Το τελευταίο με τη σειρά του επάγει τα κύτταρα του MM να μεταβούν από μεσεγχυματικά σε επιθηλιακά και να διαφοροποιηθούν σε επιθήλια των νεφρώνων. Επιπλέον ο μεταγραφικός παράγοντας Six2, που εκφράζεται στο MM, διατηρεί τα κύτταρα του αδιαφοροποίητα, και επομένως επιτρέπει τη συνεχόμενη διακλάδωση της OK και τη συνέχεια του σχηματισμού των νεφρώνων<sup>24</sup>. Άλλοι παράγοντες που συμμετέχουν στην επιθηλιακή διαφοροποίηση του MM είναι οι FGF2 (fibroblast growth factor 2) που

ρυθμίζουν τη μορφή που θα έχουν η ΟΚ και το στρώμα, με την έκκριση των μορίων LIF (leukemia inhibitory factor) και TGF-β2 (transforming growth factor-β2)<sup>22,42</sup>. Γενικά τα μέλη των εξωγενών Fgfs αυξάνουν την διαδικασία της ανάπτυξης και ωρίμανσης των ιστών του μεσεγχύματος και της ΟΚ<sup>41</sup>. Ένα ακόμα μόριο το οποίο είναι απαραίτητο σε μεγάλη ποσότητα για τη μετάβαση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε επιθηλιακά είναι η β-κατενίνη. Σε έλλειψη αυτής τα κύτταρα του άκρου της ΟΚ αποτυγχάνουν να παραμείνουν σε πρόδρομη φάση ή αδιαφοροποίητα, όπως θα έπρεπε φυσιολογικά<sup>66</sup>. Τέλος, η πρόωρη επιθηλιακή διαφοροποίηση εμποδίζεται από το Gata3, το οποίο λειτουργεί καθοδικά από τη β-κατενίνη στο νεφρικό αγωγό για να διατηρήσει την έκφραση του Ret<sup>52</sup>.

#### *Επιβράδυνση διακλάδωσης ΟΚ*

Μετά από μια ορισμένη χρονική στιγμή η ανάπτυξη και η διακλάδωση επιβραδύνονται φυσιολογικά εξαιτίας κάποιας αρνητικής ρύθμισης που θεωρείται ότι προέρχεται από το MM. Αρνητική ρύθμιση της ανάπτυξης του μετάνεφρου γενικότερα και ειδικά στα τμήματα του ουροποιητικού που προέρχονται από την ΟΚ, γίνεται από μέλη της υπερικογένειας TGFβ (BMP2, BMP4, activin, TGFB1)<sup>30</sup>.

### **1.4. Συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος**

---

Οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος (CAKUT) είναι ένα σύνολο ανωμαλιών με ευρύ ανατομικό φάσμα. Περιλαμβάνουν ανωμαλίες του ανώτερου και του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος (ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2). Συχνά στον ίδιο ασθενή μπορεί να συνυπάρχουν περισσότερες από μία συγγενείς ανωμαλίες, δημιουργώντας έναν πολύπλοκο φαινότυπο που δυσκολεύει την ταξινόμηση και τη διάγνωση τους<sup>67,68</sup>. Επιπλέον μερικές από αυτές εμφανίζονται σε συνδυασμό με συγγενείς ανωμαλίες άλλων συστημάτων (γαστρεντερικού, αναπνευστικού, κυκλοφορικού, οφθαλμών, οστών)<sup>1</sup>. Παρά το γεγονός ότι οι ανωμαλίες του ανώτερου ουροποιητικού θεωρείται ότι προέρχονται από διαταραχές στην εξέλιξη του MM, ενώ του κατώτερου ουροποιητικού από διαταραχές της ΟΚ, οι CAKUT αποτελούν μια ενιαία κατηγορία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πολλές φορές η ίδια μοριακή αιτιολογία προκαλεί διαφορετικούς φαινοτύπους, και αντιθέτως ένας συγκεκριμένος φαινότυπος δύναται να προκληθεί από διαφορετικές μεταλλάξεις<sup>68</sup> που διαταράσσουν τη φυσιολογική ανάπτυξη του ουροποιητικού συστήματος κατά την εμβρυική ζωή<sup>24</sup>.



ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2: Ταξινόμηση των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού συστήματος<sup>1</sup>

ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	
ΑΝΩΤΕΡΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ	ΚΑΤΩΤΕΡΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ
Νεφρική αγενεσία	Απόφραξη πυελοουρητηρικής ή κυστεοουρητηρικής συμβολής
Νεφρική υποπλασία	Διπλασιασμός ουρητήρα
Νεφρική δυσπλασία	Βαλβίδες οπίσθιας ουρήθρας
Πεταλοειδής νεφρός	Πρωτοπαθής κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση
Διπλασιασμός πυελοκαλυκικού συστήματος	

### **ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΑΝΩΤΕΡΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ<sup>1</sup>**

Νεφρική αγενεσία: Χαρακτηρίζεται από την πλήρη απουσία νεφρού, ετερόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα.

Νεφρική υποπλασία: Ο νεφρός περιέχει σχηματισμένους νεφρώνες, αλλά σημαντικά λιγότερους σε αριθμό από το φυσιολογικό. Η περίπτωση όπου οι νεφρώνες εμφανίζουν μεγάλο μέγεθος ονομάζεται ολιγομεγανεφρωνία.

Νεφρική δυσπλασία: Ο νεφρός περιέχει αδιαφοροποίητους και μεταπλαστικούς ιστούς και μπορεί να είναι πολύ μικρός (απλασία), να περιέχει κύστεις (κυστική δυσπλασία) ή να μην υπάρχει καθόλου νεφρικό παρέγχυμα, αλλά πολλαπλές κύστεις (πλειοκυστικός δυσπλαστικός νεφρός).

Πεταλοειδής νεφρός: Υπάρχει διαταραχή του σχήματος των νεφρών, οι κάτω πόλοι των οποίων συνενώνονται στη μέση γραμμή με νησίδα νεφρικού παρεγχύματος και μπορεί να είναι δυσπλαστικοί.

Διπλό πυελοκαλυκικό σύστημα: το νεφρικό παρέγχυμα και η πύελος διαχωρίζονται σε ανώτερο και κατώτερο τμήμα και καταλήγουν σε δύο ξεχωριστούς ουρητήρες οι οποίοι μπορεί να συνενώνονται ή να εκβάλουν ανεξάρτητα στην ουροδόχο κύστη.

## **ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΚΑΤΩΤΕΡΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ<sup>1</sup>**

Απόφραξη του ουρητήρα: Τα συνηθέστερα σημεία απόφραξης του ουρητήρα είναι στο επίπεδο της πυελοουρητηρικής ή κυστεοουρητηρικής συμβολής και μπορεί να συνοδεύονται από δυσπλαστικό νεφρικό παρέγχυμα.

Διπλασιασμός ουρητήρα: Ο διπλασιασμός του ουρητήρα συνοδεύει το διπλασιασμό του πυελοκαλυκικού συστήματος. Οι δύο ουρητήρες μπορεί να συνενώνονται σε κάποιο σημείο της πορείας τους (ατελής διπλασιασμός) ή να παραμένουν ανεξάρτητοι έως την είσοδό τους στην κύστη (πλήρης διπλασιασμός). Στις περιπτώσεις πλήρους διπλασιασμού, ο ουρητήρας που παροχετεύει το άνω σύστημα μπορεί να καταλήγει σε ουρητηροκήλη και το σύστοιχο νεφρικό τμήμα να είναι δυσπλαστικό, ενώ ο ουρητήρας του κάτω συστήματος να εμφανίζει ΚΟΠ.

Βαλβίδες οπίσθιας ουρήθρας: Είναι πτυχές στην περιοχή της οπίσθιας ουρήθρας. Λόγω της παρουσίας τους η ούρηση είναι αποφρακτική και η ουροδόχος κύστη δύσμορφη. Λόγω των αυξημένων ενδοκυστικών πιέσεων συνήθως υπάρχει δευτεροπαθής ΚΟΠ και οι νεφροί δυνατόν να παρουσιάζουν κυστική δυσπλασία.

Πρωτοπαθής ΚΟΠ: Παλινδρόμηση των ούρων από την κύστη προς τους ουρητήρες και το πυελοκαλυκικό σύστημα των νεφρών.

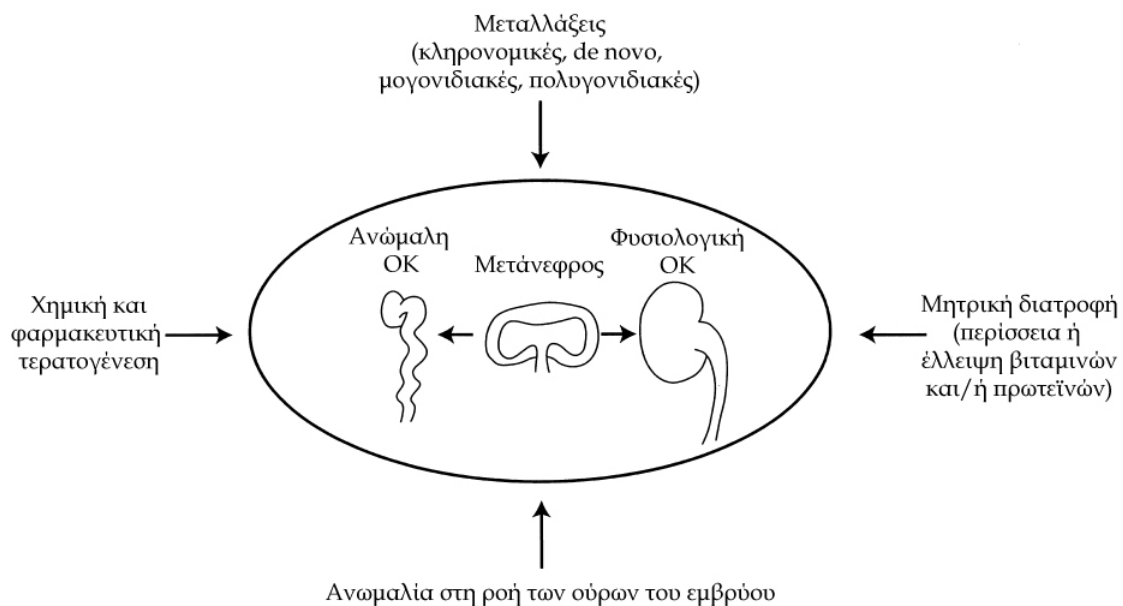
Οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος ανευρίσκονται περίπου στο 0,5% όλων των κυήσεων<sup>2</sup> και αποτελούν την πλέον συχνή αιτία τελικού σταδίου χρόνιας νεφρικής νόσου στην παιδική ηλικία<sup>24</sup>. Περίπου το 30-40% των παιδιών με χρόνια νεφρική νόσο ή τελικού σταδίου νεφρική νόσο εμφανίζουν συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού<sup>24,69-71</sup>. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Βόρεια Αμερική, [North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS)], σε παιδιά με τελικού σταδίου νεφρική νόσο έδειξε ότι 23% έπασχαν από αποφρακτική ουροπάθεια, 18% από νεφρική αγενεσία, υποπλασία ή δυσπλασία, 9% από νεφροπάθεια από παλινδρόμηση και 4% από κυστικά νεφρικά νοσήματα<sup>28</sup>.

Όσο αφορά την κληρονομικότητα, οι περισσότερες περιπτώσεις ανωμαλιών του ουροποιητικού συστήματος είναι σποραδικές και μεμονωμένες<sup>24</sup>, όπως η πλειοψηφία των νεφρικών αγενεσιών και δυσπλασιών. Ωστόσο, από το οικογενειακό ιστορικό και τις γενετικές μελέτες συσχέτισης, παρατηρείται ότι παρά το γενικά σποραδικό τους χαρακτήρα, εμφανίζουν μερικές φορές ένα οικογενές πρότυπο με ελλιπή και/ή ποικίλη διεισδυτικότητα. Επίσης αναφέρεται ότι διαφορετικές ανατομικές ανωμαλίες, μπορούν

να προκληθούν στην ίδια οικογένεια. Ορισμένες ανωμαλίες από μελέτες φαίνεται ότι έχουν συγκεκριμένους τύπους κληρονομικότητας, αλλά δεν συμφωνούν όλες μεταξύ τους. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζει την υπόθεση ότι συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν την ανάπτυξη όλου του ουροποιητικού αγωγού, αλλά ο τελικός φαινότυπος εξαρτάται από διαμορφωτικούς παράγοντες, είτε γενετικούς είτε περιβαλλοντολογικούς, οι οποίοι διαφέρουν από άτομο σε άτομο (ΕΙΚΟΝΑ 1.5). Επιπλέον, σποραδικές δυσμορφίες έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με πολυμορφισμούς γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του ουροποιητικού συστήματος<sup>1,2,72</sup>.

Δεδομένου του ευρέος ανατομικού και ιστολογικού φάσματος που έχουν παρατηρηθεί στις συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες, για την παθογένειά τους:

- (1) το φυσικό στρες που δημιουργείται στο νεφρό και τον ουρητήρα ως αποτέλεσμα της ενδομήτριας απόφραξης της εκροής των ούρων
- (2) το φυσικό στρες ως αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας της κύστης ή της κυστεοουρητηρικής συμβολής
- (3) η εκτοπία της αρχικής επαγωγής της ΟΚ στο μεσονεφρικό αγωγό
- (4) μια πρωτογενή ανωμαλία σε κυτταρικό επίπεδο όσο αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ ΜΜ και ΟΚ
- (5) πιθανά δημιουργούνται από ένα μοναδικό κοινό μηχανισμό κατά τα αρχικά στάδια της επαγωγής της ΟΚ από το μεσονεφρικό αγωγό<sup>73</sup>.



ΕΙΚΟΝΑ 1.5: Επιδράσεις στην έκφραση των γονιδίων κατά την ανάπτυξη της ΟΚ<sup>1</sup>

#### **1.4.1. Κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση (ΚΟΠ)**

---

Με τον όρο ΚΟΠ περιγράφεται η επιστροφή των ούρων από την ουροδόχο κύστη στον ουρητήρα και στη νεφρική πύελο. Μπορεί να είναι ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη. Οφείλεται στην ανεπάρκεια του αντιπαλινδρομικού βαλβιδικού μηχανισμού στην κυστεοουρητηρική συμβολή που φυσιολογικά επιτρέπει την διόδο ούρων μόνο από τον ουρητήρα προς την κύστη. Η παλινδρόμηση μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους νεφρούς γιατί: 1<sup>ο</sup>v εκθέτει τη νεφρική πύελο στις πολύ υψηλότερες πιέσεις της κύστης κατά την ούρηση και 2<sup>ο</sup>v διευκολύνει τη διόδο βακτηριδίων από την κύστη στους νεφρούς, με αποτέλεσμα την εμφάνιση πυελονεφρίτιδας, και την ανάπτυξη νεφρικών ουλών και νεφροπάθειας από παλινδρόμηση (ΝΠ)<sup>39,74</sup>.

Η ΚΟΠ διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθής ΚΟΠ οφείλεται σε βραχεία υποβλεννογόνια/ενδοτοιχωματική πορεία του ουρητήρα. Φυσιολογικά, η σχέση του μήκους της υποβλεννογονίας μοίρας προς τη διάμετρο του ουρητηρικού στομίου πρέπει να είναι 5:1 για να εξασφαλίζει την αντιπαλινδρομική ροή των ούρων. Καθώς η ουροδόχος κύστη πληρούται με ούρα, αλλά και κατά την ούρηση, οι ενδοκυστικές πιέσεις αυξάνονται, ο ουρητήρας συμπιέζεται από τα μυϊκά στοιχεία του εξωστήρα και ο αυλός αποφράσσεται. Όσο πλαγιότερα από τις δύο γωνίες του τριγώνου της ουροδόχου κύστης βρίσκονται τα ουρητηρικά στόμια, και όσο διευρύνονται, τόσο αυξάνεται η προδιάθεση για ΚΟΠ, δεδομένου ότι ανατρέπεται η φυσιολογική σχέση του μήκους της υποβλεννογονίας μοίρας του ουρητήρα προς τη διάμετρο του ουρητηρικού στομίου που εξασφαλίζει τον φυσιολογικό αντιπαλινδρομικό μηχανισμό της κυστεοουρητηρικής συμβολής. Η δευτεροπαθής ΚΟΠ οφείλεται σε διαταραχή της λειτουργικότητας του βαλβιδικού μηχανισμού, λόγω υψηλών ενδοκυστικών πιέσεων συνεπεία απόφραξης στο επίπεδο της ουρήθρας πχ σε βαλβίδες οπίσθιας ουρήθρας ή ύπαρξης νευρογενούς κύστης<sup>75,76</sup>.

Η πρωτοπαθής ΚΟΠ είναι κατά πολύ συχνότερη και σύμφωνα με διάφορες μελέτες εμφανίζεται στο 0,1-2% του γενικού πληθυσμού, γεγονός που την καθιστά την πλέον κοινή ΣΑΚΥΤ<sup>1,39,77,78</sup>. Η ΚΟΠ επίσης δύναται να συνοδεύεται και από ανωμαλίες των άλλων συστημάτων του οργανισμού ή/και να αποτελεί μέρος περίπλοκων συνδρόμων<sup>74,77</sup>.

Η ΚΟΠ έχει συνδεθεί με την εμφάνιση ουρολοίμωξης στη νεογνική, βρεφική και παιδική ηλικία. Σημειώνεται ότι βρέφη ή μικρά παιδιά με ΚΟΠ είναι εξαιρετικά ευπαθή σε ουρολοίμωξη, και αντιστοίχως σχεδόν 30% των παιδιών με ουρολοίμωξη εμφανίζουν ΚΟΠ<sup>39,74</sup>. Η πλέον σοβαρή και μόνιμη επιπλοκή της ΚΟΠ και της

ουρολοίμωξης είναι η δημιουργία πυελονεφριτιδικών ουλών και η εμφάνιση ΝΠ. Αναφέρεται ότι 9% των ατόμων με τελικό στάδιο νεφρικής νόσου πάσχουν από ΝΠ<sup>28</sup>. Από το 1965 η ΝΠ συσχετίστηκε με την ενδονεφρική παλινδρόμηση των ούρων<sup>79</sup> και αργότερα από πειράματα σε χοίρους αποδείχθηκε ότι η ενδονεφρική παλινδρόμηση σχετίζεται άμεσα με την μορφολογία των νεφρικών θηλών. Καθορίστηκαν δύο τύποι νεφρικών θηλών, οι κυρτές (ή απλές) που δεν επιτρέπουν την παλινδρόμηση και οι επίπεδες (ή σύνθετες) θηλές που με μικρή αύξηση των υδροστατικών πιέσεων ή και με φυσιολογική πίεση εντός της νεφρικής πυέλου επιτρέπουν την ενδονεφρική παλινδρόμηση. Επίσης οι ίδιοι ερευνητές<sup>80</sup> δεν παρατήρησαν στα πειράματα τους εμφάνιση πυελονεφριτιδικών ατροφικών βλαβών εφόσον τα ούρα διατηρούνταν στείρα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μόνο η επιπλεγμένη με ουρολοίμωξη ΚΟΠ προδιαθέτει σε ΝΠ εφόσον συνυπάρχει και ενδονεφρική παλινδρόμηση.

Πέραν της ανατομίας των νεφρικών θηλών που προδιαθέτει στην ανάπτυξη των νεφρικών ουλών μετά από ουρολοίμωξη, πρόσφατα έχουν συσχετιστεί ως προδιαθεσικοί παράγοντες και πολυμορφισμοί διαφόρων γονιδίων. Μεταξύ αυτών ο πολυμορφισμός του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης II [angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism (ACE I/D; recessive model for D allele)], ο transforming growth factor (TGF)-β1 c.509T>C πολυμορφισμός (dominant model for T allele), ο TLR4 c.896A<G και ο πολυμορφισμός του υποδοχέα της βιταμίνης D<sup>81-83</sup>.

Νεότερες μελέτες σε νεογνά με ιστορικό προγεννητικής υδρονέφρωσης έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία ΚΟΠ μεγάλου βαθμού και νεφρικής βλάβης παρά την απουσία ουρολοίμωξης. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχουν δύο διαφορετικοί πληθυσμοί ατόμων με ΚΟΠ και ΝΠ. Η μία ομάδα αφορά παιδιά όπου η ΚΟΠ διαγιγνώσκεται μετά από ουρολοίμωξη και η βλάβη του νεφρικού παρεγχύματος είναι επίκτητη (νεφρική ουλή) και οφείλεται σε μόλυνση του νεφρικού παρεγχύματος από παθογόνο μικροοργανισμό (πυελονεφρίτιδα). Στη δεύτερη ομάδα η ΚΟΠ διαγιγνώσκεται στα πλαίσια προγεννητικού υπερηχογραφικού ελέγχου και αφορά συνήθως άρρενα άτομα. Η δεύτερη αυτή ομάδα αυξάνεται συνεχώς, χάρις στη δυνατότητα υπερηχογραφικού ελέγχου στη προγεννητική περίοδο η δε παρεγχυματική νεφρική βλάβη δεν οφείλεται σε λοίμωξη αλλά είναι συγγενής (νεφρική δυσπλασία-υποπλασία)<sup>84</sup>. Αναφέρεται ότι το 15-30% των νεογνών με προγεννητική διάγνωση υδρονέφρωσης έχουν ΚΟΠ<sup>5</sup>. Τα παιδιά αυτά αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου, ίσως τη σημαντικότερη όσο αφορά την εμφάνιση χρόνιας νεφρικής νόσου.

### Γενετική προσέγγιση της ΚΟΠ

Ένα πλήθος από βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και τη φλεγμονή, θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην παθογένεση της ΚΟΠ και της ΝΠ και γονίδια που είναι υπεύθυνα για αυτές τις διαδικασίες είναι υποψήφια για την μοριακή αιτιολογία της ΚΟΠ<sup>74</sup>.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει την άποψη ότι η ΚΟΠ αφενός έχει γενετική βάση και αφετέρου αποτελεί κληρονομούμενο νόσημα. Οι πρώτες ενδείξεις για την κληρονομικότητα προήλθαν από μελέτες σε διδύμους, με τους μονοζυγωτικούς να έχουν πιθανότητα να πάσχουν και οι δύο 80-100% και τους διζυγωτικούς 35-50%<sup>85</sup>. Επίσης μελέτες έδειξαν ότι η πρωτοπαθής ΚΟΠ εμφανίζεται 30-50 φορές συχνότερα σε συγγενείς πρώτου βαθμού, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, γεγονός που υποδεικνύει ότι γενετικοί παράγοντες έχουν ρόλο στην παθογένεση της<sup>1,39,74,86</sup>. Ο τρόπος που κληρονομείται δεν είναι επακριβώς καθορισμένος, καθώς μέσα από μελέτες οικογενειών, έχουν προταθεί διαφορετικοί τύποι κληρονομικότητας όπως, αυτοσωμικός επικρατής<sup>74</sup>, τις περισσότερες φορές με μειωμένη διεισδυτικότητα<sup>87</sup>, αυτοσωμικός υπολειπόμενος<sup>72</sup>, σχετιζόμενος με το φύλο<sup>88</sup> και/ή να παρουσιάζει πολυπαραγοντικό πρότυπο<sup>89-91</sup>. Επομένως είναι φανερό, πως η διασαφήνιση της κληρονομικότητας της ΚΟΠ είναι περίπλοκη, γεγονός που επιτείνεται από το ότι περίπου σε 50% των περιπτώσεων η ΚΟΠ βελτιώνεται ή εμφανίζει αυτόματη υποχώρηση με την πάροδο του χρόνου<sup>65</sup>.

#### **1.4.2. Νεφρική υποπλασία-δυσπλασία (ΝΥΔ)**

---

Δύο κοινές μορφές των CAKUT είναι η νεφρική υποπλασία και η νεφρική δυσπλασία. Πρόκειται για ιστολογικές διαγνώσεις που στην κλινική πράξη δεν είναι πάντα διακριτές.

Ο όρος νεφρική υποπλασία περιγράφει την ύπαρξη μικρών νεφρών που εμφανίζουν ελάττωση του αριθμού των νεφρώνων. Στην ετερόπλευρη μορφή μπορεί να καταλαμβάνει ολόκληρο το νεφρό ή τμήμα του και καλείται τμηματική υποπλασία ή νεφρός Ask-Urmark. Σπάνια μορφή αμφοτερόπλευρης νεφρικής υποπλασίας είναι η ολιγομεγανεφρωνία, όπου υπάρχει σαφής ελάττωση του αριθμού των νεφρώνων που όμως είναι εντόνως υπερτροφικοί<sup>92-95</sup>.

Η νεφρική δυσπλασία αναφέρεται στη μεταβολή της αρχιτεκτονικής κατά τη διαφοροποίηση του νεφρού ώστε να δημιουργούνται κύστεις (κυστική δυσπλασία), ανώμαλα αθροιστικά σωληνάρια, αδιαφοροποίητο μεσέγχυμα ή μη νεφρικά στοιχεία

όπως χόνδρος. Υπερηχογραφικά οι νεφροί εμφανίζουν συνήθως μικρότερο μέγεθος, κατάργηση της φλοιομυελώδους διαφοροποίησης και αυξημένη ηχογένεια. Χαρακτηριστική μορφή δυσπλασίας αποτελεί ο πλειοκυστικός νεφρός. Αμφοτερόπλευρη πλειοκυστική νόσος δεν είναι συμβατή με τη ζωή<sup>96</sup>.

Με τις διαθέσιμες μη παρεμβατικές εξετάσεις δεν είναι πάντα δυνατός ο διαχωρισμός των δύο ανωμαλιών. Η βέβαιη διάκριση απαιτεί τη διενέργεια νεφρικής βιοψίας και ιστολογική εξέταση που σπάνια γίνονται στην κλινική πράξη<sup>94,95</sup>. Πρακτικά έχει καταλήξει δυσπλαστικός να χαρακτηρίζεται ο νεφρός που έχει διαφορετικό μέγεθος από το φυσιολογικό, αυξημένη ηχογένεια και συχνά ανώμαλο απεκκριτικό σύστημα, ενώ υποπλαστικός αυτός που είναι σημαντικά μικρότερος αλλά διατηρεί το σχήμα, την φυσιολογική ηχογένεια και φλοιομυελική διαφοροποίηση<sup>68,70</sup>. Οι δύο μορφές μπορούν να παρατηρηθούν ετερόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα. Ετερόπλευρη νεφρική υποπλασία-δυσπλασία εμφανίζεται περίπου σε 1/1000 γεννήσεις<sup>97</sup> ενώ η αμφοτερόπλευρη δυσπλασία είναι πιο σπάνια με συχνότητα 1/5000 γεννήσεις<sup>37</sup>. Η νεφρική υποπλασία-δυσπλασία είναι δυνατόν να παρατηρηθεί στα πλαίσια πολυάριθμων κλινικών συνδρόμων<sup>37,97</sup>.

Επίσης συχνά η ύπαρξη ΚΟΠ συνδυάζεται με υποπλαστικούς-δυσπλαστικούς (υποδυσπλαστικούς) νεφρούς. Παραμένει αδιευκρίνιστο ακόμα βιβλιογραφικά κατά πόσο η νεφρική υποπλασία-δυσπλασία οφείλεται στη φτωχή διαφοροποίηση του νεφρικού παρεγχύματος ως αποτέλεσμα της μακρόχρονης πίεσης που εξασκείται στον εμβρυικό αναπτυσσόμενο νεφρό, από την παλινδρόμηση των ούρων κατά τη νεφρογένεση. Πρόσφατα έχει προταθεί ότι οι ανωμαλίες των νεφρών και των ουρητήρων είναι δυνατόν να προέρχονται από έναν κοινό μηχανισμό, αποτέλεσμα διαταραχής της φυσιολογικής οργανογένεσης στην πολύ πρώιμη εμβρυική ζωή, και συγκεκριμένα μη σωστής αλληλεπίδρασης μεταξύ της ΟΚ και του ΜΜ<sup>35</sup>.

Στην πλειονότητα των ασθενών με υποδυσπλαστικούς νεφρούς, που δεν παρατηρούνται στα πλαίσια κάποιου συνδρόμου, σαφής μενδελική κληρονομικότητα δεν είναι εμφανής. Εντούτοις λεπτομερής εξέταση των οικογενειακών ιστορικών υποδηλώνει ότι περίπου 10% των περιπτώσεων είναι οικογενείς<sup>98</sup>, υποδηλώνοντας τον πολυπαραγοντικό χαρακτήρα της κληρονομικότητας.

### **1.5. Γονίδια σχετιζόμενα με ΚΟΠ**

---

Μεταξύ των ΣΑΚΥΤ, η ΚΟΠ παρουσιάζει μεγάλη γενετική ετερογένεια και παρόλο που είναι συχνή αιτία νεφρικής νόσου σε παιδιά και ενήλικες, η μοριακή βάση της νόσου δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστή και έχουν διατυπωθεί ποίκιλα δεδομένα για τη

γενετική αιτιολογία της<sup>99</sup>. Αν και δεν έχει βρεθεί ακόμα ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή γενετικός τόπος που σχετίζεται με την νόσο, υφίστανται αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ μελετών όσο αφορά τον εκάστοτε εξεταζόμενο πληθυσμό.

Σε ασθενείς με ανωμαλίες στην κυστεοουρητηρική συμβολή και ΚΟΠ έχουν βρεθεί μεταλλάξεις του γονιδίου *ROBO2*<sup>48,100</sup>. Επίσης σε ασθενείς με ΚΟΠ παρουσιάστηκαν ετερόζυγες μεταλλάξεις των γονιδίων *UPKIII* και *UPKII*, καθώς και ελλείμματα στις περιοχές των χρωμοσωμάτων 10, 11, 13 και 22<sup>39,100</sup>. Αντίθετα άλλες έρευνες θεωρούν ότι μεταλλάξεις του γονιδίου *UPKIII* δεν προκαλούν ΚΟΠ<sup>99,101</sup>. Σχετιζόμενο θεωρείται και το αλληλόμορφο 825T του πολυμορφισμού C825T του γονιδίου *GNB3*<sup>102</sup>. Επίσης υποδείχθηκαν και γενετικοί τόποι στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6, στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 10, όπου βρίσκεται το γονίδιο *PAX2* και στο χρωμόσωμα X, σε μία περιοχή που περιέχει το γονίδιο *AT2* που θεωρείται ότι σχετίζεται με νεφρικές ανωμαλίες<sup>74</sup>. Διαφορετική μελέτη έδειξε ως γενετικό τόπο για την ΚΟΠ στο χρωμόσωμα 1p, χωρίς να βρεθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Σποραδικές ανωμαλίες έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με πολυμορφισμούς γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια σχηματισμού του ουρητηρικού αγωγού<sup>1</sup>. Σε μελέτη των Vats και συν. εντοπίστηκε έλλειμμα στην περιοχή 13q33-34, σε 5 ασθενείς, που μεταξύ των συμπτωμάτων είχαν και ΚΟΠ<sup>86</sup>. Σε άλλη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος, εντοπίστηκαν περιοχές σε διάφορα χρωμοσώματα όπως: 1q, 2q, 3q, 7q, 10q, 13q, 16q, 20p και 21q<sup>44</sup>. Σε Κορεάτες ασθενείς με ΚΟΠ και λοίμωξη του ουροποιητικού, παρατηρήθηκε αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών στα γονίδια *VEGF* και *TGF-β1*<sup>103</sup>. Ωστόσο μελέτη για την εύρεση πιθανών γονιδίων που να σχετίζονται με την εμφάνιση ΚΟΠ, σε Γερμανούς ασθενείς, δεν επιβεβαίωσε σχέση με κανένα από τα παρακάτω γονίδια: *GDNF*, *RET*, *SLIT2*, *ROBO2*, *SPRY1*, *PAX2*, *AGTR2*, *UPK1A*, *UPK1B*, *UPK2*, *UPK3A*, *UPK3B*, και *HLADRB1*<sup>12</sup>.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα των μελετών, μέχρι τώρα, φαίνεται ότι η ΚΟΠ είναι γενετικά ετερογενής νόσος και ότι ο τύπος κληρονομικότητας που ακολουθεί, σποραδικά εμφανίζεται ως επικρατής με διαφορετικά γονίδια να δρουν στις διαφορετικές οικογένειες<sup>74,102</sup>. Επίσης είναι πολύ πιθανόν τα γονίδια να επιδρούν σε συνδυασμό με τυχαίους περιβαλλοντικούς παράγοντες<sup>35,104</sup>.

## **1.6. Γονίδια σχετιζόμενα με ΝΥΔ**

---

Όσο αφορά τη νεφρική υποπλασία-δυσπλασία η πιο συχνή αιτία φαίνεται να είναι η ελαττωματική διακλάδωση της ΟΚ. Κατά συνέπεια, τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία είναι υποψήφια προς μελέτη<sup>48</sup>, όπως είναι το *WNT11*. Αξιοπρόσεκτο είναι το γεγονός ότι σε γονίδια που κωδικοποιούν κεντρικά μόρια όπως *GDNF* δεν έχουν



βρεθεί μεταλλάξεις σε ασθενείς με μεμονωμένες CAKUT, πιθανόν επειδή προκαλούν εμβρυικό θάνατο, ενώ μεταλλάξεις στο *Ret* σχετίζονται με σοβαρούς φαινοτύπους όπως η νεφρική αγενεσία<sup>105</sup>, αν και έχει αναφερθεί και συσχέτιση του τελευταίου με πρωτοπαθή ΚΟΠ, σε κλειστό πληθυσμό<sup>106</sup>.

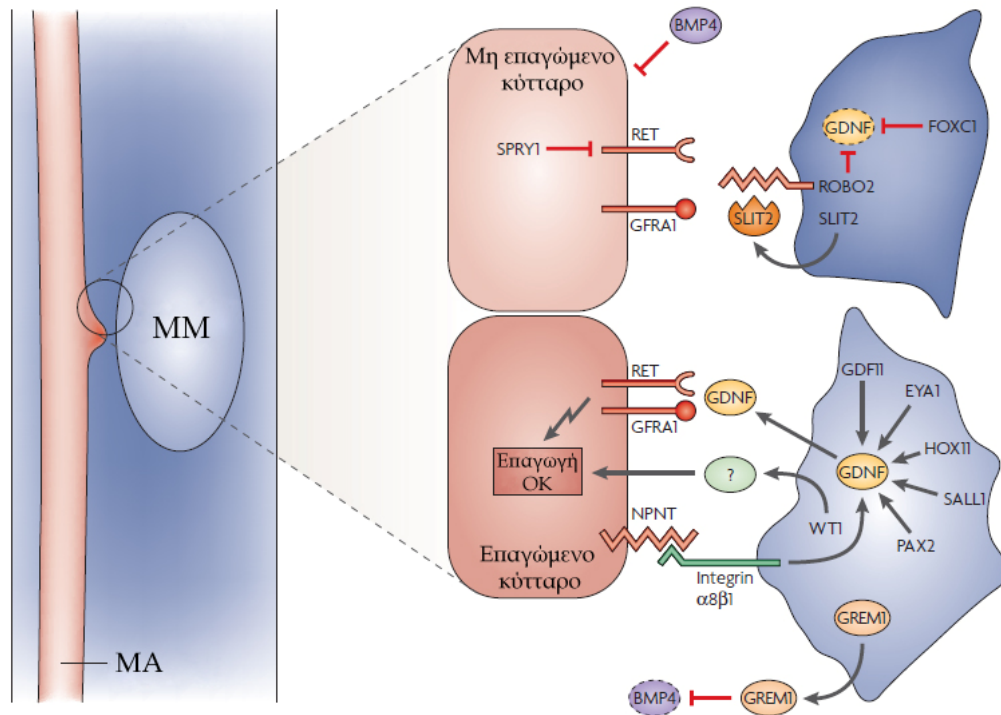
Μεταλλάξεις διάφορων γονιδίων όπως *TCF2*, *PAX2*, *EYA1*, *SIX1* και *SALL1*, έχουν παρατηρηθεί στις περιπτώσεις νεφρικής υποπλασίας-δυσπλασίας στα πλαίσια συνδρόμων, ενώ και μεταλλάξεις στο γονίδιο *UPKIII*, αλλά και άλλων ουροπλακινών είναι υπεύθυνες για μικρό αριθμό ασθενών<sup>37,68,97,98,107-110</sup>. Αξιοπρόσεκτο είναι το γεγονός ότι σε οικογένειες με αποδεδειγμένες μεταλλάξεις στα γονίδια *TCF2* και *PAX2*, οι συγγενείς πρώτου βαθμού έχουν πιθανότητα να είναι φορείς των μεταλλάξεων, αλλά με ελάχιστες νεφρικές αλλοιώσεις<sup>111</sup>. Επίσης διαταραχές στη λειτουργία της σηματοδότησης μέσω των FGFRs, μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνες για πολλές περιπτώσεις νεφρικής υποπλασίας, δυσπλασίας και/ή απλασίας<sup>41</sup>. Επίσης βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BMP4* σε ασθενείς με υποπλασία και δυσπλασία, οι οποίοι στο φαινότυπο τους είχαν και άλλες ανωμαλίες<sup>112</sup>.

### 1.7. Γονίδια Roundabout (ROBO)

---

Τα γονίδια *Robo* αναγνωρίστηκαν πρώτη φορά στη *Drosophila*, όπου αποκαλύφθηκε ένα σύστημα καθοδήγησης των νευραξόνων, στο οποίο συμμετέχουν η εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη *slit* και ο διαμεμβρανικός της υποδοχέας *robo*<sup>113</sup>. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί 4 γονίδια *Robo*: *Robo1/Dutt1*, *Robo2*, *Robo3/Rig-1* και *Robo4/magic roundabout*<sup>114</sup>, τα οποία εκφράζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τους νεφρούς και άλλους αναπτυσσόμενους ιστούς<sup>36</sup>. Τα *ROBO1* και *ROBO2* στον άνθρωπο βρίσκονται σε κοντινές θέσεις στο χρωμόσωμα 3, ενώ τα *ROBO3* και *ROBO4* στο χρωμόσωμα 11<sup>114</sup>. Τα γονίδια αυτά έγιναν αρχικά γνωστά ως χημειοαπωθητικά μόρια που απομακρύνουν τους νευράξονες και άλλα μεταναστευτικά κύτταρα από το σημείο που εκφράζονται τα γονίδια *Slit*. Το *robo2* εκφράζεται στο αδιαφοροποίητο ΜΜ, που περιβάλλει τα άκρα της αναπτυσσόμενης ΟΚ<sup>36</sup>. Το σύστημα *Slit2/Robo2* συμμετέχει στον περιορισμό της περιοχής που εκφράζεται το *GDNF* ώστε να σχηματιστεί η ΟΚ στο κατάλληλο σημείο του νεφρικού αγωγού<sup>7,29,115</sup>. Δηλαδή το γονίδιο *ROBO2* εκφράζει έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα που εντοπίζεται στο ΜΜ, ο οποίος προσδένει το εξωκυττάριο *SLIT2*<sup>8,116</sup> (ΕΙΚΟΝΑ 1.6). Στον ενήλικο άνθρωπο, από cDNA βιβλιοθήκες, ανιχνεύθηκε η υψηλότερη έκφραση του *ROBO2* στον εγκέφαλο και στις ωοθήκες. Μεσαία έκφραση εντοπίστηκε στον πνεύμονα, νεφρό, σπλήνα, όρχι και νωτιαίο μυελό. Μικρή έως

καθόλου έκφραση παρατηρήθηκε στο πάγκρεας, την καρδιά, το ήπαρ και τους σκελετικούς μύες<sup>117</sup>.



ΕΙΚΟΝΑ 1.6: Μοριακός έλεγχος επαγωγής της OK και ρόλος του ROBO2 σε αυτή<sup>48</sup>

MM: μετανεφρικό μεσέγχυμα, MA: μεσενεφρικός αγωγός, OK: ουρητηρική καταβολή

Έχουν διατυπωθεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να ελέγχεται το GDNF από το συνδυασμό SLIT2/ROBO2, όπως:

- (1) να δρουν στα κύτταρα που εκφράζουν το GDNF ως χημειοαπωθητικό σήμα
- (2) να συμμετέχουν στον έλεγχο του, μέσω μετα-μεταγραφικού ελέγχου των EYA1 ή PAX-2, τα οποία μειορυθμίζουν το GDNF<sup>61</sup>.

Το γονίδιο κωδικοποιεί δύο ισομορφές, μέσω εναλλακτικού υποκινητή, το ROBO2a και το ROBO2b. Χρησιμοποιούνται εναλλακτικά εξόνια, με διαφορετικές 5' αμετάφραστες περιοχές και θέσεις έναρξης της μετάφρασης. Το κωδικόνιο έναρξης στην ισομορφή a βρίσκεται στο εξόνιο 2 και της ισομορφής b στο εξόνιο 1. Το μετάγραφο του ROBO2a περιέχει 27 εξόνια και έχει μήκος 5920 bp και το ROBO2b περιέχει 26 εξόνια και έχει μήκος 6235 bp. Παρόλα αυτά η ώριμη πρωτεΐνη των δύο μορφών διαφέρει μόνο σε τέσσερα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο. Το ROBO2a δεν

εκφράζεται στους νεφρούς, και έχει περιορισμένη έκφραση κυρίως στον εμβρυικό εγκέφαλο, ενώ το ROBO2b ανιχνεύτηκε σε διάφορους ιστούς, και στους νεφρούς<sup>114</sup>. Ολόκληρο το γονίδιο έχει μήκος περίπου 610kb και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 στην περιοχή p12.3, η οποία από μελέτες θεωρείται μία ασταθής κληρονομούμενη περιοχή, στην οποία λαμβάνουν χώρα χρωμοσωμικές ανακατατάξεις<sup>8</sup>. Τα μέλη της οικογένειας των ROBO όπως αναφέρθηκε και για το ROBO2, δρουν ως διαμεμβρανικοί υποδοχείς. Περιέχουν μία εξωκυττάρια περιοχή που αποτελείται από πέντε προβλεπόμενες Ig περιοχές και τρεις Fn3 περιοχές, μια διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή με τρία κυτταροπλασματικά μοτίβα. Τα μέλη της οικογένειας (ROBO1 και ROBO2) μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας. Μείωση στη δυνατότητα δέσμευσης των μορίων παρατηρήθηκε όταν κάποια από τις Ig περιοχές ή όλες οι Fn περιοχές απουσιάζουν. Συνεπώς αυτές οι εξωκυττάρια περιοχές είναι σημαντικές για την δέσμευση μορίων μεταξύ τους, όπως το ROBO2<sup>9</sup>. Η αλληλεπίδραση των SLIT-ROBO πραγματοποιείται μέσω της δεύτερης LRR περιοχή των Slit και τις δύο αμινοτελικές Ig περιοχές των ROBO<sup>10</sup>.

Το γονίδιο *ROBO2* δεν έχει ενοχοποιηθεί για κάποια άλλη ασθένεια στον άνθρωπο, εκτός από CAKUT<sup>8</sup>, κυρίως ΚΟΠ, όπου φαίνεται να συμμετέχει στην παθογένεια της. Πειραματόζωα ομόζυγα σε μηδενική μετάλλαξη του *Slit2* (*Slit2*<sup>-/-</sup>), επιβίωσαν δύσκολα και εμφάνισαν ανωμαλίες όπως μεγαουρητήρα και δυσπλαστικούς νεφρούς. Κατά τον έλεγχο των εμβρύων αυτών των πειραματόζωων παρατηρήθηκαν τρεις ή περισσότερες ΟΚ σε 14/16 και δύο ΟΚ σε 2/16 νεφρικούς αγωγούς. Τα γονίδια SLIT σηματοδοτούν μέσω των υποδοχών ROBO και συγκεκριμένα στα σπονδυλωτά μέσω των ROBO1 και ROBO2. Ομοζυγότες σε μηδενική μετάλλαξη του *Robo1* δεν παρουσίασαν ανωμαλίες στην ανάπτυξη των νεφρών, ενώ με απενεργοποίηση του *Robo2* εμφάνισαν αντίστοιχο φαινότυπο με τα *Slit2*<sup>-/-</sup>, αλλά ηπιότερο (6/14 είχαν τρεις ουρητήρες, 6/14 δύο και 2/14 είχαν έναν. Συμπερασματικά, η ομόζυγη έλλειψη είτε του *Robo2* είτε του *Slit2* σε μύες προκάλεσε υπεράριθμες ΟΚ, που οδηγούν σε πολλαπλούς νεφρούς και ουρητήρες, ενώ το *Robo2* σε ετεροζυγωτία, εμφάνισε πιο ήπιο φαινότυπο με διατεταμένους ουρητήρες που εισχωρούν περισσότερο πλευρικά από το φυσιολογικό στην ουροδόχο κύστη<sup>7</sup>.

### **1.8. Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων**

---

Οι κλασικοί γενετικοί παράγοντες όπως οι μεταλλάξεις, γίνεται φανερό ότι δεν μπορούν να εξηγήσουν πλήρως την εκδήλωση και την παθογένεια των συγγενών ανωμαλιών. Η προσοχή τα τελευταία χρόνια στράφηκε προς άλλες τροποποιήσεις του

DNA που γίνονται επιγενετικά και είναι κληρονομούμενες ή μη κληρονομούμενες αλλαγές, οι οποίες δεν αλλάζουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία, αλλά ελέγχουν τη δομή της χρωματίνης και την έκφραση των γονιδίων.

### **1.8.1. Μεθυλίωση (CpG νησίδες)**

---

Η μεθυλίωση του DNA σε δινουκλεοτίδια CpG, είναι η πιο συχνή επιγενετική τροποποίηση. Περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση μια μεθυλομάδας στη θέση 5 της κυτοσίνης, παράγοντας 5-μεθυλοκυτοσίνη. Η μεθυλομάδα προεξέχει προς τη μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του DNA και μπορεί να προσελκύσει σύμπλοκα πρωτεϊνών τα οποία τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τις ιστόνες. Τα σύμπλοκα αυτά δρουν συμπυκνώνοντας τη χρωματίνη και αποσιωπώντας γονίδια ή εκτοπίζοντας μεταγραφικούς παράγοντες που δεσμεύονται στο DNA. Περιοχές πλούσιες σε CpG υπάρχουν στους υποκινητές περίπου του 60% των ανθρώπινων γονιδίων που μεταγράφονται, όπου είναι απομεθυλιωμένες και σε επαναλαμβανόμενες γενωμικές ακολουθίες όπου είναι έντονα μεθυλιωμένες. Η υπερμεθυλίωση των υποκινητών οδηγεί σε απώλεια λειτουργικότητας, ενώ η υπομεθυλίωση στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες προκαλεί γενωμική αστάθεια<sup>118</sup>.

### **1.8.2. microRNAs (miRNAs)**

---

Ένα άλλο είδος επιγενετικής τροποποίησης είναι μέσω μικρών μη-κωδικοποιητικών μορίων RNA, όπως τα εξωγενή small interfering RNA (siRNA) και τα ενδογενή microRNAs. Τα miRNAs είναι μικρά μόρια RNA μήκους συνήθως 19-25 νουκλεοτιδίων, τα οποία μέχρι πρότινος θεωρούταν ότι κατέστειλαν τη μετάφραση των mRNA στόχων, αλλά αποδείχθηκε ότι ρυθμίζουν τη γενετική έκφραση μετα-μεταγραφικά, συνήθως μειώνοντας την έκφραση του mRNA. Υπολογίζεται ότι περίπου το 20-30% όλων των mRNA στον άνθρωπο είναι στόχοι των miRNAs. Δεσμεύονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες στόχους στο mRNA στόχο<sup>118,119</sup>. Τα μόρια αυτά έχουν αρχίσει να συσχετίζονται με νοσήματα, όπως είναι οι πολυκυστικοί νεφροί και η ρευματοειδής αρθρίτιδα<sup>120,121</sup>.

### **1.8.3. Μεταθετά στοιχεία**

---

Τα μεταθετά στοιχεία είναι μετρίως επαναλαμβανόμενες μοναδιαίες ακολουθίες DNA, διάσπαρτες στο γένωμα, που έχουν την ιδιότητα να μετατίθενται. Μετάθεση ορίζεται η ιδιότητα ορισμένων ακολουθιών του DNA να μετακινούνται σε νέες θέσεις

στο γένωμα του κυττάρου προέλευσης τους. Τα μεταθετά στοιχεία καταλαμβάνουν περίπου το μισό γένωμα στον άνθρωπο αποτελώντας περίπου το 46% και απαντώνται σε  $3.2 \times 10^6$  θέσεις. Η ταξινόμηση τους βασίζεται στον μηχανισμό μετάθεσης και διακρίνονται σε DNA-τρανσποζόνια και Ρετροτρανσποζόνια, αντίστοιχα. Τα DNA τρανσποζόνια απαντούν σε 294.000 αντίγραφα, αποτελώντας το 2,84% του ανθρωπίνου γενώματος<sup>122</sup>. Τα μεταθετά στοιχεία έχουν την ικανότητα να επαναδιατάσσουν το γένωμα του κυττάρου. Η επικρατέστερη άποψη για τη σημασία της ύπαρξης τους αποδίδει σε αυτά ένα σημαντικό ρόλο ως κατευθυντών της εξέλιξης και ρυθμιστών της λειτουργίας του γενώματος. Η παρουσία τους στο γένωμα και η μετάθεσή τους σε νέες γενωμικές θέσεις, σε συνάρτηση με το γεγονός ότι κληρονομούνται καθιστά τα μεταθετά στοιχεία ένα από τους βασικότερους παράγοντες γενωμικής επαναδιάταξης, προάγοντας την γενωμική εξέλιξη<sup>123</sup>. Τα μεταθετά στοιχεία, εκτός από το ρόλο τους στην γενωμική επαναδιάταξη, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε δομικές και λειτουργικές ιδιότητες του γενώματος. Από δομικής άποψης, έχει προταθεί ότι η παρουσία τους στο γένωμα συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης<sup>124</sup>. Ενσωματώσεις μεταθετών στοιχείων σε μεταγραφικά ρυθμιστικές περιοχές, όπως εξόνια, ιντρόνια και περιοχές που ρυθμίζουν το μάτισμα (την ωρίμανση του mRNA), οδηγούν στην μειορρύθμιση έως και τη διακοπή της έκφρασης γονιδίων<sup>123,125</sup>. Ακόμη, ενσωματώσεις στο 5' άκρο των γονιδίων μπορεί να προσφέρουν σε αυτά εναλλακτικούς υποκινητές που οδηγούν στην έκτοπη έκφρασή τους<sup>126</sup>. Επιπλέον, τα γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ μεταθετών στοιχείων μπορεί να προκαλέσουν εναλλακτικό μάτισμα εξαιτίας των νέων λειτουργικών θέσεων μάτισματος των μεταθετών στοιχείων<sup>127</sup>. Επιπλέον, εκφράζονται στα ανθρώπινα ωάρια και τα ωάρια των θηλαστικών<sup>128</sup> και πιθανολογείται ότι οδηγούν στο 1-2% των ανασυνδυασμών που εμφανίζονται de novo στα έμβρυα και νεογνά<sup>129</sup>.



## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος για νουκλεοτιδικές αλλαγές στο γονίδιο *ROBO2* σε παιδιά με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, και συγκεκριμένα με κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση (ΚΟΠ) ή ΚΟΠ με συνοδό νεφρική υποπλασία/δυσπλασία (ΚΟΠ-ΝΥΔ) σε DNA από το αίμα των πασχόντων.

Η επιλογή των ασθενών και του γονιδίου βασίστηκε στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο γονίδιο συμμετέχει στη διαδικασία της νεφρογένεσης, και στα ευρήματα πειραματικών μελετών που έχουν δείξει ότι πειραματόζωα με μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο εμφανίζουν φαινότυπο παρόμοιο με την ΚΟΠ όπως αυτή παρουσιάζεται στον άνθρωπο. Επιπλέον στη βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές με αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με το αν μεταλλάξεις του γονιδίου μπορούν να προκαλέσουν ΚΟΠ στον άνθρωπο, ως εκ τούτου, η συγκεκριμένη μελέτη θα προσθέσει δεδομένα που θα συμβάλλουν στην περαιτέρω αποσαφήνιση της παθογένειας αυτών των ανωμαλιών.

Η ιδιαιτερότητα της παρούσας μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι το γονίδιο *ROBO2* για πρώτη φορά εκτιμήθηκε σε ικανό αριθμό παιδιών που εμφάνιζαν εκτός από ΚΟΠ, και ΝΥΔ, και μελετήθηκε ως ξεχωριστή ομάδα. Επίσης διαφοροποιήθηκε από τις άλλες μελέτες διότι η ομάδα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε δεν προερχόταν από τον γενικό πληθυσμό, αλλά από παιδιά που βεβαιωμένα δεν εμφάνιζαν συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού διότι είχαν υποβληθεί σε απεικονιστικό έλεγχο ουροποιητικού, ο οποίος ήταν φυσιολογικός. Επιπρόσθετα, εξαιτίας των δυσκολιών στη μελέτη γονιδίων σχετιζομένων με την ανάπτυξη σε δείγματα DNA από ολικό αίμα και λαμβάνοντας υπόψη αναφορές στη βιβλιογραφία που υποδηλώνουν την εμπλοκή άλλων γενετικών ή επιγενετικών παραγόντων που ρυθμίζουν τη γονιδιακή τους έκφραση, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σύνθετη βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδίου *ROBO2* με σκοπό να προσδιοριστεί: α) η παρουσία CpG νησίδων, β) η συμπληρωματικότητα αλληλουχιών του με miRNA και γ) η περιεκτικότητά του σε μεταθετά στοιχεία.

Μακροπρόθεσμα, η κατανόηση της γενετικής βάσης των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού θα συμβάλλει στον προσδιορισμό συγκεκριμένων γενετικών δεικτών για τις ανωμαλίες αυτές ώστε να μπορέσουν να σχεδιαστούν γενετικά τεστ με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση, τη σωστή γενετική καθοδήγηση, αλλά και την κατάλληλη εμβρυϊκή χειρουργική παρέμβαση σε επιλεγμένες περιπτώσεις σοβαρών ανωμαλιών.





## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Υλικό μελέτης

---

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν παιδιά με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος, και ειδικότερα με ΚΟΠ και ΚΟΠ/ΝΥΔ, τα οποία έχουν διαγνωσθεί και παρακολουθούνται στην Παιδιατρική-Παιδονεφρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων από το Σεπτέμβριο του 2001 έως το Μάιο του 2010.

Στην Παιδιατρική Κλινική συλλέχθηκαν και αρχειοθετήθηκαν όλα τα απαραίτητα στοιχεία από το ιστορικό και τις απεικονιστικές εξετάσεις των ασθενών που επιβεβαιώνουν τις ανωτέρω διαγνώσεις. Πιο ειδικά, η ΚΟΠ διαγνώσθηκε με ανιούσα κυστεοουρηθρογραφία και ταξινομήθηκε σε βαρύτητα με βαθμό I-V σύμφωνα με την μελέτη της διεθνούς επιτροπής ΚΟΠ<sup>130</sup>. Η διάγνωση της ΝΥΔ στηρίχθηκε στα ευρήματα του υπερηχογραφήματος και του στατικού σπινθηρογραφήματος νεφρών (<sup>99m</sup>Tc-DMSA). Τα υπερηχογραφικά κριτήρια για τη διάγνωση νεφρικής υποπλασίας ήταν: μικρότερο μέγεθος νεφρού με ομαλό περίγραμμα, φυσιολογική ηχογένεια και φυσιολογική φλοιομυελική διαφοροποίηση. Υπερηχογραφικά για την νεφρική δυσπλασία τα κριτήρια ήταν: μικρότερο μέγεθος νεφρού με ομαλό περίγραμμα, αυξημένη ηχογένεια και διαταραχή της φλοιομυελικής διαφοροποίησης. Στο στατικό σπινθηρογράφημα νεφρών τα κριτήρια για τις δύο ανωμαλίες ήταν: μικρότερο μέγεθος νεφρού, φυσιολογική ή διάχυτη ελάττωση της πρόσληψης ραδιοφαρμάκου, ομαλό περίγραμμα και σχετική συμμετοχή  $\leq 35\%$ <sup>131</sup>. Ενώ η σχετική συμμετοχή των νεφρών ορίζεται ως παθολογική όταν είναι  $< 45\%$ , για την μελέτη επιλέχθηκαν οι ασθενείς με συμμετοχή  $\leq 35\%$  με σκοπό να συμπεριληφθούν οι ασθενείς με σοβαρότερη μορφή νεφρικής υποπλασίας ή δυσπλασίας. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι με τις διαθέσιμες μη παρεμβατικές (απεικονιστικές) εξετάσεις δεν είναι πάντα δυνατός ο διαχωρισμός των δύο ανωμαλιών<sup>70</sup>. Η βέβαιη διάκριση απαιτεί τη διενέργεια νεφρικής βιοψία και ιστολογική εξέταση που σπάνια γίνονται στην καθημερινή κλινική πράξη. Έτσι, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο όρος νεφρική υποπλασία-δυσπλασία (ΝΥΔ).

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε είτε κατά τη διάρκεια προγραμματισμένης εισαγωγής στην Κλινική, στα πλαίσια επανελέγχου, είτε κατά την πρώτη εισαγωγή των πρωτοδιαγνωσμένων παιδιών, μετά από έγκριση του Επιστημονικού και Διοικητικού συμβουλίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Παράλληλα λήφθηκε αριθμός δειγμάτων περιφερικού αίματος από παιδιά

συγκρίσιμης ηλικίας και φύλου με την ομάδα των ασθενών τα οποία δεν παρουσίαζαν καμία ανωμαλία του ουροποιητικού συστήματος με σκοπό να αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου. Τα παιδιά της ομάδας ελέγχου νοσηλεύτηκαν στην Παιδιατρική-Παιδονεφρολογική Κλινική για έλεγχο του ουροποιητικού συστήματος λόγω επεισοδίου ουρολοίμωξης, ενώ το υπερηχογράφημα και η ανιούσα κυστεοουρηθρογραφία δεν ανέδειξαν παθολογικά ευρήματα. Η συλλογή δειγμάτων αίματος για την μελέτη έγινε συγχρόνως με την προγραμματισμένη αιμοληψία για τον συνήθη εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας, χωρίς επιπλέον επιβάρυνση των παιδιών, και μετά από γραπτή συναίνεση των γονέων τους.

Οι ασθενείς που επιλέχθηκαν για γενετικό έλεγχο κατατάχθηκαν στις παρακάτω ομάδες:

1. Ασθενείς με μέτρια-σοβαρή (III-V βαθμού) πρωτοπαθή ΚΟΠ ως μεμονωμένη συγγενή ανωμαλία ουροποιητικού (55 ασθενείς)
2. Ασθενείς με μέτρια-σοβαρή (III-V βαθμού) ΚΟΠ και συνοδό ΝΥΔ (38 ασθενείς)
3. Ασθενείς με οικογενή ΚΟΠ (III-V βαθμού) (5 οικογένειες με περισσότερα από ένα προσβεβλημένα παιδιά) (10 ασθενείς)

Για την ομάδα ελέγχου συλλέχθηκε δείγμα περιφερικού αίματος από 200 παιδιά χωρίς συγγενείς ανωμαλίες ουροποιητικού.

### 3.2. Σύνοψη πειραματικής μελέτης

---

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για αυτή την μελέτη, περιλαμβάνει:

1. Απομόνωση DNA από το δείγμα αίματος
2. Ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών του γονιδίου ROBO2, στα δείγματα, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR)
3. Έλεγχος των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης
4. Έλεγχος για νουκλεοτιδικές αλλαγές με την μέθοδο πολυμορφικών διαμορφώσεων μονόκλωνων μορίων DNA (**S**ingle **S**trand **C**onformation **P**olymorphism, SSCP) για προϊόντα PCR <300 βάσεων
5. Έλεγχος για νουκλεοτιδικές αλλαγές με την μέθοδο πολλαπλών περιοριστικών κλασμάτων-πολυμορφικών διαμορφώσεων μονόκλωνων μορίων DNA (**M**ultiple **R**estriction **F**ragment - **S**ingle **S**trand **C**onformation **P**olymorphism, MRF-SSCP) για προϊόντα PCR >300 βάσεων
6. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των SSCP και MRF-SSCP με ανάλυση αλληλουχίας DNA (DNA sequencing)

7. Έλεγχος της συχνότητας των νουκλεοτιδικών αλλαγών στην ομάδα ελέγχου, είτε με τη μέθοδο SSCP, είτε με τη μέθοδο πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών κλασμάτων (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism, RFLP)
8. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων
9. *In silico* ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλλαγών
10. *In silico* ανάλυση για μεθυλίωση (CpG νησίδες), miRNAs και μεταθετά στοιχεία

### **3.2.1. Απομόνωση DNA**

---

Απομονώθηκε γενωμικό DNA από περιφερικό αίμα ασθενών χρησιμοποιώντας το QIAamp® DNA Mini Kit της εταιρείας QIAGEN, ακολουθώντας επακριβώς το προτεινόμενο πρωτόκολλο.

Τα στάδια του προτεινόμενου πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 200 μl δείγματος (περιφερικό αίμα) σε σωληνάριο των 1,5 ml.
2. Προσθήκη 20 μl πρωτεάσης στο ίδιο σωληνάριο.
3. Προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL. Ανάδευση για 15 sec με χρήση αναδευτήρα (vortex).
4. Επώαση για 10 min στους 56 °C.
5. Σύντομη φυγοκέντρηση (spin) για απομάκρυνση σταγονιδίων από το πώμα του σωληναρίου.
6. Προσθήκη 200 μl αιθανόλης (96-100%) και ανάδευση με χρήση αναδευτήρα (vortex) για 15 sec. Σύντομη φυγοκέντρηση (spin) για απομάκρυνση σταγονιδίων από το πώμα του σωληναρίου.
7. Μεταφορά του μείγματος από το βήμα 6 σε στήλη διαχωρισμού, η οποία τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής των 2 ml. Φυγοκέντρηση για 1 min σε 8.000 rpm. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε νέο.
8. Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 στη στήλη διαχωρισμού και φυγοκέντρηση για 1 min σε 8.000 rpm. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε νέο.
9. Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 στη στήλη διαχωρισμού και φυγοκέντρηση για 3 min σε 14.000 rpm. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε νέο.

10. Φυγοκέντρηση για 1 min σε 14.000 rpm, για απομάκρυνση τυχόν εναπομείναντος διαλύματος AW2. Απόρριψη του σωληνάριου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο των 1,5 ml.
11. Προσθήκη στη στήλη διαχωρισμού 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C) για 1 min και φυγοκέντρηση για 1 min σε 8.000 rpm.
12. Απόρριψη της στήλης διαχωρισμού και αποθήκευση του σωληναρίου με το επιθυμητό προϊόν (γενωμικό DNA).

### **3.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction)**

---

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και είναι μία μέθοδος πολλαπλασιασμού γνωστών αλληλουχιών DNA. Με την τεχνική αυτή μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων ενισχύεται σε πολλαπλά αντίγραφα, δηλαδή αντιγράφεται η ίδια αλληλουχία εκθετικά, σε δισεκατομμύρια αντίγραφα, από οποιοδήποτε δείγμα DNA την περιέχει ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη της σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Η τεχνική PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στην θερμοκρασία και τον χρόνο διάρκειας. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)
- 2) Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing)
- 3) Επιμήκυνση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με την βοήθεια μίας DNA πολυμεράσης (primer extension)

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, με αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (συνήθως στους 92-96°C). Με αυτόν τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου και οι συμπληρωματικοί κλώνοι απομακρύνονται.

Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας αντίδρασης (συνήθως 50-65°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συνήθως μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία συνδέονται συμπληρωματικά με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας DNA. Σχεδιάζονται έτσι ώστε να υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Επειδή

κατασκευάζονται με χημική σύνθεση η τεχνική χρησιμοποιείται μόνο για την ενίσχυση τμημάτων DNA με γνωστή αλληλουχία των δύο άκρων τους. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (**T**hermus **aq**uaticus: Taq DNA πολυμεράση), παρουσία των τεσσάρων διδεοξυνουκλεοτιδίων, που επιτρέπει την σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Σε μια τυπική αντίδραση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30-40 φορές. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα κλάσμα DNA, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών. Στη πράξη, 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του κλάσματος DNA.

Η αξιολόγηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης. Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται πιο συχνά στο διαχωρισμό κλασμάτων DNA μήκους από λίγες εκατοντάδες έως και 20.000 βάσεις. Το DNA γίνεται ορατό με το βρωμιούχο αιθίδιο, που προστίθεται στο πήκτωμα αγαρόζης κατά τη διάρκεια παρασκευής του, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Η πολυακρυλαμίδη χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μικρότερων κλασμάτων DNA και επίσης γίνεται χρώση για να γίνει ορατό το προϊόν που διαφέρει<sup>132</sup>.

Η αλληλουχία του γονιδίου ROBO2 βρέθηκε από τη βάση δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) και τη λειτουργία SNPper του λογισμικού Chip Bioinformatics Tools (<http://snpper.chip.org/>).

Ο σχεδιασμός των εκκινητών, στην περίπτωση που δεν υπήρχε στη διεθνή βιβλιογραφία (εξόνιο 26), πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Επίσης, όλες οι αλληλουχίες των εκκινητών ελέγχθηκαν με τη λειτουργία BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) της βάσης δεδομένων NCBI για να διασφαλιστεί ότι δεν προσδένονται σε άλλη θέση στο γονιδίωμα εκτός της επιθυμητής αλληλουχίας στο αντίστοιχο εξόνιο του γονιδίου ROBO2 και δεν πολλαπλασιάζονται μη ειδικές αλληλουχίες.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 26 εξονίων του γονιδίου ROBO2<sup>8</sup> φαίνονται αναλυτικά στον ΠΙΝΑΚΑ 3.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Εκκινητές για αντίδραση PCR του γονιδίου ROBO2

Εξόνιο	Πρόσθιος εκκινητής
	Ανάστροφος εκκινητής
1	5'-TTTGCTCTTCTTGACTTTAATTAGTATCTAGG -3'
	5'-TATAACCCACATCAAATTCAAAAAGAAAT -3'
2	5'- CGAAGAGTTTAATTTCCCCATCA -3'
	5'- GCGTCTATGGGAACACATCAAAA -3'
3	5'- TTGTACAACAAAAAGCCTAAGTTACTGTC -3'
	5'- AAAATTCAATCTCTCTGGGCCAT -3'
4	5'- TAATGACCTTATTTTCTATTCTGTTCCTTT -3'
	5'- TTATATGGCCCAGTTTTTAATGTTAGTAATACT -3'
5	5'- CTTTTTCATAATGTACTTAAAGCATGCA -3'
	5'- GTGGCATTGTAGCTGTCCTTTTATT -3'
6	5'- TTGCACTTTGTGGCTGATTTG -3'
	5'- TAATTTTATTTCAACTAATGATAGAGAGGACAC -3'
7	5'- CAACATAGTACCATATTTTCTCCTTGACATA -3'
	5'- AAGCAAGGCAAGCTTTCAGG -3'
8	5'- CCCACTGTATTCCTTAATTGTAGTAGCTT -3'
	5'- TCCACATGGTTAACGTGTATCTAGAAA -3'
9	5'- TTCAGTGTCAATATATCAAGCCTACTGA -3'
	5'- CACTATGCAATTTTCCATAGAGCAG -3'
10	5'- TGGCTGTCATTGAGTAATTATTCTGC -3'
	5'- TCCCCCTTAACTTATTATTTGATATTG -3'
11	5'- CTGTCTAGGTCAGGTCCTTTAGTAGACTG -3'
	5'- CAGCAGGATAGTTCAGGTGACATT -3'
12	5'- AACCTTTGTCATTGATACCCAACTC -3'
	5'- TCCTCATCAAGCCCCTCGT -3'
13	5'- AGTTCATAAAGACATGAGGTTGATTTACATAA -3'
	5'- CACTCTTTGTTTCATTTGCATTTTCC -3'
14	5'- AGGACAGAAATGGGACAAATGAA -3'
	5'- TTCTAAGGAAGATAACAAATAGTACTGTAACA -3'
15	5'- AGTCTCCTGCAACTTGTCTTTATACTCAT -3'
	5'- TCATTCGTGAGACACTGAGATTTCT -3'
16	5'- AATATTTGATCAGTTACAGTAGTCTCGTTACC -3'
	5'- TGCAAAATCATCATCCACCTTG -3'
17	5'- TCTTCATTTTTGATGCACCATGT -3'
	5'- TTTCTGTTCCCTCCATTCATTTTCAT -3'

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Εκκινητές για αντίδραση PCR του γονιδίου ROBO2 (συνέχεια)	
18	5'- CCTCAGCTCTAAACTAAGGGCCA -3'
	5'- TCTTACTATAGAGTTTCCCCAGTCCTG -3'
19	5'- AAATCTTCCATTTCTTAACGCTTTATATTG -3'
	5'- AAAAAACACAACCTTACCTCCACGG -3'
20	5'- GATAGTTTTGGGCTTCCGGTG -3'
	5'- TGAATCACTAAGTCAAACAACAAATACTAATT -3'
21	5'- CATAAATACACCTTGCCATCTGATG -3'
	5'- TGGCAAAAATGAACAACAGAGAG -3'
22	5'- TGCATGTATGTGTATATGTATTTGTGTCA -3'
	5'- TGTAGTTCATCAGAATCTCTTGTGAATTTATT -3'
23	5'- AAGACAGTATGAGTTACTATAGCATGCATTT -3'
	5'- GGAAGTAGTTGACTTTTGATGCATTTTA -3'
24	5'- AGGTAGATTTACAGGTTAGTCATAGTGCA -3'
	5'- CATGGAGCACGTCTCTTCAGC -3'
25	5'- TGGTAAAGTAGGCCATTACAGTG -3'
	5'- CAAGATTCTTTCTGAATCACGATAGC -3'
26 *	<b>5'- TGCTGGTCAGAAAAGCAGAA -3'</b>
	<b>5'- GAAAGAGTTAAGGTGGGTGGTG -3'</b>

\* Σχεδιασμός με το λογισμικό Primer 3

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για μια αντίδραση PCR, καθώς και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο ROBO2 συνοψίζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 3.2. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μl.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για αντίδραση PCR

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	50-100 ng	1 μl
Taq DNA πολυμεράση (invitrogen)	1 U	0,2 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl)	1x	2,5 μl
Διδεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)	0,2 mM	2,5 μl
Χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl <sub>2</sub> )	2-6 mM αναλόγως	αναλόγως
Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	5% (μόνο στο εξόνιο 26)	1,25 μl
5' εκκινητής	10 pmole/ μl	1 μl
3' εκκινητής	10 pmole/ μl	1 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		τελικός όγκος 25 μl

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή PTC-200 Peltier Thermal Cycler, της εταιρείας MJ Research. Οι συνθήκες των αντιδράσεων βελτιστοποιήθηκαν μετά από ρύθμιση της ποσότητας του χλωριούχου μαγνησίου ( $MgCl_2$ ), τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης, ώστε να παράγεται το επιθυμητό τμήμα DNA χωρίς παραπροϊόντα και σε μεγάλη ποσότητα, ικανή για να γίνει περαιτέρω μελέτη (ισχυρό σήμα στην ηλεκτροφόρηση αгарόζης). Στην περίπτωση του εξονίου 26 απαιτείται και η προσθήκη διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO: Dimethyl sulfoxide) για να αποτρέψει το σχηματισμό δευτεροταγών δομών είτε στο DNA, είτε στους εκκινητές. Οι συνθήκες αντίδρασης PCR φαίνονται στον Πίνακα 3.3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3: Συνθήκες αντίδρασης PCR

Εξόνιο	Μέγεθος προϊόντος PCR	Θερμοκρασία υβριδισμού/ κύκλοι (x30)	$MgCl_2$
1	286 bp	60°	2 mM
2	501 bp	58°	3 mM
3	264 bp	60°	6 mM
4	280 bp	58°	3 mM
5	291 bp	58°	2 mM
6	427 bp	60°	4 mM
7	289 bp	60°	3 mM
8	336 bp	60°	5 mM
9	351 bp	58°	5 mM
10	231 bp	58°	3 mM
11	343 bp	60°	3 mM
12	324 bp	58°	4 mM
13	298 bp	58°	3 mM
14	409 bp	60°	4 mM
15	321 bp	60°	6 mM
16	321 bp	58°	3 mM
17	338 bp	58°	4 mM
18	211 bp	60°	6 mM
19	240 bp	58°	2 mM
20	432 bp	58°	5 mM
21	306 bp	58°	2 mM
22	411 bp	58°	4 mM
23	379 bp	60°	5 mM
24	325 bp	60°	5 mM
25	351 bp	60°	3 mM
<b>26</b>	<b>272 bp</b>	<b>58°</b>	<b>5 mM + DMSO 5%</b>



### 3.2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

---

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία από τις πιο κοινές μεθόδους για τον διαχωρισμό κλασμάτων DNA ή RNA βάσει του μεγέθους τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στο πήκτωμα, μέσα στο οποίο έχουν τοποθετηθεί τα υπό διαχωρισμό κλάσματα, το οποίο αναγκάζει τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα να μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα προς τον θετικό πόλο. Ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την μετανάστευση είναι το μέγεθος των μορίων των νουκλεϊκών οξέων, όσο μεγαλύτερα είναι τόσο πιο αργά κινούνται μέσα στο πήκτωμα. Ακόμα, επηρεάζεται από την δομή των μορίων και την συγκέντρωση της αγαρόζης. Τα γραμμικά μόρια κινούνται πιο αργά από ότι τα κυκλικά, ενώ αύξηση της συγκέντρωσης της αγαρόζης, μειώνει την ταχύτητα μετανάστευσης και επιτρέπει τον διαχωρισμό μικρότερων μορίων. Όσο πιο μεγάλη είναι η τάση που εφαρμόζεται, τα δείγματα κινούνται ταχύτερα, αλλά η ένταση της τάσης περιορίζεται από το γεγονός ότι αυξάνεται η θερμοκρασία και μπορεί να αλλοιωθεί το πήκτωμα, ενώ μειώνεται η ικανότητα διαχωρισμού ειδικά σε κλάσματα με παρεμφερή μεγέθη. Τα πλεονεκτήματα του πηκτώματος αγαρόζης είναι ότι παρασκευάζεται εύκολα, δεν αποδιατάσσονται τα δείγματα λόγω της σύστασής του, είναι πιο στερεό από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και επιπλέον τα δείγματα μπορούν να ανακτηθούν. Τα μοριακά βάρη συγκρίνονται με γνωστή κλίμακα μοριακών βαρών (DNA ladder).

Συνήθως η χρωστική που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό των κλασμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), το οποίο δημιουργεί σύμπλοκο με το DNA και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η αξιολόγηση των αντιδράσεων PCR έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v) σε διάλυμα 1xTBE: 10,8% (w/v) Tris-base, 5,5% (w/v) Boric acid, 20 mM EDTA Na<sub>2</sub>.

Κατά την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, στο μείγμα αγαρόζης/TBE προστίθεται ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10 μg/ml και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια, αποχύνεται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχουν προσαρμοστεί χτένες δημιουργίας πηγαδιών, αφήνεται να στερεοποιηθεί και κατόπιν προστίθεται διάλυμα 1xTBE, ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Πριν την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης: 0,4% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,4% (w/v) κυανό του ξυλενίου, 25% (w/v) φικόλης σε απεσταγμένο νερό σε αναλογία 9:1.

### **3.2.4. Μέθοδος πολυμορφικών διαμορφώσεων μονόκλωνων μορίων (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism)**

---

Η μοριακή αυτή μέθοδος βασίζεται στην κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης κατά την οποία διαχωρίζονται αποδιαταγμένα μονόκλιωνα μόρια νουκλεϊκών οξέων. Βασίζεται στον εντοπισμό μικρών διαφορών στην αλληλουχία των νουκλεϊκών τμημάτων, ακόμη και σε διαφορά μιας μόνο βάσης, που οδηγεί σε διαφορές στην δευτεροταγή δομή του νουκλεϊκού οξέος, καθώς και σε σημαντική διαφορά στην κινητικότητα των μορίων αυτών στο πήκτωμα.

Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA σε ένα πήκτωμα εξαρτάται από το μέγεθος του κλώνου καθώς και από το μήκος του, και έτσι είναι σχετικά ανεξάρτητη από τη νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Όσο αφορά όμως, τα μονόκλιωνα μόρια DNA, η κινητικότητα τους επηρεάζεται από πολύ μικρές διαφορές στην αλληλουχία της νουκλεοτιδικής αλυσίδας, ακόμα και από μια αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου ανάμεσα τους. Αυτές οι μικρές αλλαγές είναι εμφανείς λόγω της μη σταθερής φύσης των μονόκλωνων μορίων DNA. Εξαιτίας της απουσίας του συμπληρωματικού τους κλώνου, το μονόκλινο μόριο μπορεί να οδηγηθεί στην δημιουργία βρόγχων και πτυχώσεων που δίνει σε αυτό μια ξεχωριστή τρισδιάστατη δομή, ανεξάρτητα από το μήκος του. Μια και μοναδική αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου θα μπορούσε να μεταβάλλει την εσωτερική πρωτοταγή δομή των βάσεων της αλληλουχίας, με συνέπεια να μεταβάλλεται και η τρισδιάστατη διαμόρφωση του μορίου. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται αυτό το χαρακτηριστικό των μονόκλωνων μορίων DNA για τον εντοπισμό πολυμορφισμών και/ή μεταλλάξεων σε μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Αποτελεί μια φθηνή και ευαίσθητη μέθοδο για τον εντοπισμό σημειακών νουκλεοτιδικών αλλαγών σε ένα συγκεκριμένο κλάσμα DNA<sup>133,134</sup>.

Υπάρχουν τέσσερις σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μέθοδο SSCP και πρέπει να ληφθούν υπόψη για τον σχεδιασμό της μεθόδου<sup>134</sup>:

1. Το μέγεθος του κλάσματος που ελέγχεται (προϊόν PCR): Το ιδανικό μήκος θεωρείται ότι είναι 150-250 βάσεις, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και κλάσμα μέχρι 300 νουκλεοτίδια. Η διακριτική ικανότητα για τμήματα μήκους <300 βάσεων είναι 70-90% ως προς την ανίχνευση σημειακών αλλαγών.
2. Η σύσταση του πηκτώματος: Το πήκτωμα σε αυτή τη μέθοδο αποτελείται από ακρυλαμίδη. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση είναι αφενός το ποσοστό συνολικής ακρυλαμίδης του πηκτώματος και αφετέρου η αναλογία ακριλαμίδης-δισ ακρυλαμίδης. Αναλόγως του μεγέθους των κλασμάτων που

πρόκειται να διαχωριστούν αλλάζει και η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε ακρυλαμίδη. Συνήθως η πυκνότητα κυμαίνεται από 6-10% ακρυλαμίδη, αλλά μπορεί και να διαφέρει από αυτές τις τιμές. Στο πήκτωμα μπορεί επίσης να προστεθεί γλυκερόλη, η οποία αλλάζει την κινητικότητα των μορίων και αυξάνει την ευαισθησία ανίχνευσης. Τέλος, ρόλο έχει το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) που χρησιμοποιείται για την κατασκευή του πηκτώματος.

3. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση: Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει είτε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) είτε σε θερμοκρασία 4°C συνήθως με την προσθήκη γλυκερόλης. Το σύνηθες είναι να πραγματοποιείται ολονύκτια ηλεκτροφόρηση σε θερμοκρασία δωματίου, σε χαμηλή ισχύ (Volts) ώστε η αύξηση θερμοκρασίας του πηκτώματος να είναι αμελητέα.
4. Η μέθοδος αποδιάταξης του PCR προϊόντος: Η αποδιάταξη τις περισσότερες φορές πραγματοποιείται με θέρμανση του PCR προϊόντος και αμέσως μετά τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για να αποφευχθεί η υβριδοποίηση μέχρι να τοποθετηθούν στο πήκτωμα. Επειδή υπάρχει περίπτωση να συνδεθούν μόλις εισέλθουν στο πήκτωμα, το οποίο δεν περιέχει αποδιατακτικό, προστίθεται φορμαμίδιο (αποδιατακτική ουσία) στην χρωστική που χρησιμοποιείται για να διατηρηθεί η μονόκλωνη δομή των μορίων.

Όλα τα ενισχυμένα δείγματα PCR ελέγχθηκαν σε δυο διαφορετικές συνθήκες για περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν τόσο σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 8%, όσο και σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 8%-γλυκερόλης 5%, σε θερμοκρασία δωματίου.

#### Προετοιμασία πηκτώματος:

Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την παρασκευή των πηκτωμάτων ακρυλαμίδης καθώς και ακρυλαμίδης-γλυκερόλης παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 3.5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για την παρασκευή του πηκτώματος ακρυλαμίδης 8% και ακρυλαμίδης 8%-γλυκερόλης 5%

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>8% ακρυλαμίδη</b>	<b>8% ακρυλαμίδη 5% γλυκερόλη</b>
37:1 Ακρυλαμίδη-Δις ακρυλαμίδη	10 ml	10 ml
10xTBE	5 ml	5 ml
Γλυκερόλη	-	2,5 ml
TEMED	45 μl	45 μl
APS 10%	450 μl	450 μl
Διαλύτης: απεσταγμένο νερό	35 ml	32,5 ml
Τελικός όγκος	50 ml	50 ml

Όπου:

10xTBE: 890 mM Tris base, 890 mM Boric acid, 20 mM EDTA Na<sub>2</sub>

APS: Ammonium Persulfate

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine

Το APS και το TEMED είναι τα δύο αντιδραστήρια που σε συνδυασμό πολυμερίζουν το πήκτωμα ακρυλαμίδιου. Επομένως ετοιμάζεται το μείγμα και η προσθήκη του APS στο διάλυμα γίνεται ακριβώς πριν τοποθετηθεί το πήκτωμα στο καλούπι του. Αφήνεται τουλάχιστον για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει ο πολυμερισμός και να στερεοποιηθεί το πήκτωμα. Μετά το πέρας μίας ώρας, το πήκτωμα μπορεί πλέον να τοποθετηθεί στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και να γίνει η τοποθέτηση των δειγμάτων.

#### Προετοιμασία δειγμάτων:

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται συνήθως 5 μl δείγματος στο οποίο προηγουμένως έχουν προστεθεί 5 μl χρωστικής και έχει αποδιαταχθεί (θέρμανση για 5 min στους 95°C και άμεση τοποθέτηση στον πάγο μέχρι να φορτωθούν στο πήκτωμα).

Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε περιέχει:

95% (v/v)	Formamide	(αποδιατακτική ουσία)
0,05% (w/v)	Bromophenol blue	(χρωστική στα 45 bp σε πήκτωμα 8%)
0,05% (w/v)	Xylen cyanol	(χρωστική στα 160 bp σε πήκτωμα 8%)
20 mM	EDTA	

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται 1ΧΤΒΕ. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί ανάλογα με το μέγεθος του κλάσματος DNA περίπου 20-24 ώρες με ένταση τροφοδοτικού 80-90 V.

#### Χρώση πηκτώματος:

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση των πηκτωμάτων ώστε να μπορέσει να γίνει η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και ο εντοπισμός τυχόν πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων, με τη μορφή διαφορετικού προτύπου ζώνωσης από το φυσιολογικό. Φυσιολογικό εννοείται το πρότυπο ζώνωσης που παρουσιάζεται στην πλειοψηφία των δειγμάτων ή στα δείγματα ελέγχου.

Για τη χρώση ενός πηκτώματος παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα μονιμοποίησης: 10% (v/v) αιθανόλη 100%  
0,5% (v/v) οξικό οξύ  
Σε απεσταγμένο νερό

Διάλυμα χρώσης: 0,1% (w/v) νιτρικό άργυρο  
Σε απεσταγμένο νερό

Διάλυμα εμφάνισης: 1,5% (w/v) καυστικό νάτριο  
0,4% (v/v) φορμαλδεΐδη  
0,01125 (w/v)  $\text{NaBH}_4$   
Σε απεσταγμένο νερό  
Συνεχής ανάδευση και θέρμανση στο heat-block

Τα διαλύματα μονιμοποίησης και εμφάνισης πρέπει να ετοιμάζονται προ της χρήσης.

Τα στάδια που ακολουθούνται για τη χρώση των πηκτωμάτων ακρυλαμίδης είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 200 ml διαλύματος μονιμοποίησης. Επώαση για 3 min.
2. Αναρρόφηση του διαλύματος και προσθήκη των υπολοίπων 200 ml διαλύματος μονιμοποίησης. Επώαση για 3 min.
3. Αναρρόφηση και προσθήκη 200 ml διαλύματος νιτρικού αργύρου. Επώαση για 10 min.
4. Αναρρόφηση διαλύματος νιτρικού αργύρου και προσθήκη απεσταγμένου νερού για την απομάκρυνση περίσσειας νιτρικού αργύρου.

5. Αναρρόφηση απεσταγμένου νερού και προσθήκη 200 ml του διαλύματος εμφάνισης. Επώαση περίπου για 5 min, μέχρι να εμφανιστούν τα προϊόντα.
6. Αναρρόφηση του 3<sup>ου</sup> διαλύματος και προσθήκη απεσταγμένου νερού για την απομάκρυνση των διαλυμάτων.

### **3.2.5. Μέθοδος πολλαπλών περιοριστικών κλασμάτων- πολυμορφικών διαμορφώσεων μονόκλωνων μορίων (MRF-SSCP, Multiple Restriction Fragment-Single Strand Conformation Polymorphism)**

Η μέθοδος αυτή αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου SSCP, στην οποία επιπλέον γίνεται χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών. Συνήθως χρησιμοποιείται για τμήματα DNA που έχουν μεγάλο μήκος και επομένως μειωμένη διακριτική ικανότητα στην κλασική μέθοδο SSCP. Επομένως μετά από πέψη της προς εξέταση αλληλουχίας με περιοριστικά ένζυμα, τα κλάσματα που προκύπτουν είναι μικρότερα των 300 βάσεων και μπορούν να διαχωριστούν με την SSCP. Η διακριτική της ικανότητα επιτρέπει τον εντοπισμό σημειακών νουκλεοτιδικών αλλαγών<sup>135,136</sup>.

Οι θεωρητικές αρχές που διέπουν τη μέθοδο MRF-SSCP είναι ίδιες με αυτές τις κλασικής SSCP, τόσο όσο αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν τη μέθοδο όσο και τους παράγοντες που αφορούν την κινητικότητα των μορίων στο πήκτωμα.

Για τα εξόνια του γονιδίου ROBO2 που είχαν μέγεθος μεγαλύτερο των 300 βάσεων, χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικά ένζυμα ώστε να μπορέσουν τα τμήματα του DNA να διαχωριστούν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7: Μέγεθος των εξονίων, τα ένζυμα που εντοπίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν με προϊόντα πέψης που προέκυψαν

Εξόνιο	Μέγεθος	Ένζυμο	Προϊόντα πέψης (bp)
2	501 bp	BamHI	296,205
6	427 bp	HphI	251,176
8	336 bp	DdeI	136,200
9	351 bp	BsI	125,226
11	343 bp	HincII	54,289
12	324 bp	MaeIII	208,116
14	409 bp	HincII	224,185
16	321 bp	MmeI	198,123
17	338 bp	HphI	159,179
20	432 bp	MmeI	243,189

22	411 bp	HphI	258,153
23	379 bp	DdeI	246,133
24	325 bp	DdeI	174,151
25	351 bp	BamHI	181,170

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων πέψης των προϊόντων PCR ακολουθήθηκαν τα προτεινόμενα πρωτόκολλα (της εταιρείας παραγωγής) για το κάθε ένζυμο. Οι επωάσεις έγιναν στις προτεινόμενες θερμοκρασίες για 18-20 ώρες.

Η μέθοδος αυτή επίσης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του γονοτύπου της ομάδας ελέγχου στην περίπτωση του πολυμορφισμού IVS5-31, γιατί δεν εντοπίστηκε κάποιο ένζυμο που να μπορεί να προσδιορίσει το γονότυπο των ατόμων ως προς τον πολυμορφισμό.

### **3.2.6. Ανάλυση αλληλουχίας DNA (DNA sequencing)**

Η γνώση της ακριβής αλληλουχίας ενός μορίου DNA ή ακόμα και ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού έχει πολύ μεγάλη σημασία στις βιολογικές μελέτες, αλλά και σε πρακτικές καθημερινές εφαρμογές.

Η διαδικασία της ανάλυσης αλληλουχίας του DNA ακολουθεί κάποια βασικά βήματα που συνήθως είναι: (1) η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA (αντίδραση PCR) και ο καθαρισμός του, (2) ανάλυση αλληλουχίας και καθαρισμός του προϊόντος, (3) ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή (capillary electrophoresis) και (4) ανάλυση των δεδομένων με κατάλληλο λογισμικό. Η ανάλυση αλληλουχίας είναι μια απλή μέθοδος που μοιάζει με την αντίδραση PCR. Είναι διαδοχικοί κύκλοι αποδιάταξης, υβριδισμού και επέκτασης της αλληλουχίας σε ένα θερμοκυκλοποιητή, με αποτέλεσμα την εκθετική ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών. Τα προϊόντα στη συνέχεια εμβολιάζονται στα τριχοειδή. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται μέσω ενός πολυμερούς που υπάρχει στα τριχοειδή όπου χρησιμοποιείται υψηλή τάση ώστε το αρνητικά φορτισμένο DNA να μετακινηθεί στο θετικό πόλο. Ακριβώς επειδή η ηλεκτροφόρηση γίνεται με τη χρήση τριχοειδών μπορεί να διαβαστεί κάθε βάση ξεχωριστά. Τα δείγματα περνούν από μία δέσμη laser και γίνεται οπτική ανίχνευση του φθορισμού των βάσεων, οι οποίες είναι σημασμένες με διαφορετικό φθοριόχρωμα. Με κατάλληλο λογισμικό στη συνέχεια μετατρέπεται το φθορίζον σήμα σε ψηφιακό και καθώς η κάθε βάση εκπέμπει διαφορετικό χρώμα γίνεται διαχωρισμός των βάσεων και βρίσκεται η αλληλουχία του επιθυμητού τμήματος<sup>137</sup>.

Κάθε σειρά δειγμάτων αναλύθηκε εις διπλούν πάντα σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης με τις μεθόδους SSCP και MRF-SSCP προέκυψαν δείγματα που παρουσίαζαν διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης. Σε αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας DNA και κάθε φορά, μαζί με αυτά, αναλυόταν επίσης ένα δείγμα με το πρότυπο ζώνωσης που παρατηρούταν σε πλειοψηφία. Τα προϊόντα PCR που ήταν μεγαλύτερα των 300 βάσεων και έπρεπε να γίνει πέψη με τη μέθοδο MRF-SSCP, για την αλληλούχιση στάλθηκαν χωρίς αυτή την επεξεργασία. Η διαδικασία της ανάλυσης αλληλουχίας των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen (Macrogen Europe, Amsterdam, Holland). Τα δείγματα στάλθηκαν για ανάλυση μαζί με τους εκκινητές για το εξόνιο που το προϊόν του παρουσίαζε διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης.

### **3.2.7. Μέθοδος πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών κλασμάτων (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism)**

---

Η τεχνική αυτή, είναι μια μοριακή τεχνική που επιτρέπει την σύγκριση προτύπων συγκεκριμένων κληρονομήσιμων πολυμορφισμών. Επιλεγμένες περιοχές του DNA με το μελετημένο πολυμορφισμό ενισχύονται και πέπτονται με συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού, ειδικά για τον πολυμορφισμό. Στην πράξη με την τεχνική RFLP μπορεί να προσδιοριστεί με βεβαιότητα ο γονότυπος ενός ατόμου, και για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιείται ευρέως, για την ανάλυση γενετικού υλικού. Επιπλέον, εάν ένας πολυμορφισμός εντοπιστεί κοντά στον γενετικό τόπο μιας γενετικής βλάβης μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο δείκτη για την κληρονομική μεταβίβαση της βλάβης<sup>138,139</sup>.

Η μέθοδος RFLP, στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των γονοτύπων του πληθυσμού της ομάδας ελέγχου.

Συνολικά ελέγχθηκαν 200 μάρτυρες με χρήση αυτής της μεθόδου. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία επιλέχθηκε έπειτα από αναζήτηση στην βάση δεδομένων NEBcutter V2.0 ([www.tools.neb.com/NEBcutter2/](http://www.tools.neb.com/NEBcutter2/)). Το περιοριστικό ένζυμο το οποίο επιλέχθηκε για τον πολυμορφισμό IVS1-53 ήταν το MnlI, και η αντίδραση της πέψης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει και κόβει το συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού φαίνεται στην ΕΙΚΟΝΑ 3.1, και επιλέχθηκε καθώς έδινε διαφορετικά προϊόντα πέψης αναλόγως το γονότυπο των ατόμων.



ΕΙΚΟΝΑ 3.1: Αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει και κόβει το ένζυμο MnlI

**Recognition Site:**

5'... CCTC (N)<sub>7</sub>... 3'  
3'... GGAG (N)<sub>6</sub>... 5'

### 3.2.8. Στατιστική ανάλυση

---

Η στατιστική ανάλυση είναι απαραίτητη, ειδικά σε μια μελέτη γενετικής, για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Πραγματοποιείται για την οργάνωση και επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν και από τις πιο συχνές μεθόδους αποτελούν η ισορροπία Hardy-Weinberg και το  $\chi^2$  τεστ του Pearson. Η ισορροπία κατά Hardy-Weinberg είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι πληθυσμοί που χρησιμοποιούνται σε μια μελέτη βρίσκονται σε ισορροπία, δηλαδή οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων παραμένουν σταθεροί από τη μία γενιά στην επόμενη, χωρίς να διαταράσσονται από εξωγενείς παράγοντες, και άρα μπορούν να βγουν αξιόπιστα αποτελέσματα από τη μελέτη τους. Το  $\chi^2$  τεστ στην ουσία αποτελεί μια μέθοδο βέλτιστης προσαρμογής των δεδομένων. Με την μέθοδο αυτή μπορεί να ελεγχθεί αν οι παρατηρούμενες αναλογίες ταιριάζουν με τις αναμενόμενες, σύμφωνα με τους κανόνες κληρονομικότητας, καθώς και αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα των γονοτύπων αλλά και των αλληλομόρφων. Αυτό επιτυγχάνεται υπολογίζοντας την πιθανότητα, δηλαδή το «P value».

Οι πληθυσμοί τόσο των ασθενών, όσο και της ομάδας ελέγχου ελέγχθηκαν και βρέθηκαν σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg. Επίσης πραγματοποιήθηκε το  $\chi^2$  τεστ, ώστε να βρεθούν οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων και το κατά πόσο έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε με το διαθέσιμο στο διαδίκτυο λειτουργικό, Calculation for the Chi-Square Test (<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>).

### 3.2.9. *In silico* ανάλυση για τις νουκλεοτιδικές αλλαγές

---

Οι βάσεις δεδομένων και τα προγράμματα που διατίθενται στο διαδίκτυο για την αξιολόγηση μεταλλάξεων είναι πολυάριθμες. Υπάρχουν διαθέσιμα μέσα αξιολόγησης τόσο για νουκλεοτιδικές αλλαγές/μεταλλάξεις οι οποίες βρίσκονται σε εξονική περιοχή και αλλάζουν το κωδικοποιούμενο αμινοξύ, όσο και για νουκλεοτιδικές αλλαγές/μεταλλάξεις που είτε δεν αλλάζουν το αμινοξύ, είτε βρίσκονται σε ιντρονική

περιοχή και υπάρχει πιθανότητα να επηρεάζουν το μάτισμα. Το μάτισμα είναι η ωρίμανση του mRNA, κατά το οποίο αποκόβονται τα ιντρόνια (μη κωδικοποιούσες περιοχές), ενώ τα εξόνια (κωδικοποιούσες περιοχές) συρράβονται μεταξύ τους. Η αναγνώριση των εξονικών περιοχών γίνεται από αλληλουχίες στην αρχή και στο τέλος τους. Εάν αυτές οι αλληλουχίες αλλάξουν από μια νουκλεοτιδική αλλαγή, μπορεί να επηρεάσουν αφενός τον τρόπο πρόσδεσης των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων που αποκόπτουν τα ιντρόνια και συρράβουν τα εξόνια και αφετέρου να δημιουργήσουν νέες θέσεις πρόσδεσης με αποτέλεσμα να επηρεαστεί τελικά το παραγόμενο πεπτίδιο.

Η *in silico* ανάλυση αποτελεί μια προσομοίωση κάποιας βιολογικής διαδικασίας, και συνυπολογίζεται στα πειραματικά δεδομένα. Εφαρμόστηκαν τα προγράμματα ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/>) και SplicePort (<http://spliceport.cs.umd.edu/>). Το ESEfinder με σάρωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών προβλέπει υποθετικά ESEs (Exonic Splicing Enhancers: εξονικούς προαγωγούς του ματίσματος) που ανταποκρίνονται στις ανθρώπινες SR πρωτεΐνες (SF2/ASF, SC35, SRp40 ή SRp55). Τα ESEs είναι αλληλουχίες που βρίσκονται εσωτερικά των εξονίων και κατευθύνουν ή ενισχύουν το μάτισμα. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των θέσεων ματίσματος για την ωρίμανση του mRNA. Έτσι, με σύγκριση της φυσιολογικής αλληλουχίας και αυτής με την νουκλεοτιδική αντικατάσταση μπορεί να γίνει μια αρχική υπόθεση για το εάν επηρεάζεται η δέσμευση των SR πρωτεϊνών και κατά συνέπεια το μάτισμα. Το πρόγραμμα δέχεται αλληλουχίες DNA και RNA<sup>140</sup>. Το SplicePort είναι εργαλείο ανάλυσης θέσεων διάσπασης και προβλέπει τις πιθανές θέσεις στις αλληλουχίες που υποβάλλονται στο πρόγραμμα. Η αλληλουχία που θα εισαχθεί μπορεί να είναι είτε DNA, είτε RNA και πρέπει να απέχει τουλάχιστον 80 νουκλεοτίδια προς το 5' και 3' άκρο από την νουκλεοτιδική αλλαγή<sup>141</sup>.

Επειδή οι νουκλεοτιδικές αλλαγές που βρέθηκαν εντοπίζονταν σε ιντρονική περιοχή εφαρμόστηκαν τα προγράμματα ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/>) και SplicePort (<http://spliceport.cs.umd.edu/>). Εισήχθη στα δύο λογισμικά η φυσιολογική αλληλουχία DNA με το προγονικό αλληλόμορφο και η αλληλουχία που έφερε τον πολυμορφισμό. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πρόγραμμα ESEfinder ήταν υπό την μορφή γραφήματος, όπου με διαφορετικά χρώματα συμβολίζονται οι διαφορετικές SR πρωτεΐνες. Το SplicePort, στα αποτελέσματα (output) δίνει πληροφορίες όπως για τις θέσεις διάσπασης και το FGA score για κάθε θέση. Ο FGA (feature generation algorithm) είναι ένας αλγόριθμος που χρησιμεύει για κατάταξη αλληλουχιών και έχει μεγάλο ποσοστό ευστοχίας.

### **3.2.10. *In silico* ανάλυση για μεθυλίωση (CpG νησίδες), miRNAs και μεταθετά στοιχεία**

---

#### **3.2.10.1. Μεθυλίωση (CpG νησίδες)**

---

Ο εντοπισμός γενωμικών αλληλουχιών που είναι πλούσιες σε CpG νησίδες είναι σημαντικός, καθώς αυτές οι περιοχές είναι στόχοι της μεθυλίωσης και σχετίζονται με την έκφραση των γονιδίων στα οποία εδράζονται. Προς αυτή την κατεύθυνση, το *in silico* πρόγραμμα EMBOSS CpGPlot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) καθιστά δυνατό τον εντοπισμό περιοχών με μεγάλο φορτίο σε CpG νησίδες.

Εισήχθηκε στο πρόγραμμα EMBOSS CpGPlot η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδίου ROBO2 ώστε να εντοπιστούν οι περιοχές που περιέχουν CpG νησίδες.

#### **3.2.10.2. miRNAs**

---

Τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν επιγενετικά τη γονιδιακή έκφραση. Η βάση δεδομένων miRBase (<http://www.mirbase.org/>) δίνει τη δυνατότητα, με τη χρήση της αλληλουχίας του εξεταζόμενου γονιδίου, αφενός να προσδιοριστεί η εμφάνιση νέων miRNA και αφετέρου να ελεγχθεί για συμπληρωματικότητα με ήδη γνωστά miRNAs.

Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων (miRBase) δέχεται αλληλουχίες DNA, μεγέθους μέχρι 1000 βάσεις. Σε αυτό εισήχθησαν ξεχωριστά οι αλληλουχίες των 26 εξονίων του γονιδίου ROBO2 και τα ιντρονικά όρια τους, για να ελεγχθεί εάν σε αυτό προσδένονται miRNAs με υψηλή συγγένεια.

#### **3.2.10.3. Μεταθετά στοιχεία**

---

Τα μεταθετά στοιχεία, εκτός από το ρόλο τους στην γενωμική επαναδιάταξη, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε δομικές και λειτουργικές ιδιότητες του γενώματος. Από δομικής άποψης, έχει προταθεί ότι η παρουσία τους στο γένωμα συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης<sup>124</sup>, ενώ από λειτουργικής άποψης θεωρούνται ακόμα και ως παράγοντες πολυδυναμίας<sup>142</sup>. Η ύπαρξη μεταθετών στοιχείων σε μία αλληλουχία μπορεί να ελεγχθεί με τη χρήση της βάσης δεδομένων UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) και το *in silico* λογισμικό RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>). Συγκεκριμένα, η πρώτη μέσω της λειτουργίας

GenomeBrowser παρέχει μία σειρά διαφορετικών γενωμικών πληροφοριών για την εισαγόμενη αλληλουχία, ενώ σε συνεργασία με το RepeatMasker καθιστά δυνατό τον εντοπισμό ομολογίας της υπό έλεγχο αλληλουχίας με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, όπως είναι τα μεταθετά στοιχεία, και χαμηλής πολυπλοκότητας αλληλουχίες. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας και το είδος των μεταθετών στοιχείων που απαντούν στην υπό έλεγχο αλληλουχία.

Στη βάση δεδομένων UCSC Genome Bioinformatics και το λογισμικό RepeatMasker εισήχθηκε ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδίου ROBO2 για να αξιολογηθεί η περιεκτικότητα του γονιδίου σε πλήρη ή κολοβωμένα μεταθετά στοιχεία.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Ομάδα ασθενών

---

Πραγματοποιήθηκε γενετικός έλεγχος για το γονίδιο *ROBO2* σε συνολικά 103 ασθενείς (56 αγόρια και 47 κορίτσια), ΜΟ ηλικίας  $1,5 \pm 2,3$  (αγόρια  $1,18 \pm 2,4$  και κορίτσια  $1,9 \pm 2,1$ ). Οι ασθενείς που ελέγχθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν βάση των συγγενών ανωμαλιών που εμφάνιζαν στις εξής ομάδες:

1. Πρωτοπαθής ΚΟΠ ως μεμονωμένη διαταραχή 55 ασθενείς
2. Πρωτοπαθής ΚΟΠ με συνοδό νεφρική υποπλασία-δυσπλασία 38 ασθενείς
3. Οικογενής πρωτοπαθής ΚΟΠ 10 ασθενείς  
(5 οικογένειες)

Στον πίνακα 4.1 φαίνεται η κατανομή των συγγενών ανωμαλιών που μελετήθηκαν με βάση το φύλο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1: Κατανομή συγγενών ανωμαλιών στους ασθενείς ανάλογα με το φύλο.

	<b>Άρρενες</b> <b>n (%)</b>	<b>Θήλεις</b> <b>n (%)</b>
Μεμονωμένη ΚΟΠ	29 (52)	26 (55)
ΚΟΠ/ΝΥΔ	25 (45)	13 (28)
Οικογενής ΚΟΠ	2 (3)	8 (17)

Στους ανωτέρω ασθενείς ελέγχθηκαν και τα 26 εξόνια του γονιδίου *ROBO2*, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονικών τους ορίων. Ο γενετικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους SSCP (προϊόν PCR  $\leq 300$  βάσεις) και MRF-SSCP (προϊόν PCR  $> 300$  βάσεις). Όπου παρατηρήθηκε διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης, τα δείγματα ελέγχθηκαν και με ανάλυση αλληλουχίας DNA, για να προσδιοριστεί εάν υπήρχε νουκλεοτιδική αλλαγή στο δείγμα, πάντα σε σύγκριση με κάποιο δείγμα αναφοράς.

Ανάμεσα στους ασθενείς, εντοπίστηκαν δύο πολυμορφισμοί: ο IVS1-53 (rs9874095 [G>A]), στο 5' ιντρονικό όριο του εξονίου 2 και ο IVS5-31 (rs76571990 [A>G]), στο 5' ιντρονικό όριο του εξονίου 6. Οι αλληλουχίες που ενισχύθηκαν για τον έλεγχο παρουσιάζονται παρακάτω, όπου ο πολυμορφισμός σημειώνεται σε αγκύλη με έντονη

γραμματοσειρά, η αλληλουχία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση με υπογραμμισμένη γραμματοσειρά, οι ιντρονικές περιοχές με κεφαλαία γράμματα και οι εξονικές με κεφαλαία έντονα γράμματα:

### **εξόνιο 2**

5'CGAAGAGTTTAATTTCCCCATCAGGAACCCAAGTGAAACCGA**[G>A]**GGTTTAGATAAGGA  
AATGTTAAAGCTTGTCTTTATTCCGTCATGTTTTGTAG**GATCGCGTCTTCGCCAGGAGGACT**  
**TTCCCCCGCGGATTGTGGAGCATCCTTCCGATGTCATCGTCTCTAAGGGCGAGCCCAC**  
**GACTCTGAACTGCAAGGCGGAGGGCCGCCAACGCCACCATTGAGTGGTACAAAGA**  
**TGGGGAGCGAGTGGAGACTGACAAGGACGATCCCCGGTCCCACAGGATGCTTCTGCC**  
**CAGCGGATCCTTATTCTTCTTGCGCATCGTGACGGGCGCAGGAGTAAACCTGATGAA**  
**GGAAGCTACGTTTGTGTTGCGAGGAACTATCTTGGTGAAGCAGTGAGTCGAAATGCGT**  
**CTCTGGAAGTGGCAT**GTAAGTGAACATAATGAACCTCATGTGCACATTTACTTTTTATTTATTT  
CAAGTAAGTTTTGATGTGTTCCCATAGACGC 3'

Όπου [G>A], σημαίνεται ο πολυμορφισμός, δηλαδή η αντικατάσταση του προγονικού αλληλόμορφου [G] από το αλληλόμορφο [A]. Ο πολυμορφισμός απέχει 52 νουκλεοτιδικές βάσεις από την αρχή του εξονίου 2.

### **εξόνιο 6**

5'TTGCACTTTGTGGCTGATTTGTGTGTGTGTGATTTGTGTTTAGGTAAAATACAGTATAAAAA  
GAAAAATGAAGATGAATACTTAATGTTATTATCCGTATAGCTACTACT**[A>G]**TTTAATAAAAC  
CAGTTCATTTTCTACACAG**GTATGACATCAAAGACGATTACACACTAAGAATTA**AAAA**AGAC**  
**CCATGAGTACAGATGAAGGCACCTATATGTGTATTGCTGAGAATCGGGTTGGAAAAAT**  
**GGAAGCCTCTGCTACACTCACCGTCCGAG**GTAAGAGATTTAAGATGTCAAAGATAATTGAA  
CCAGGAGACTAATATTTGGTTAAATTGGTAAGTGAACCTACGATCAAAATAATGAATTTATGCTG  
TTTTGTTGTAATAAAATGCCTAGATTTTTGTCCTCTCTATCATTAGTTGAAATAAAATTA 3'

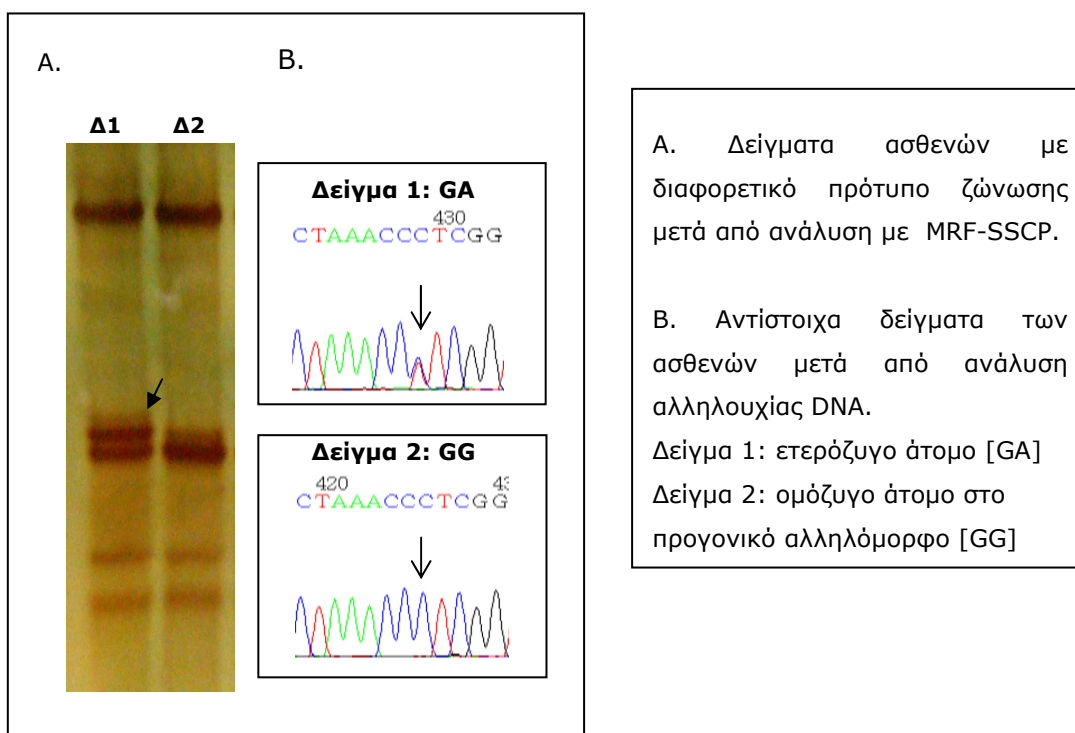
Όπου [A>G], σημαίνεται ο πολυμορφισμός, δηλαδή η αντικατάσταση του προγονικού αλληλόμορφου [A] από το αλληλόμορφο [G]. Ο πολυμορφισμός απέχει 30 νουκλεοτιδικές βάσεις από την αρχή του εξονίου 6.

Αναλυτικότερα ως προς τον πολυμορφισμό IVS1-53 [G>A]:

Σε 27 από τους 103 ασθενείς παρατηρήθηκε διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης κατά την ηλεκτροφόρηση MRF-SSCP, με την παρουσία μίας επιπλέον ζώνης (EIKONA 4.1.A). Σε αντιπροσωπευτικά δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας DNA και

εντοπίστηκε η νουκλεοτιδική αλλαγή [G>A] (ΕΙΚΟΝΑ 4.1.B), η οποία ήταν ήδη καταχωρημένη στη βάση δεδομένων NCBI (λογισμικό SNP, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) με κωδικό rs9874095. Η ανάλυση αλληλουχίας DNA πραγματοποιήθηκε: σε έναν ασθενή που παρουσίαζε διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης και έναν ασθενή με το πρότυπο που εμφανιζόταν σε πλειοψηφία, με σκοπό να προσδιοριστούν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στα πρότυπα ζώνωσης που παρατηρήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση MRF-SSCP. Από τους ασθενείς οι 27, οι οποίοι εμφάνιζαν το διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης στην ηλεκτροφόρηση MRF-SSCP, παρουσίαζαν τον πολυμορφισμό σε ετερόζυγη μορφή [GA], ενώ οι υπόλοιποι 76, ήταν ομόζυγοι στο προγονικό αλληλόμορφο [GG]. Δεν παρατηρήθηκε κανένας ασθενής ομόζυγος για τον πολυμορφισμό [AA] (ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2).

ΕΙΚΟΝΑ 4.1: Δείγματα ασθενών με τα διαφορετικά πρότυπα ζώνωσης που παρατηρήθηκαν στο εξόνιο 2 και αντίστοιχα δείγματα μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA.

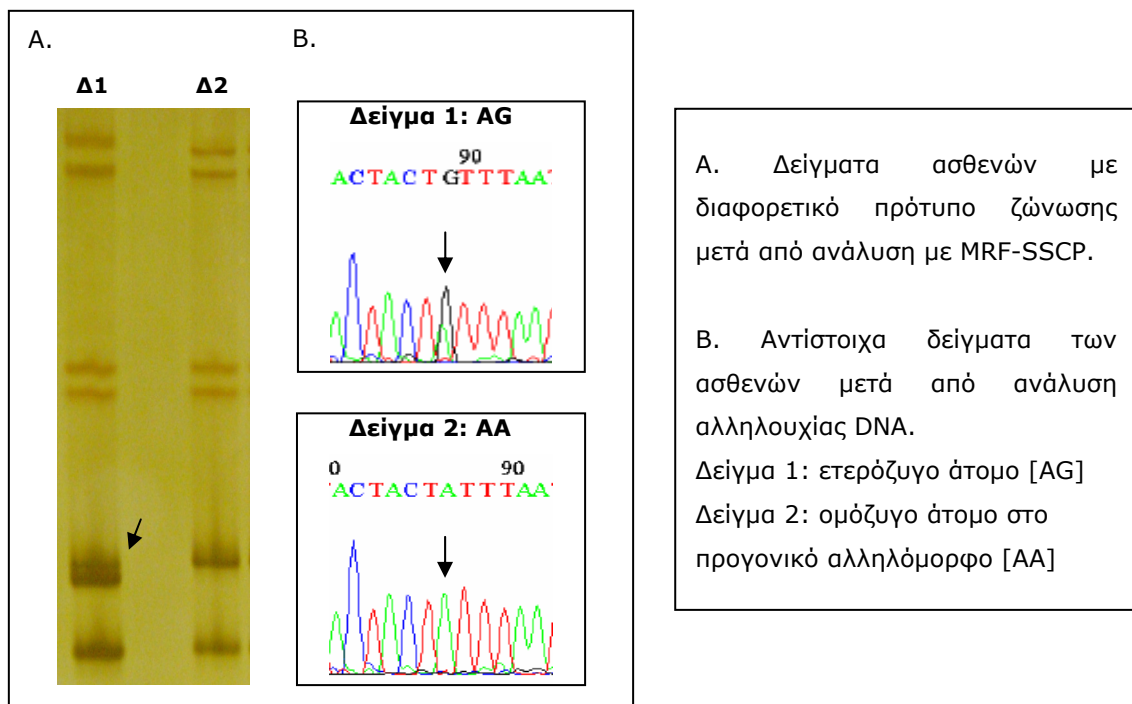


Αναλυτικότερα ως προς τον πολυμορφισμό IVS5-31 [A>G]:

Κατά την ανάλυση με την μέθοδο MRF-SSCP παρατηρήθηκε σε έναν μόνο ασθενή με μεμονωμένη ΚΟΠ, διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης (ΕΙΚΟΝΑ 4.2.A). Για να εξακριβωθεί ο γονότυπος, πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ανάλυση αλληλουχίας DNA στο δείγμα

με το διαφορετικό πρότυπο, καθώς και σε δείγμα με το πρότυπο ζώνωσης που εμφανιζόταν στην πλειοψηφία των δειγμάτων, ως δείγμα αναφοράς. Εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός IVS5-31 σε ετερόζυγη κατάσταση (ΕΙΚΟΝΑ 4.2.B), ο οποίος επίσης ήταν καταγεγραμμένος με rs76571990 στη βάση δεδομένων NCBI (λογισμικό SNP).

ΕΙΚΟΝΑ 4.2: Δείγματα ασθενών με τα διαφορετικά πρότυπα ζώνωσης που παρατηρήθηκαν στο εξόνιο 6 και αντίστοιχα δείγματα μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA.



#### 4.2. Ομάδα ελέγχου

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, στην ομάδα των ασθενών βρέθηκαν δύο πολυμορφισμοί και για κάθε έναν από αυτούς ελέγχθηκαν 200 δείγματα αναφοράς προερχόμενα από παιδιά με φυσιολογικό απεικονιστικό έλεγχο ουροποιητικού (υπερηχογράφημα και κυστεοουρηthroγραφία), ώστε να διαπιστωθεί η κατανομή των πολυμορφισμών αυτών στον υγιή πληθυσμό.

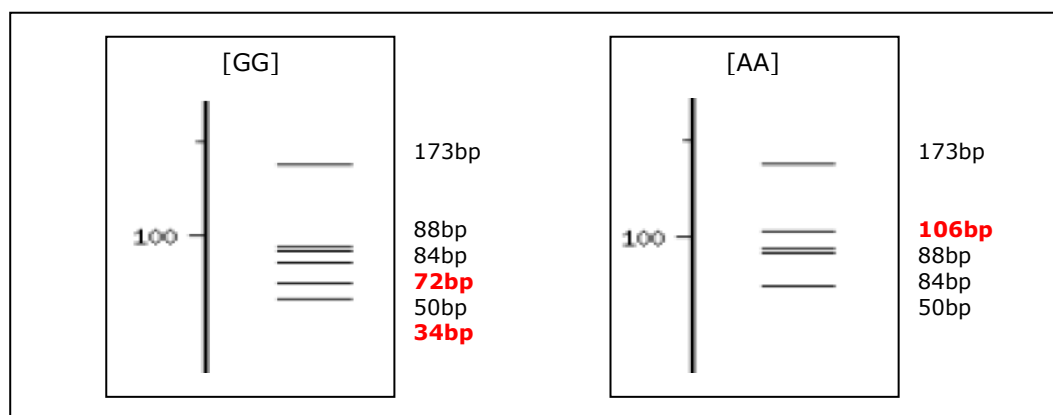
Αναλυτικότερα ως προς τον πολυμορφισμό IVS1-53 [G>A] στην ομάδα ελέγχου:

Τα δείγματα αναφοράς, ελέγχθηκαν επίσης με τη μέθοδο MRF-SSCP. Παρατηρήθηκαν τα δύο ήδη γνωστά πρότυπα ζώνωσης που είχαν βρεθεί και στην ομάδα των ασθενών,



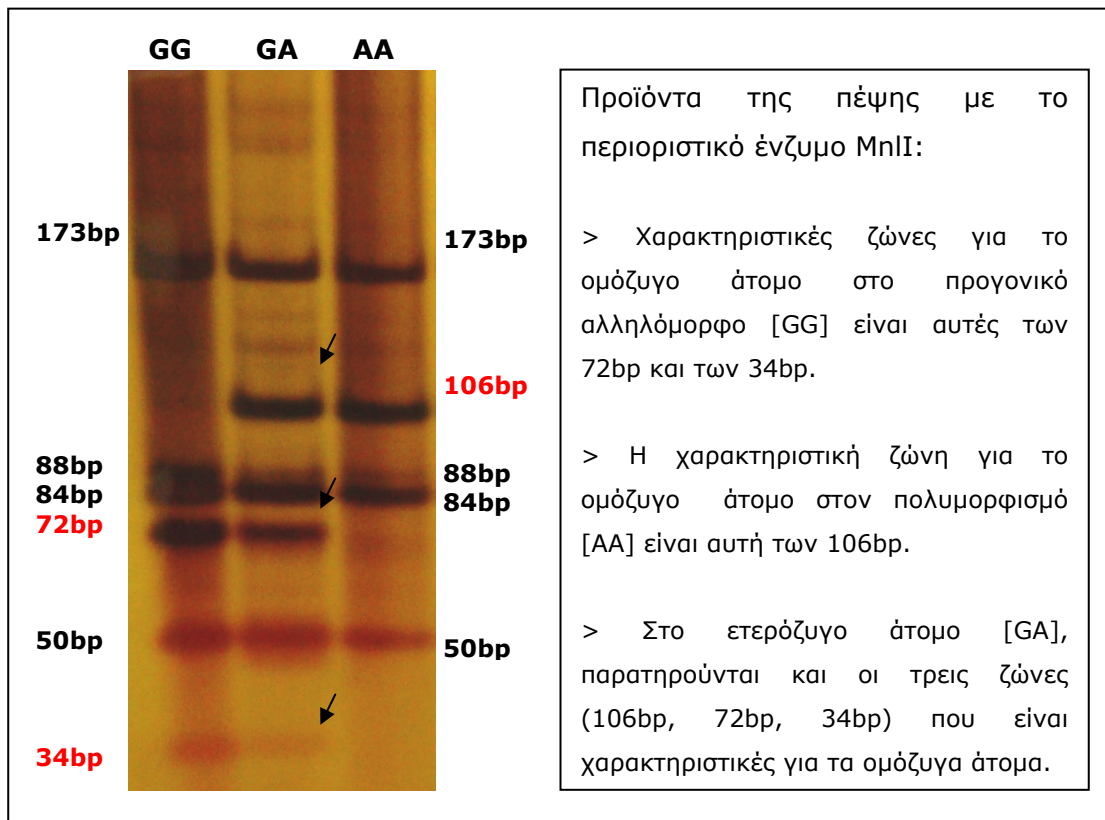
και τα οποία από την ανάλυση αλληλουχίας DNA που πραγματοποιήθηκε στην ομάδα των ασθενών αντιστοιχούσαν στον ομοζυγώτη στο προγονικό αλληλόμορφο [GG] και τον ετεροζυγώτη [GA]. Επιπλέον στην ομάδα ελέγχου παρουσιάστηκε ένα τρίτο πρότυπο ζώνωσης στην MRF-SSCP, το οποίο θεωρήθηκε ότι αντιστοιχούσε σε ομοζυγώτη στον πολυμορφισμό [AA]. Για να επιβεβαιωθεί η θεωρία, τρία αντιπροσωπευτικά δείγματα, τα δύο με πρότυπο ζώνωσης που αντιστοιχούσε στους δύο γνωστούς γονότυπους [GG και GA] και το τρίτο με το νεοεμφανιζόμενο πρότυπο ζώνωσης, ελέγχθηκαν με τη μέθοδο RFLP για να προσδιοριστεί ο γονότυπος τους. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα NEBcutter προσδιορίστηκε ότι το κατάλληλο ένζυμο για την πραγματοποίηση της μεθόδου είναι το MnlI και μετά από πέψη με αυτό οι ομοζυγώτες στο προγονικό αλληλόμορφο [GG] και στον πολυμορφισμό [AA], θα παρουσιάζουν τα πρότυπα ζώνωσης που φαίνονται στην ΕΙΚΟΝΑ 4.3. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα δεν έδινε το πρότυπο ζώνωσης για τον ετεροζυγώτη, αλλά ο ετεροζυγώτης θα πρέπει να εμφανίζει και τις τρεις χαρακτηριστικές μπάντες για τους ομοζυγώτες, που σημειώνονται στην εικόνα με κόκκινο.

ΕΙΚΟΝΑ 4.3: Αναμενόμενα πρότυπα ζώνωσης μετά από πέψη με το ένζυμο MnlI, βάσει του NEBcutter στην ομάδα ελέγχου



Τα τρία αντιπροσωπευτικά δείγματα που παρουσίαζαν διαφορετικά πρότυπα ζώνωσης στην MRF-SSCP, ενισχύθηκαν εκ νέου με PCR και στα προϊόντα έγινε πέψη με το ένζυμο MnlI. Μετά την πέψη απεικονίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και όχι αγαρόζης για μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Τα αποτελέσματα (ΕΙΚΟΝΑ 4.4) συμφωνούσαν με τα αναμενόμενα πρότυπα από το πρόγραμμα NEBcutter και επιβεβαίωσαν ότι το νεοεμφανιζόμενο πρότυπο ζώνωσης που παρατηρήθηκε με τη μέθοδο MRF-SSCP, αντιστοιχούσε σε ομοζυγώτη στον πολυμορφισμό [AA].

ΕΙΚΟΝΑ 4.4: Προσδιορισμός του γονοτύπου των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου με τη μέθοδο RFLP.



Το μεσαίο δείγμα στην εικόνα, το ετερόζυγο άτομο, όπως αναμενόταν παρουσιάζει και τις τρεις χαρακτηριστικές ζώνες των ομόζυγων ατόμων, οι οποίες σημειώνονται με βέλος και κόκκινη γραμματοσειρά.

Συνολικά στην ομάδα ελέγχου βρέθηκαν και οι τρεις πιθανοί γονότυποι (ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3), σε αντίθεση με την ομάδα των ασθενών όπου δεν παρατηρήθηκε κανένα άτομο με ομοζυγωτία στον πολυμορφισμό.

#### Αναλυτικότερα ως προς τον πολυμορφισμό IVS5-31 [A>G] στην ομάδα ελέγχου:

Ο δεύτερος πολυμορφισμός, όπως αναφέρθηκε βρέθηκε σε ένα μόνο ασθενή. Για αυτόν, επίσης ελέγχθηκαν 200 δείγματα υγιών ατόμων για να προσδιοριστεί η κατανομή του στον πληθυσμό. Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο MRF-SSCP αφού πρώτα είχε προσδιοριστεί το πρότυπο ζώνωσης, που αντιστοιχούσε σε ετεροζυγώτη, από την ανάλυση αλληλουχίας DNA που είχε πραγματοποιηθεί για τους ασθενείς. Δεν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP, για επιβεβαίωση των γονοτύπων, καθώς δεν

βρέθηκε κάποιο ένζυμο σύμφωνα με το πρόγραμμα NEBcutter που να μπορεί να δώσει διαφορετικά προϊόντα παρουσία ή μη του πολυμορφισμού.

Ο IVS5-31 πολυμορφισμός δεν εντοπίστηκε σε κανένα άτομο της ομάδας ελέγχου.

### 4.3. Στατιστική ανάλυση

Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και συγκρίσεις μεταξύ ασθενών και μαρτύρων πραγματοποιήθηκε μόνο για τον IVS1-53, χρησιμοποιώντας το  $\chi^2$  τεστ. Όσο αφορά τον δεύτερο πολυμορφισμό, τον IVS5-31, δεν ήταν δυνατή η διεξαγωγή στατιστικής ανάλυσης, καθώς βρέθηκε μόνο σε έναν ασθενή.

#### 4.3.1. Πολυμορφισμός IVS1-53G>A

Υπολογίστηκαν οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των ομάδων των ασθενών και των μαρτύρων (ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3). Επιβεβαιώθηκε βάσει των αποτελεσμάτων ότι τόσο ο πληθυσμός των ασθενών όσο και ο πληθυσμός της ομάδας ελέγχου βρίσκεται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg.

Πίνακας 4.4: Γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες ασθενών και μαρτύρων

	<b>Ασθενείς συνολικά</b> n=103	<b>Μεμονωμένη ΚΟΠ</b> n=55	<b>ΚΟΠ/ΝΥΔ</b> n=38	<b>Οικογενής ΚΟΠ</b> n=10	<b>Μάρτυρες</b> n=200
<b>Αλληλόμορφα</b>					
<b>n (%)</b>					
G	179 (87)	97 (88)	62 (82)	20 (100)	322 (80)
A	27 (13)	13 (12)	14 (18)	0 (0)	78 (20)
<b>Γονότυποι</b>					
<b>n (%)</b>					
GG	76 (74)	42 (76)	24 (63)	10 (100)	129 (64)
GA	27 (26)	13 (24)	14 (37)	0 (0)	64 (32)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (4)

Κατά την στατιστική επεξεργασία, εξαιτίας του μικρού αριθμού ασθενών στην ομάδα της οικογενούς ΚΟΠ και τον μηδενικό αριθμό ασθενών με γονότυπο AA, προέκυψε σφάλμα, το οποίο λύθηκε με ομαδοποίηση ορισμένων κατηγοριών. Η ομάδα της οικογενούς ΚΟΠ ενσωματώθηκε στην ομάδα της ΚΟΠ και οι ομάδες με γονότυπο AA και GA ενοποιήθηκαν, τόσο στην ομάδα των ασθενών, όσο και στην ομάδα ελέγχου. Επίσης στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και σε σχέση με το φύλο. Οι τελικές τιμές των συχνοτήτων, με τις οποίες έγινε η στατιστική επεξεργασία, φαίνεται στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5: Γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες του IVS1-53 πολυμορφισμού ασθενών και μαρτύρων σε σχέση με το φύλο και τη συγγενή ανωμαλία ουροποιητικού

Αλληλόμορφα n (%)	ΚΟΠ†		ΚΟΠ/ΝΥΔ		Άρρνες ασθενείς		Άρρνες ΚΟΠ		Θήλεις ασθενείς		Θήλεις ΚΟΠ/ΝΥΔ		Μάρτυρες		Θήλεις μάρτυρες									
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)								
<b>G</b>	179	(87)	117	(90)	62	(82)	94	(84)	55	(89)	39	(78)	85	(90)	62	(91)	23	(88)	322	(80)	114	(84)	208	(79)
<b>A</b>	27	(13)*	13	(10)*	14	(18)	18	(16)	7	(11)	11	(22)	9	(10)*	6	(9)*	3	(12)	78	(20)	22	(16)	56	(21)
<b>GG</b>	76	(74)	52	(80)	24	(63)	38	(68)	24	(77)	14	(56)	38	(81)	28	(82)	10	(77)	129	(64)	49	(72)	80	(61)
<b>GA/AA</b>	27	(26)	13	(20)*	14	(37)	18	(32)	7	(23)	11	(44)	9	(19)*	6	(18)*	3	(23)	71	(36)	19	(28)	52	(39)

†ΚΟΠ: κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση (συμπεριλαμβανομένης και της οικογενούς ΚΟΠ)  
ΚΟΠ/ΝΥΔ: ΚΟΠ με συνυπόδι νεφρική υποδιπλασία

\*p<0.05, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ομάδες των μαρτύρων

Στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το αλληλόμορφο A παρατηρήθηκε στο σύνολο των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0,05$ ). Ως προς το αλληλόμορφο A και τον γονότυπο GA/AA παρατηρήθηκε επίσης στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ομάδα με ΚΟΠ και στην ομάδα των θήλεων με ΚΟΠ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0,05$ ). Η στατιστικώς σημαντική διαφορά ήταν υπέρ της ομάδας ελέγχου, δηλαδή είχαν σε μεγαλύτερη συχνότητα το μη προγονικό αλληλόμορφο A και τον γονότυπο GA/AA από ότι οι ασθενείς.

#### 4.3.2. Πολυμορφισμός IVS5-31A>G

Επειδή ο πολυμορφισμός αυτός βρέθηκε μόνο σε έναν ασθενή όπως ήδη αναφέρθηκε δεν ήταν δυνατή η στατιστική ανάλυση με το  $\chi^2$  τεστ, ωστόσο οι πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg.

#### 4.3.3. Κίνδυνος επανεμφάνισης συγγενών ανωμαλιών στην οικογένεια

Η ομάδα των ασθενών αποτελείται όπως έχει αναφερθεί από 103 άτομα. Από τη μελέτη του οικογενειακού ιστορικού τους, υπολογίστηκε ο αριθμός των συνολικών παιδιών κάθε οικογένειας και πόσα από αυτά έπασχαν. Επίσης σε καμία περίπτωση δεν αναφέρθηκε γονέας να πάσχει. Εκτός από τις πέντε οικογένειες με δύο ασθενή παιδιά που κατατάχθηκαν στην ομάδα με πρωτοπαθή ΚΟΠ, υπήρχε και άλλη μία οικογένεια με δύο παιδιά που νοσούσαν, αλλά ενώ το ένα έπασχε από πρωτοπαθή ΚΟΠ, το δεύτερο είχε ΚΟΠ/ΝΥΔ.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο κίνδυνος επανεμφάνισης κάποιας ανωμαλίας σε μία οικογένεια (ΠΙΝΑΚΑΣ 4.6), ο οποίος βρέθηκε να είναι 10,34% σε οικογένειες με πάνω από ένα παιδιά. Στον υπολογισμό δεν συνυπολογίστηκαν οι οικογένειες με ένα παιδί, καθώς θα αλλοίωναν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.6: Κίνδυνος επανεμφάνισης ανωμαλίας στις οικογένειες.

Οικογένειες με $\geq 2$ παιδιά	Οικογένειες με πάνω από έναν πάσχοντα (2 πάσχοντες)	Κίνδυνος επανεμφάνισης %
58	6	<b>10,34%</b>

#### 4.4. *In silico* ανάλυση για τις νουκλεοτιδικές αλλαγές

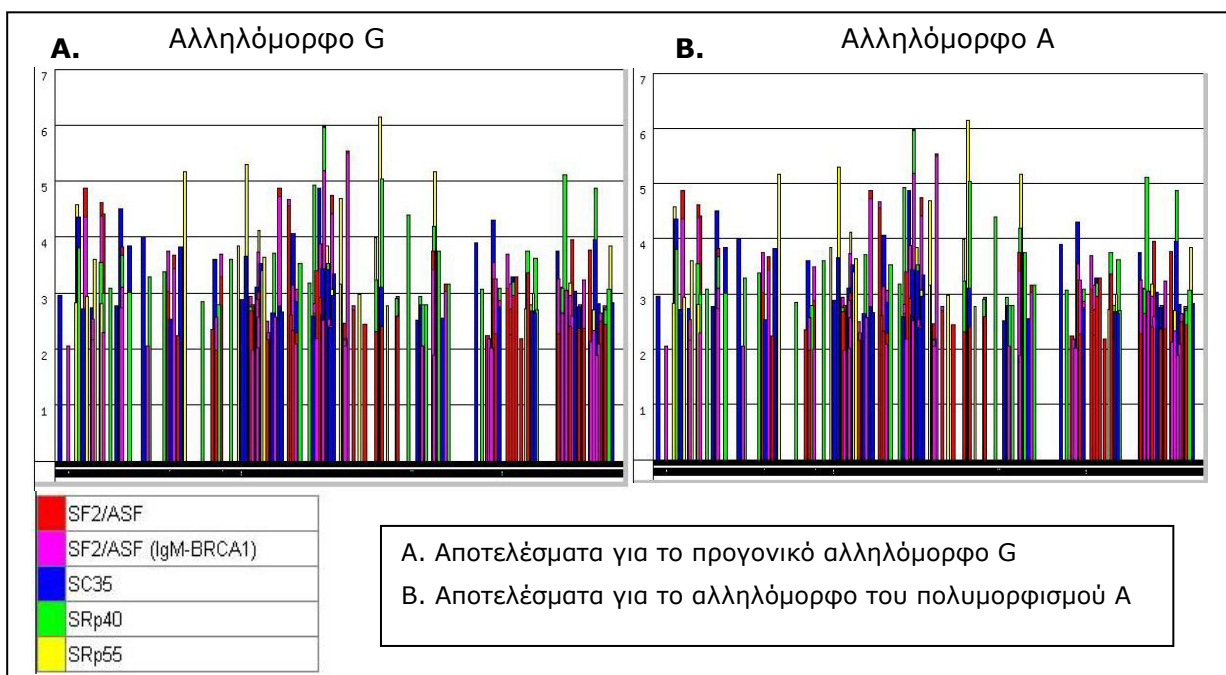
Όπως ήδη αναφέρθηκε για την *in silico* ανάλυση για τους πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/>) και SplicePort (<http://spliceport.cs.umd.edu/>) καθότι βρίσκονται σε ιντρονική περιοχή. Η *in silico* ανάλυση είχε σκοπό να αξιολογήσει την επίδραση των δύο πολυμορφισμών που βρέθηκαν στο μάτισμα του mRNA, δηλαδή εάν επηρεάζεται η απομάκρυνση των ιντρονικών περιοχών και η συρραφή των εξονικών μεταξύ τους.

##### 4.4.1. Πολυμορφισμός IVS1-53G>A

#### Πρόγραμμα ESEfinder

Τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα ESEfinder, όσο αφορά την επίδραση του πολυμορφισμού IVS1-53 στην αναγνώριση ESEs ώστε να αναγνωρίζονται οι αλληλουχίες των θέσεων ματίσματος (υπεύθυνων για την ωρίμανση του mRNA), παρουσιάζονται παρακάτω. Με χρήση του προγράμματος ESEfinder προβλέφθηκε εάν επηρεάστηκε η πρόσδεση των SR πρωτεϊνών σε ESEs, παρουσία του πολυμορφισμού IVS1-53. Παρουσιάζεται πρώτη η ανάλυση για το προγονικό αλληλόμορφο G και δεύτερη η ανάλυση για το αλληλόμορφο A που αντιπροσωπεύει τον πολυμορφισμό (ΕΙΚΟΝΑ 4.5).

ΕΙΚΟΝΑ 4.5: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα ESEfinder για την πρόσδεση των SR πρωτεϊνών για τον πολυμορφισμό IVS1-53.



Δε βρέθηκε διαφορά στα γραφήματα μεταξύ των δύο αλληλομόρφων και επομένως δεν θεωρείται πως ο πολυμορφισμός IVS1-53 επηρεάζει το μάτισμα του mRNA.

### Πρόγραμμα SplicePort

Τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα SplicePort αφορούν τις αλληλουχίες δότες και δέκτες και υπολογίζονται χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο, για να προβλέψει θέσεις διάσπασης. Ο πολυμορφισμός IVS1-53, ελέγχθηκε και με αυτό το λογισμικό, εκτός από το ESEfinder και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 4.6.

ΕΙΚΟΝΑ 4.6: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα SplicePort για τον πολυμορφισμό IVS1-53

Αποτελέσματα για το αλληλόμορφο G:

Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.5%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.5% for AG locations.  
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.8%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.2% for GT locations.

Show:	<input type="button" value="Acceptor"/> <input type="button" value="Donor"/>	Location:	Short Sequence:	Score Threshold: 0
Acceptor:		484	tttgtaggatcg	1.39108
Acceptor:		668	cccacaggatgc	1.30059
Donor:		780	aagcagtgagtc	0.378169
Donor:		811	ggcatgtaagtg	1.11382
Donor:		862	ttcaagtaagtt	0.813612
Donor:		983	ttgtagtaagtt	0.440838

Αποτελέσματα για το αλληλόμορφο A:

Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.5%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.5% for AG locations.  
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.8%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.2% for GT locations.

Show:	<input type="button" value="Acceptor"/> <input type="button" value="Donor"/>	Location:	Short Sequence:	Score Threshold: 0
Acceptor:		484	tttgtaggatcg	1.25089
Acceptor:		668	cccacaggatgc	1.30059
Donor:		780	aagcagtgagtc	0.378169
Donor:		811	ggcatgtaagtg	1.11382
Donor:		862	ttcaagtaagtt	0.813612
Donor:		983	ttgtagtaagtt	0.440838



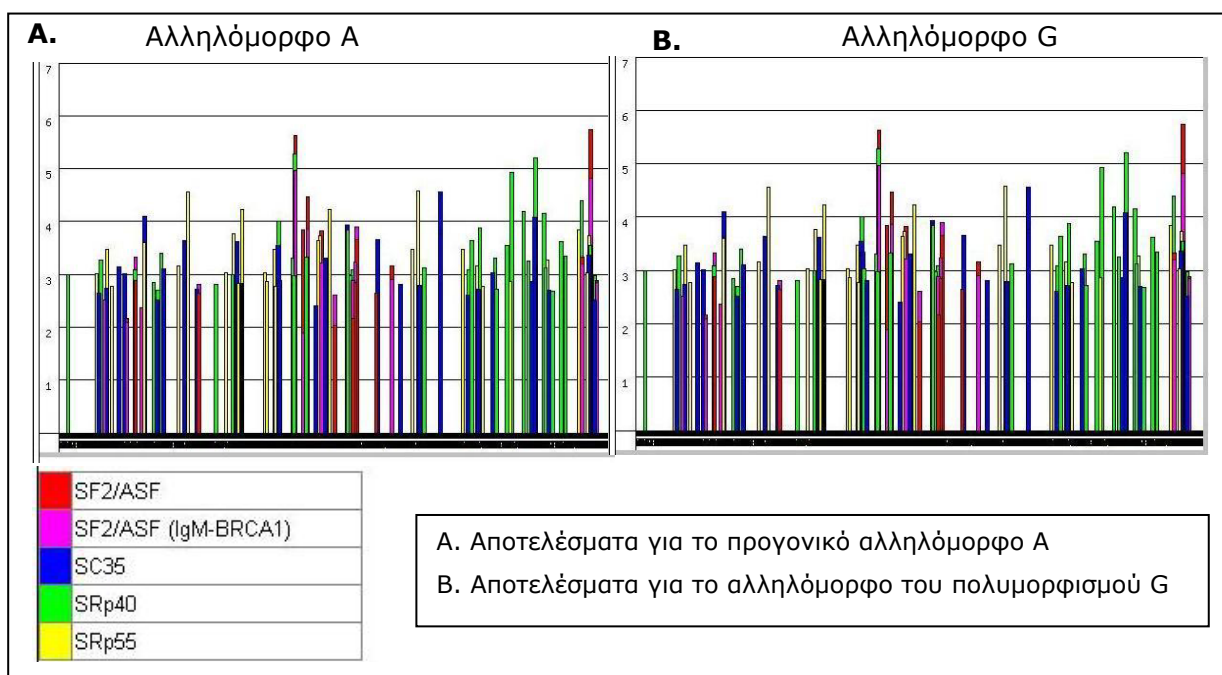
Η μόνη τιμή που αλλάζει για την αλληλουχία δέκτη στη θέση 484 με την παρουσία του αλληλομόρφου A είναι η σημειωμένη. Ωστόσο η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών που υπολογίζονται από τον αλγόριθμο, δεν είναι στατιστικά σημαντική. Προκύπτει και από αυτό το λογισμικό πως η πιθανότητα να επηρεάζεται το μάτισμα από τον πολυμορφισμό IVS1-53 είναι μηδαμινή.

#### 4.4.2. Πολυμορφισμός IVS5-31A>G

##### Πρόγραμμα ESEfinder:

Στα αποτελέσματα από το πρόγραμμα ESEfinder όσο αφορά την πρόσδεση των SR πρωτεϊνών στις αλληλουχίες ESEs, για τον IVS5-31 πολυμορφισμό, φαίνεται πρώτη η ανάλυση για το αλληλόμορφο A, που είναι το προγονικό και δεύτερη για το αλληλόμορφο G (ΕΙΚΟΝΑ 4.7).

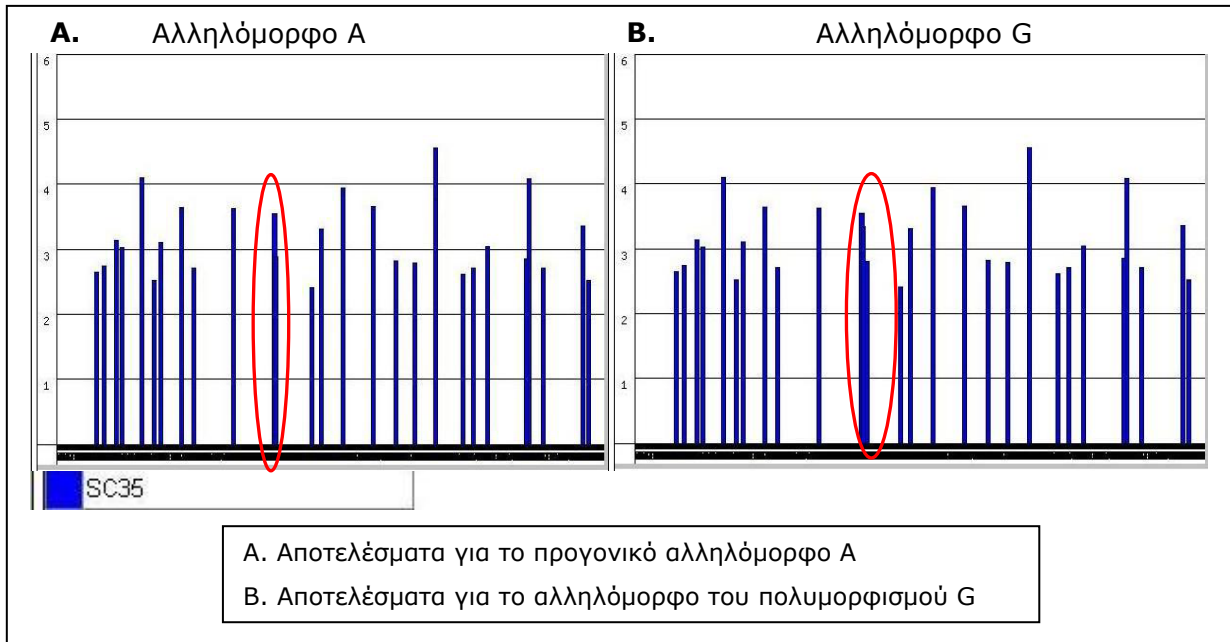
ΕΙΚΟΝΑ 4.7: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα ESEfinder για την πρόσδεση των SR πρωτεϊνών τον πολυμορφισμό IVS5-31



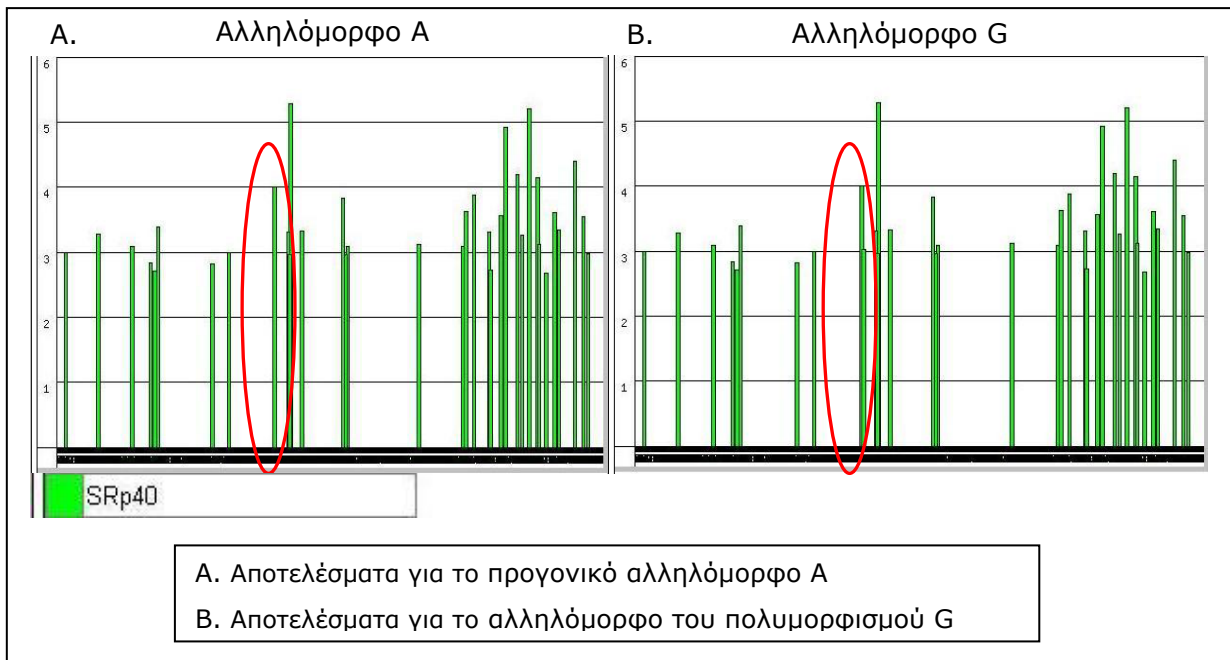
Στο παραπάνω γράφημα φαίνονται συνολικά οι πρωτεΐνες SR. Λόγω υψηλής πυκνότητας των κορυφών, επιλέχθηκε η απεικόνιση για την κάθε SR πρωτεΐνη ξεχωριστά. Διαφορές στη δέσμευση παρατηρήθηκαν σε δυο από αυτές, όπως εμφανίζεται στην ΕΙΚΟΝΑ 4.8 για την πρωτεΐνη SC35 και στην ΕΙΚΟΝΑ 4.9 για την

πρωτεΐνη SRp40. Και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται μία επιπλέον κορυφή στην περίπτωση του αλληλομόρφου G, γεγονός που σημαίνει ότι η κάθε πρωτεΐνη (SC35, SRp40) δεσμεύεται σε μία επιπλέον θέση παρουσία του πολυμορφισμού. Επομένως ο πολυμορφισμός IVS5-31 θεωρείται ότι επηρεάζει το μάτισμα του mRNA.

ΕΙΚΟΝΑ 4.8: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα ESEfinder για την πρόσδεση της πρωτεΐνης SC35, για τον πολυμορφισμό IVS5-31.



ΕΙΚΟΝΑ 4.9: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα ESEfinder για την πρόσδεση της πρωτεΐνης SRp40, για τον πολυμορφισμό IVS5-31.



## Πρόγραμμα SplicePort

Τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα SplicePort αφορούν τις εναλλακτικές αλληλουχίες δότες και δέκτες κατά το μάτισμα, οι οποίες υπολογίζονται χρησιμοποιώντας ένα αλγόριθμο, η τιμή του οποίου καθορίζει και τη σημαντικότητα της νουκλεοτιδικής αλλαγής. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ελέγχθηκε ο πολυμορφισμός IVS5-31 (αλληλόμορφο G) σε σχέση με το προγονικό αλληλόμορφο A (ΕΙΚΟΝΑ 4.10).

ΕΙΚΟΝΑ 4.10: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα SplicePort για τον πολυμορφισμό IVS5-31.

### Αποτελέσματα για το αλληλόμορφο A:

Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.5%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.5% for AG locations.  
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.8%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.2% for GT locations.

Show:	Acceptor	Donor	Location:	Short Sequence:	Score Threshold:	0
Acceptor:			447	tgtttaggtaaa	0.524806	
Acceptor:			545	tacacaggtatg	1.77666	
Donor:			545	cacaggtatgac	0.334117	
Donor:			673	ccgaggtaaagag	1.84004	

### Αποτελέσματα για το αλληλόμορφο G:

Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.5%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.5% for AG locations.  
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value,  $TP/(TP+FN)$ , of 88.8%, and a False Positive Rate,  $FP/(FP+TN)$ , of 1.2% for GT locations.

Show:	Acceptor	Donor	Location:	Short Sequence:	Score Threshold:	0
Acceptor:			447	tgtttaggtaaa	0.718864	
Acceptor:			506	cgtatagctact	0.12759	
Acceptor:			529	aaaccagttcat	0.0915143	
Acceptor:			545	tacacaggtatg	1.80131	
Donor:			545	cacaggtatgac	0.36757	
Donor:			673	ccgaggtaaagag	1.84004	

Όπως φαίνεται και στην προηγούμενη εικόνα, με το αλληλόμορφο G δημιουργούνται αφενός δύο νέες θέσεις δέκτες (σημειώνονται με το πλαίσιο), αλλά αλλάζει και η τιμή του αλγορίθμου στις δύο προϋπάρχουσες θέσεις δέκτες στα σημεία 447 και 545 (σημειώνονται με τα βέλη).

Στις προϋπάρχουσες θέσεις δέκτες η διαφορά των τιμών που αλλάζουν, δεν θεωρείται αρκετή ώστε να είναι στατιστικά σημαντική. Από την άλλη όμως, οι δύο νέες θέσεις δότες που προκύπτουν συμφωνούν με τις δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης των SC35 και SRp40, από το πρόγραμμα ESEfinder, και ενισχύουν την πιθανότητα να επηρεάζεται το μάτισμα από τον πολυμορφισμό IVS5-31 [A>G] (rs76571990).

#### 4.5. *In silico* ανάλυση για μεθυλίωση (CpG νησίδες), miRNAs και μεταθετά στοιχεία

---

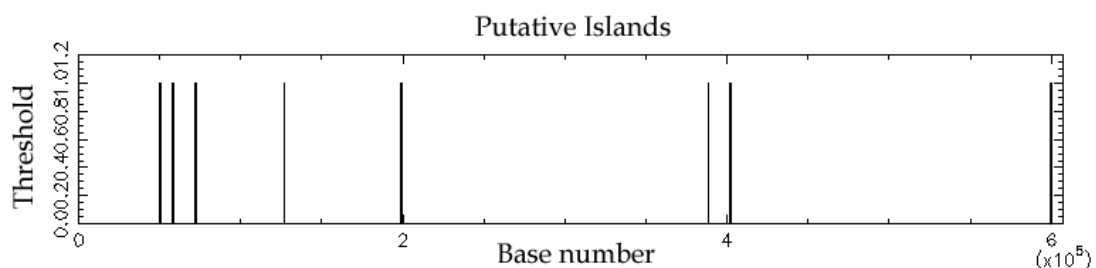
Η έκφραση των γονιδίων εκτός από τον γονότυπο μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες, γενετικούς και επιγενετικούς. Για το γονίδιο *ROBO2* πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση όσο αφορά: την ύπαρξη στην αλληλουχία του νησίδων CpG, με το πρόγραμμα EMBOSS CpGPlot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>), την ομολογία της αλληλουχίας του με miRNAs, μέσω της βάσης δεδομένων miRBase (<http://www.mirbase.org/>) και την περιεκτικότητα του σε μεταθετά στοιχεία με τη βάση δεδομένων UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) και το λογισμικό RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>).

##### 4.5.1. Μεθυλίωση (CpG νησίδες)

---

Η ανάλυση του *ROBO2* με το πρόγραμμα EMBOSS, έδειξε ότι συνολικά φέρει οκτώ CpG νησίδες (ΕΙΚΟΝΑ 4.11). Το μήκος των περιοχών αυτών είναι μεγαλύτερο των 200 βάσεων (ΕΙΚΟΝΑ 4.12). Επομένως μπορεί να θεωρηθεί ευαίσθητο σε επιδράσεις στη μεθυλίωση.

ΕΙΚΟΝΑ 4.11: Σχηματική παράσταση και νουκλεοτιδική θέση των νησίδων CpG στο γονίδιο *ROBO2* (πρόγραμμα EMBOSS CpGPlot)



ΕΙΚΟΝΑ 4.12: Απεικόνιση του μεγέθους και της θέσης στην αλληλουχία του γονιδίου *ROBO2* των νησίδων CpG (πρόγραμμα EMBOSS CpGPlot)

```

CPGPLOT islands of unusual CG composition
EMBOSS_001 from 1 to 607369

Observed/Expected ratio > 0.60
Percent C + Percent G > 50.00
Length > 200

Length 256 (50247..50502)
Length 310 (57847..58156)
Length 410 (71772..72181)
Length 235 (126510..126744)
Length 224 (198980..199203)
Length 281 (388240..388520)
Length 279 (401881..402159)
Length 274 (600006..600279)

```

#### 4.5.2. miRNAs

---

Η ανάλυση για θέσεις πρόσδεσης miRNAs στην αλληλουχία του γονιδίου *ROBO2*, έγινε με τη βάση δεδομένων miRBase για κάθε εξόνιο ξεχωριστά και των ιντρονικών του ορίων. Το συνολικό μέγεθος της αλληλουχίας που εισερχόταν κάθε φορά στη βάση ήταν 1000 βάσεις. Το πρόγραμμα συγκρίνει την εξεταζόμενη αλληλουχία με την αλληλουχία ώριμων και ανώριμων miRNA (pre-miRNA). Η αξιολόγηση της ομολογίας των αλληλουχιών γίνεται με τη χρήση της βαθμολογίας και του e-value. Η βαθμολογία θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη και σε συνδυασμό με το e-value να τείνει στο μηδέν.

Βρέθηκαν 17 ώριμα miRNA (Πίνακας 4.7) και 60 ανώριμα miRNA (Πίνακας 4.8). Από αυτά τη σημαντικότερη στοίχιση με e-value<0,1 είχαν 3 ώριμα (miR-5095, miR-1273a, miR-574-5p) και 25 ανώριμα (mir-5095, mir-1972-1, mir-1972-2, mir-4472-2, mir-1273a, mir-1273c, mir-3908, mir-566, mir-1303, mir-1273e, mir-1273g, mir-1273d, mir-297, mir-1277, mir-1273f, mir-4512, mir-586, mir-548f-4, mir-3673, mir-558, mir-1252, mir-57, mir-3960, mir-297, mir-3910-1). Η στοίχιση στα ώριμα έχει διαφορά από 1-3 νουκλεοτίδια ενώ στα ανώριμα miRNA, τα περισσότερα έχουν διαφορά >10 νουκλεοτίδια.

Πίνακας 4.7: Λίστα ανθρώπινων ώριμων miRNA στοιχισμένων με την αλληλουχία των εξονίων, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονικών τους ορίων, του γονιδίου *ROBO2* με  $e\text{-value} < 1$

Εξόνιο	Όνομα miRNA	Αριθμός πρόσβασης	Αρχή†	Τέλος*	Αλυσίδα	Βαθμολογία	e-value
2	<b>hsa-miR-5095</b>	MIMAT0020600	981	1000	-	91	0,075
2	hsa-miR-1972	MIMAT0009447	972	992	+	78	0,9
3	<b>hsa-miR-1273a</b>	MIMAT0005926	913	936	-	93	0,051
3	hsa-miR-1303	MIMAT0005891	908	929	+	83	0,35
12	<b>hsa-miR-574-5p</b>	MIMAT0004795	259	278	+	91	0,075
12	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	258	280	+	88	0,13
12	hsa-miR-1277-5p	MIMAT0022724	8	29	-	83	0,35
12	hsa-miR-1277-5p	MIMAT0022724	12	32	+	78	0,9
17	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	843	865	-	88	0,13
17	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	840	861	-	83	0,35
17	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	841	860	-	82	0,42
17	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	849	871	-	79	0,74
17	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	845	867	-	79	0,74
17	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	837	859	-	79	0,74
17	hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	833	855	-	79	0,74
19	hsa-miR-95	MIMAT0000094	878	899	+	83	0,35
24	hsa-miR-194-3p	MIMAT0004671	174	194	+	78	0,9

†Αρχή: θέση έναρξης της στοιχισμένης αλληλουχίας του miRNA, στην εξεταζόμενη αλληλουχία του γονιδίου

\*Τέλος: θέση τερματισμού της στοιχισμένης αλληλουχίας του miRNA, στην εξεταζόμενη αλληλουχία του γονιδίου

Τα miRNA με  $e\text{-value} < 0,1$  είναι σημειωμένα με έντονη γραφή

Πίνακας 4.8: Λίστα ανθρώπινων ανώριμων miRNA στοιχισμένων με την αλληλουχία των εξονίων, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονικών τους ορίων, του γονιδίου *ROBO2* με e-value<1

<b>Εξόνιο</b>	<b>Όνομα miRNA</b>	<b>Αριθμός πρόσβασης</b>	<b>Αρχή†</b>	<b>Τέλος*</b>	<b>Αλυσίδα</b>	<b>Βαθμολογία</b>	<b>e-value</b>
1	hsa-mir-639	MI0003654	89	133	-	108	0,16
2	<b>hsa-mir-5095</b>	MI0018001	961	1000	-	137	6e-04
2	<b>hsa-mir-1972-1</b>	MI0009982	952	1000	+	124	0,007
2	<b>hsa-mir-1972-2</b>	MI0015977	952	1000	+	124	0,007
2	<b>hsa-mir-5095</b>	MI0018001	959	1000	+	120	0,016
2	hsa-mir-3159	MI0014188	972	1000	+	109	0,13
2	hsa-mir-5708	MI0019316	974	1000	+	99	0,89
3	<b>hsa-mir-4472-2</b>	MI0016824	896	946	+	201	3e-09
3	<b>hsa-mir-1273a</b>	MI0006409	913	1000	-	183	9e-08
3	<b>hsa-mir-1273c</b>	MI0014171	895	944	+	178	2e-07
3	<b>hsa-mir-3908</b>	MI0016412	894	935	+	174	5e-07
3	<b>hsa-mir-566</b>	MI0003572	955	999	-	171	9e-07
3	<b>hsa-mir-1303</b>	MI0006370	891	935	+	153	3e-05
3	<b>hsa-mir-1273e</b>	MI0016059	918	1000	-	149	6e-05
3	<b>hsa-mir-1273g</b>	MI0018003	911	976	-	141	3e-04
3	<b>hsa-mir-3908</b>	MI0016412	890	940	-	120	0,016
3	<b>hsa-mir-1273d</b>	MI0014254	955	992	-	118	0,023
3	<b>hsa-mir-297</b>	MI0005775	85	125	-	115	0,041
3	<b>hsa-mir-1277</b>	MI0006419	85	141	-	114	0,05
3	<b>hsa-mir-1273f</b>	MI0018002	953	1000	-	114	0,05
3	<b>hsa-mir-4512</b>	MI0016878	910	944	+	112	0,073

Πίνακας 4.8: Λίστα ανθρώπινων ανώριμων miRNA στοχισμένων με την αλληλουχία των εξονίων, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονικών τους ορίων, του γονιδίου *ROBO2* με e-value<1 (συνέχεια)

3	hsa-mir-297	MI0005775	77	126	-	106	0,23
3	hsa-mir-1273c	MI0014171	913	944	-	106	0,23
3	hsa-mir-5684	MI0019285	912	948	+	104	0,34
7	<b>hsa-mir-586</b>	MI0003594	124	190	+	119	0,019
7	hsa-mir-1302-2	MI0006363	735	783	-	101	0,6
7	hsa-mir-1302-9	MI0015978	735	783	-	101	0,6
7	hsa-mir-1302-10	MI0015979	735	783	-	101	0,6
7	hsa-mir-1302-11	MI0015980	735	783	-	101	0,6
9	<b>hsa-mir-548f-4</b>	MI0006377	654	708	-	113	0,061
9	<b>hsa-mir-3673</b>	MI0016074	166	267	-	111	0,089
9	hsa-mir-620	MI0003634	165	190	+	103	0,41
9	hsa-mir-548ae-2	MI0016780	874	904	-	101	0,6
9	hsa-mir-568	MI0003574	168	212	+	99	0,89
10	hsa-mir-548al	MI0016851	610	639	-	105	0,27
10	hsa-mir-1302-4	MI0006365	167	258	+	101	0,57
10	hsa-mir-135a-1	MI0000452	123	158	-	99	0,84
11	hsa-mir-548al	MI0016851	60	89	-	105	0,28
12	<b>hsa-mir-558</b>	MI0003564	259	285	+	117	0,028
14	<b>hsa-mir-1252</b>	MI0006434	818	859	-	111	0,089
15	hsa-mir-1321	MI0006652	55	103	-	110	0,11
16	hsa-mir-548ai	MI0016813	749	800	+	107	0,19
17	<b>hsa-mir-574</b>	MI0003581	832	870	-	114	0,05



Πίνακας 4.8: Λίστα ανθρώπινων ανώριμων miRNA στοιχισμένων με την αλληλουχία των εξονίων, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονικών τους ορίων, του γονιδίου *ROBO2* με e-value<1 (συνέχεια)

17	<b>hsa-mir-574</b>	MI0003581	841	870	-	114	0,05
17	hsa-mir-574	MI0003581	837	871	-	103	0,41
17	hsa-mir-574	MI0003581	835	874	-	101	0,6
19	hsa-mir-95	MI0000097	876	909	+	107	0,19
20	<b>hsa-mir-3960</b>	MI0016964	799	846	-	132	0,002
20	<b>hsa-mir-3960</b>	MI0016964	778	829	-	125	0,006
20	<b>hsa-mir-3960</b>	MI0016964	796	845	-	124	0,007
20	<b>hsa-mir-3960</b>	MI0016964	793	844	-	116	0,034
20	<b>hsa-mir-3960</b>	MI0016964	775	826	-	116	0,034
20	hsa-mir-3960	MI0016964	782	828	-	109	0,13
20	hsa-mir-3960	MI0016964	790	841	-	107	0,19
20	hsa-mir-3960	MI0016964	771	820	-	106	0,23
20	hsa-mir-3960	MI0016964	771	823	-	103	0,41
20	hsa-mir-3960	MI0016964	772	816	-	99	0,89
22	<b>hsa-mir-297</b>	MI0005775	265	326	+	130	0,002
22	hsa-mir-3149	MI0014176	266	306	+	106	0,23
23	<b>hsa-mir-3910-1</b>	MI0016414	293	369	+	111	0,089

†Αρχή: θέση έναρξης της στοιχισμένης αλληλουχίας του miRNA, στην εξεταζόμενη αλληλουχία του γονιδίου

\*Τέλος: θέση τερματισμού της στοιχισμένης αλληλουχίας του miRNA, στην εξεταζόμενη αλληλουχία του γονιδίου

Τα miRNA με e-value<0,1 είναι σημασμένα με έντονη γραφή

### 4.5.3. Μεταθετά στοιχεία

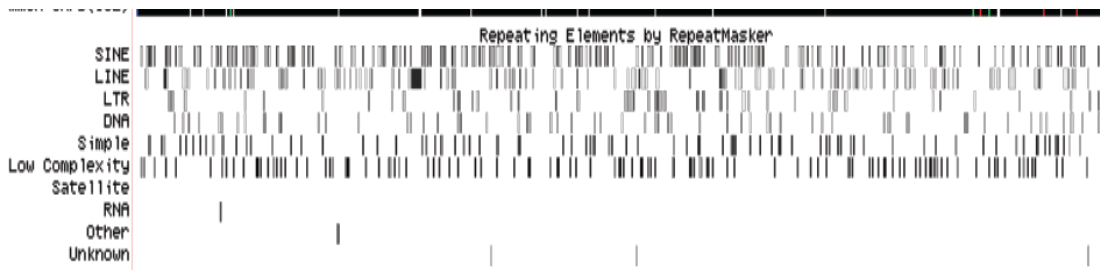
Για να βρεθεί η περιεκτικότητα του γονιδίου *ROBO2* σε μεταθετά στοιχεία, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων UCSC Genome Bioinformatics. Τα αποτελέσματα (ΕΙΚΟΝΑ 4.13) έδειξαν ότι υπάρχουν αρκετά μεταθετά στοιχεία στην αλληλουχία του γονιδίου.

ΕΙΚΟΝΑ 4.13: Αποτελέσματα του λογισμικού UCSC Genome Bioinformatics για μεταθετά στοιχεία στο γονίδιο *ROBO2*

**A.**



**B.**



A. Περιεκτικότητα σε μεταθετά στοιχεία σε συμπυκνωμένη μορφή, κατά μήκος του γονιδίου.

B. Περιεκτικότητα σε μεταθετά στοιχεία, σε αναλυτική μορφή, κατά μήκος του γονιδίου όπου απεικονίζεται το περιεχόμενο των επιμέρους οικογενειών μεταθετών στοιχείων (SINE, LINE και LTR ρετροτρανσποζόνια καθώς και DNA τρανσποζόνια).

Στη συνέχεια προκειμένου να υπολογιστεί η περιεκτικότητα αλληλουχιών που έχουν νουκλεοτιδική ομολογία με μεταθετά στοιχεία στο γονίδιο *ROBO2*, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό RepeatMasker (ΠΙΝΑΚΑΣ 4.9). Στον ΠΙΝΑΚΑ 4.9 το συνολικό ποσοστό που βρίσκεται σε παρένθεση (25,9%) είναι το ποσοστό που δίνει το λογισμικό RepeatMasker για την περιεκτικότητα του γονιδίου *ROBO2* σε μεταθετά στοιχεία. Αυτό το ποσοστό δεν συμπίπτει με το άθροισμα των ποσοστών της τελευταίας στήλης (21,35%), καθώς στον πίνακα δεν συμπεριλαμβάνονται τα DNA τρανσποζόνια που υπάρχουν στο γονίδιο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.9: Κατανομή μεταθετών στοιχείων στο γονίδιο *ROBO2*.

Μεταθετά στοιχεία	Αριθμός μεταθετών στοιχείων	Ποσοστό αλληλουχίας
SINEs	229	<b>8%</b>
ALUs	123	
MIRs	104	
Τεμαχισμένα στοιχεία SINEs από ενθέσεις ή ελλείμματα	2	
LINEs	140	<b>8,45%</b>
LINE1	62	
LINE2	68	
L3/CR1	7	
Τεμαχισμένα στοιχεία LINEs από ενθέσεις ή ελλείμματα	3	
LTR στοιχεία	69	<b>4,9%</b>
ERV_L	2	
ERV_L-MaLRs	41	
ERV_classI	23	
ERV_classII	0	
Τεμαχισμένα στοιχεία LTR από ενθέσεις ή ελλείμματα	3	
Σύνολο	876	<b>21,35%</b> (25,9% + DNA τρανσποζόνια)



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος ανευρίσκονται περίπου στο 0,5% όλων των κυήσεων<sup>2</sup> και αποτελούν την πλέον συχνή αιτία τελικού σταδίου χρόνιας νεφρικής νόσου στην παιδική ηλικία<sup>24</sup>. Περίπου το 30-40% των παιδιών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια εμφανίζουν συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού<sup>24,69</sup>, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που το ποσοστό αυτό φτάνει και το 80% (σε παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών)<sup>1</sup>.

Οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού προκαλούνται από βλάβες στη διαδικασία ανάπτυξης του μετάνεφρου κατά την εμβρυική ζωή. Η νεφρογένεση είναι μία εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία και θα μπορούσε να χωριστεί σε στάδια ανάλογα με τη μοριακή σηματοδότηση που λαμβάνει χώρα. Το πρώτο στάδιο στη νεφρογένεση είναι η διαδικασία επαγωγής της ΟΚ, και ακολουθούν τα στάδια που αφορούν τη μετατροπή του ΜΜ σε επιθήλιο με τον σχηματισμό των επιθηλιακών σωληναρίων, η διακλαδιζόμενη μορφογένεση και η σπειραματογένεση<sup>28,29</sup>. Ωστόσο, ο διαχωρισμός σε στάδια δεν είναι απόλυτος καθώς αυτές οι διαδικασίες αφενός δεν είναι ανεξάρτητες και αφετέρου επικαλύπτονται χρονικά.

Στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του γονιδίου *ROBO2* στην παθογένεια δύο συχνών συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού συστήματος, της ΚΟΠ και ΚΟΠ/ΝΥΔ.

Τα γονίδια *Robo* αναγνωρίστηκαν πρώτη φορά στη *Drosophila*, όπου αποκαλύφθηκε ένα σύστημα καθοδήγησης των νευραξόνων, στο οποίο συμμετέχουν η εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη *slit* και ο διαμεμβρανικός της υποδοχέας *robo*. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί 4 γονίδια *Robo*: *Robo1/Dutt1*, *Robo2*, *Robo3/RIG-1* και *Robo4/magic roundabout*<sup>114</sup>, τα οποία εκφράζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τους νεφρούς και άλλους αναπτυσσόμενους ιστούς<sup>36</sup>. Το *robo2* εκφράζεται στο αδιαφοροποίητο ΜΜ, που περιβάλλει τα άκρα της αναπτυσσόμενης ΟΚ<sup>36</sup>. Το σύστημα *Slit2/Robo2* συμμετέχει στον περιορισμό της περιοχής που εκφράζεται το *Gdnf* ώστε να σχηματιστεί η ΟΚ στο κατάλληλο σημείο του νεφρικού αγωγού<sup>7,29,115</sup>. Το γονίδιο *Robo2* εκφράζει έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα που εντοπίζεται στο ΜΜ, ο οποίος προσδένει το εξωκυττάριο *Slit2*<sup>8,116</sup>. Μετά την εισβολή της ΟΚ στο ΜΜ, η έκφρασή της περιορίζεται και αυτό το πρότυπο έκφρασης διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του ουροποιητικού συστήματος<sup>34</sup>. Σημειώνεται ότι κατά την επαγωγή της ΟΚ, είναι απαραίτητη η δέσμευση του *Gdnf* στο μεσονεφρικό αγωγό να περιοριστεί κοντά στην περιοχή της ανάπτυξης της ΟΚ. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να σχηματιστεί έκτοπη ΟΚ ή ακόμα επειδή οι υποδοχείς του *Gdnf* βρίσκονται σε όλο το μήκος του μεσονεφρικού αγωγού, θα μπορούσαν να σχηματιστούν πολλαπλές ΟΚ<sup>42,143</sup>.

Έναυσμα για την μελέτη του γονιδίου *ROBO2* σε παιδιά με συγγενείς ανωμαλίες αποτέλεσαν βιβλιογραφικές αναφορές που συσχέτισαν το γονίδιο με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, αλλά και πειραματικές μελέτες που ανέδειξαν τη συμμετοχή του γονιδίου στη διαδικασία της νεφρογένεσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Οι μελέτες που έχουν προηγηθεί είναι κυρίως σε ζωικά μοντέλα, συνήθως μύες, ενώ οι μελέτες στον άνθρωπο είναι περιορισμένες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, η λειτουργική απώλεια του γονιδίου βρέθηκε να οδηγεί στο σχηματισμό πολλαπλών ΟΚ, οι οποίες σχηματίζουν πολλαπλούς νεφρούς και ουρητήρες. Μύες ετερόζυγοι στο *Robo2* βρέθηκε να έχουν ηπιότερο φαινότυπο με διατεταμένους ουρητήρες που εισχωρούν περισσότερο πλευρικά από το φυσιολογικό στο τοίχωμα της ουροδόχου κύστης<sup>7,100</sup>.

Το γονίδιο *ROBO2* δεν έχει ενοχοποιηθεί για κάποια άλλη ανωμαλία στον άνθρωπο, εκτός από συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού<sup>8</sup>, και κυρίως ΚΟΠ<sup>144</sup>. Ωστόσο ενώ υπάρχουν μελέτες που το συσχετίζουν με την εμφάνιση ΚΟΠ<sup>8,9</sup>, υπάρχουν και άλλες οι οποίες θεωρούν ότι δεν εμπλέκεται στην παθογένεια της<sup>10-13</sup>. Οι Lu και συν.<sup>8</sup> εντόπισαν σε έναν ασθενή 18 ετών με πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες (αμφοτερόπλευρη ΚΟΠ 4<sup>ου</sup> βαθμού, μεγαουρητήρα δεξιά, αμφοτερόπλευρες διαταραχές στην κυστεοουρητηρική συμβολή, αγενεσία αριστερού όρχεος, διαταραχές στην όραση, ανωμαλίες στα άκρα, νευρολογικές διαταραχές) μια de novo μετάθεση που διακόπτει την αλληλουχία του γονιδίου *ROBO2*, η οποία in vitro εμποδίζει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *ROBO2* με την *SLIT2*. Επιπρόσθετα, σε έλεγχο για μεταλλάξεις σε 124 οικογένειες με πιθανή αυτοσωμική κληρονομικότητα μη-συνδρομικής ΚΟΠ, εντοπίστηκαν σε δύο οικογένειες δύο παρανοηματικές μεταλλάξεις, δηλαδή μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος. Αντίστοιχες μεταλλάξεις δεν βρέθηκαν σε κανέναν από τους 276 μάρτυρες. Η πρώτη μετάλλαξη, στην πρώτη οικογένεια Βρετανικής καταγωγής, βρέθηκε σε μητέρα η οποία είχε υποβληθεί σε χειρουργική διόρθωση σοβαρής ΚΟΠ (μετεμφύτευση του ουρητήρα) και παιδί το οποίο εμφάνιζε αμφοτερόπλευρη ΚΟΠ και υποπλαστικούς νεφρούς. Η δεύτερη, βρέθηκε σε ετερόζυγη κατάσταση και στα πέντε μέλη οικογένειας, ολλανδικής καταγωγής. Η ασθενής είχε αμφοτερόπλευρη ΚΟΠ και διπλό πυελοκαλυκικό σύστημα/ουρητήρα, η μητέρα και οι δύο θείες είχαν υπερηχογραφικές ενδείξεις για CAKUT, ενώ η γιαγιά είχε ετερόπλευρα μικρό νεφρό. Οι Bertoli-Avella και συν.<sup>9</sup> πραγματοποίησαν γενετική ανάλυση για το γονίδιο *ROBO2* σε συνολικά 95 ασθενείς, 78 ήταν οικογενείς περιπτώσεις και 17 σποραδικές, καθώς και σε 190 μάρτυρες. Οι ασθενείς έπασχαν από μεμονωμένη ΚΟΠ, ΚΟΠ σε συνδυασμό με κάποια άλλη συγγενή ανωμαλία, ή ΚΟΠ με ΝΠ. Εντόπισαν 24 νουκλεοτιδικές αλλαγές σε ετερόζυγη κατάσταση στους ασθενείς, αλλά καμία στους μάρτυρες. Οι 6 από αυτές βρίσκονται στην κωδική περιοχή και οι υπόλοιπες στα ιντρονικά όρια των εξονίων του γονιδίου

*ROBO2*. Από τις 6 αλλαγές στις κωδικές περιοχές, οι 4 προκαλούν αλλαγή αμινοξέος και οι 2 είναι συνώνυμες. Συνολικά, στους ασθενείς με ΚΟΠ (οικογενή και σποραδική) το 4,2% είχαν παρανοηματικές μεταλλάξεις του *ROBO2*, ενώ στους ασθενείς με οικογενή ΚΟΠ το ποσοστό αυξήθηκε σε 5,1%. Η μελέτη των Ζυ και συν.<sup>10</sup> πραγματοποιήθηκε σε 54 ασθενείς από ισάριθμες οικογένειες (50/54 Σουηδικής καταγωγής) με πάνω από έναν πάσχοντα μέλη. Οι 43 είχαν ΚΟΠ και οι υπόλοιποι: διπλό πυελοκαλυκικό σύστημα, απόφραξη πυελοουρητηρικής συμβολής και διπλό πυελοκαλυκικό/ουρητηροκλήη. Βρέθηκαν έξι νουκλεοτιδικές αλλαγές στα ιντρονικά όρια των εξονίων του γονιδίου *ROBO2*, μεταξύ των οποίων τρεις σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), που δεν θεωρείται ότι σχετίζονται με την εμφάνιση της ΚΟΠ. Αντιθέτως, σε ανάλυση σύνδεσης από τρεις ερευνητικές ομάδες δεν επιβεβαιώθηκε σημαντική συσχέτιση του γονιδίου με ΚΟΠ<sup>11-13</sup>.

Για τον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με την ΚΟΠ έχουν ακολουθηθεί στη βιβλιογραφία τέσσερις στρατηγικές. Η πρώτη μέθοδος είναι η γενετική ανάλυση υποψήφιων γονιδίων, τα οποία είναι γνωστά από μοντέλα πειραματόζων ή εμπλέκονται στην παθογένεια της ΚΟΠ. Μία δεύτερη προσέγγιση εκμεταλλεύτηκε την τυχαία συνύπαρξη της ΚΟΠ με χρωμοσωματικές ανωμαλίες, και αναλύοντας γενετικά το πολύπλοκο νόσημα, αναγνωρίστηκαν νέα υποψήφια γονίδια για την μεμονωμένη ΚΟΠ. Ως τρίτη προσέγγιση για την εύρεση υποψήφιων γονιδίων είναι η ίδια διαδικασία όπως στις χρωμοσωματικές ανωμαλίες, αλλά σε σπάνια σύνδρομα με πολλαπλές ανωμαλίες και έγινε προσπάθεια συσχέτισης των γονιδίων που βρέθηκαν σε αυτούς τους ασθενείς με την ΚΟΠ σε ασθενείς που δεν εμφάνιζαν άλλες συγγενείς ανωμαλίες. Τελευταία μέθοδος είναι η χαρτογράφηση του γονιδιώματος (whole genome mapping) που έχει χρησιμοποιηθεί για την εύρεση γενετικών τόπων και γονιδίων συνήθως σε οικογένειες που νοσούν, αλλά και σε μεμονωμένους ασθενείς<sup>100</sup>.

Ο έλεγχος του γονιδίου *ROBO2* σε ασθενείς με ΚΟΠ και ΚΟΠ/ΝΥΔ θεωρήθηκε σημαντικός αφενός επειδή η ΚΟΠ είναι η συχνότερη συγγενής ανωμαλία του ουροποιητικού και αφετέρου επειδή συχνά συνοδεύεται από ΝΥΔ. Επιπλέον, έως σήμερα το γονίδιο *ROBO2* δεν έχει μελετηθεί σε ικανό αριθμό ασθενών με μεμονωμένη ΚΟΠ/ΝΥΔ, στον Ελληνικό πληθυσμό, αλλά και διεθνώς. Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η πιθανότητα το γονίδιο αυτό να εμπλέκεται στην εμφάνιση πρωτοπαθούς ΚΟΠ (55 ασθενείς) και οικογενούς ΚΟΠ (10 ασθενείς) όσο και πρωτοπαθούς ΚΟΠ με συνοδό ΝΥΔ (38 ασθενείς). Επιπλέον ελέγχθηκαν και ένας σημαντικός αριθμός παιδιών (200 μάρτυρες) που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, παρόμοιας ηλικίας με τους ασθενείς.

Στους ασθενείς της παρούσας μελέτης ελέγχθηκαν και τα 26 εξόνια του γονιδίου *ROBO2*, συμπεριλαμβανομένων και των ιντρονικών τους ορίων. Ο γενετικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους SSCP (προϊόν PCR  $\leq 300$  βάσεις) και MRF-SSCP

(προϊόν PCR >300 βάσεις). Όπου παρατηρήθηκε διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης, τα δείγματα ελέγχθηκαν και με ανάλυση αλληλουχίας DNA, για να προσδιοριστεί εάν υπήρχε νουκλεοτιδική αλλαγή στο δείγμα, πάντα σε σύγκριση με κάποιο δείγμα αναφοράς.

Έπειτα από τη γενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στις τρεις ομάδες ασθενών βρέθηκαν δύο σημειακοί πολυμορφισμοί, οι IVS1-53G>A (rs9874095) και IVS5-31A>G (rs76571990). Και οι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ιντρονικές περιοχές, δηλαδή περιοχές που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα. Συνεπώς, η επίδραση που μπορεί να έχουν στο προϊόν του γονιδίου θα μπορούσε να αφορά κυρίως στο μάτισμα του mRNA, δηλαδή την ωρίμανση του mRNA και επομένως την παραγόμενη πρωτεΐνη.

Όσο αφορά τον πολυμορφισμό IVS1-53G>A, είναι καταγεγραμμένος με κωδικό rs9874095 και έχει βρεθεί ξανά μόνο μία φορά με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα, σε ασθενείς με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, αλλά χωρίς να δίνονται περισσότερες πληροφορίες για τους ασθενείς στους οποίους βρέθηκε<sup>9</sup>. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι δε βρέθηκε κανένας ομοζυγώτης σε αυτόν τον πολυμορφισμό στην ομάδα των ασθενών, ενώ βρέθηκε στην ομάδα των μαρτύρων. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των αλληλομόρφων και των γονοτύπων μεταξύ ασθενών και της ομάδας ελέγχου, αλλά αυτή ήταν υπέρ των μαρτύρων, ειδικά στην ομάδα της ΚΟΠ, αλλά και στην ομάδα των θηλέων ατόμων με ΚΟΠ. Δηλαδή οι ασθενείς βρέθηκε να έχουν μικρότερα ποσοστά του αλληλομόρφου A και αντίστοιχα του γονοτύπου GA, ενώ έχουν μηδενικό ποσοστό στο γονότυπο AA σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Θα πρέπει να τονισθεί ότι τα παιδιά που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, ήταν παιδιά που βεβαιωμένα δεν εμφάνιζαν συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, δεδομένου ότι είχαν υποβληθεί σε απεικονιστικό έλεγχο με υπερηχογράφημα και κυστεοουρηθρογραφία και ο οποίος ήταν φυσιολογικός. Το γεγονός ότι ομόζυγοι στον πολυμορφισμό δε βρέθηκαν στους ασθενείς, ίσως να οφείλεται στο μικρό αριθμό που μελετήθηκε. Έτσι, εάν ο αριθμός τους ήταν μεγαλύτερος θα μπορούσε να μην εμφανιστεί σημαντική διαφορά υπέρ της ομάδας ελέγχου. Από την άλλη πλευρά, τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην υπόθεση ότι πρόκειται για προστατευτικό πολυμορφισμό, ο οποίος αναπτύχθηκε και ενισχύθηκε στους υγιείς. Παρόλα αυτά για να βγει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα χρειάζεται έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων, ασθενών και μαρτύρων, και από άλλες γεωγραφικές περιοχές ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση. Επίσης η συχνότητα του αλληλομόρφου A του IVS1-53 πολυμορφισμού στην παρούσα μελέτη βρέθηκε να είναι κατά 12% χαμηλότερα στον πληθυσμό των ασθενών και 5% χαμηλότερα σε αυτόν της ομάδας ελέγχου σε σχέση με τον ευρωπαϊκό πληθυσμό (σύμφωνα με το NCBI). Ωστόσο το ποσοστό των ομόζυγων στον πολυμορφισμό AA ήταν συγκρίσιμο μεταξύ της ομάδας



ελέγχου της παρούσας μελέτης και πληθυσμού της Κεντρικής Ευρώπης. Τα ποσοστά εμφάνισης στους μάρτυρες προσεγγίζουν περισσότερο αυτά του κεντροευρωπαϊκού πληθυσμού, σε σχέση με των ασθενών, χωρίς ωστόσο να ταυτίζονται. Το γεγονός αυτό είναι άλλη μία ένδειξη ότι τα αντιφατικά αποτελέσματα που υπάρχουν όσο αφορά τη συσχέτιση του γονιδίου με την ΚΟΠ και ΚΟΠ/ΝΥΔ, έχουν να κάνουν επίσης με περιβαλλοντικούς, γεωγραφικούς παράγοντες και τα ειδικά χαρακτηριστικά του κάθε πληθυσμού.

Ο δεύτερος πολυμορφισμός, ο IVS5-31A>G, , όπως αναφέρθηκε βρέθηκε μόνο σε έναν ασθενή. Στη βάση δεδομένων NCBI υπάρχουν εξαιρετικά λίγες πληροφορίες για τον πολυμορφισμό αυτόν και δίνεται μόνο η αλληλομορφική συχνότητά του (A: 85,6% και G: 14,4%), η οποία δεν συμφωνεί με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, καθώς βρέθηκε μόνο σε 1/103 ασθενείς. Ο πολυμορφισμός αυτός, παρότι είναι καταγεγραμμένος, δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία γενικά, αλλά ούτε και σε ασθενείς με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού. Επιπλέον όπως προέκυψε από την *in silico* ανάλυση, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός πιθανότατα επηρεάζει το μάτισμα του mRNA, καθώς παρουσία του σχηματίζονται δύο επιπλέον θέσεις δέκτες σύμφωνα με το SplicePort, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από ESEfinder, το οποίο προβλέπει και αυτό δυο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες SC35 και SRp40 αντίστοιχα. Οι θέσεις δέκτες έχουν συγκεκριμένη αλληλουχία, βρίσκονται στην αρχή και το τέλος των ιντρονικών περιοχών και αποτελούν σημεία πρόσδεσης για τα ένζυμα που απομακρύνουν τις ιντρονικές περιοχές και συρράβουν τις εξονικές μεταξύ τους κατά την ωρίμανση του mRNA. Εάν αλλάξει η αλληλουχία τους, εξαιτίας μίας νουκλεοτιδικής αλλαγής, μπορεί να δημιουργηθούν θέσεις πρόσδεσης για τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μάτισμα, επομένως να αλλάξει το ώριμο mRNA και επομένως η παραγόμενη πρωτεΐνη, δηλαδή να πραγματοποιηθεί εναλλακτικό μάτισμα. Τα ESEs όπως έχει αναφερθεί είναι αλληλουχίες που βρίσκονται εσωτερικά των εξονίων και κατευθύνουν ή ενισχύουν το μάτισμα. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη για τη σωστή αναγνώριση των θέσεων ματίσματος για την ωρίμανση του mRNA. Ο IVS5-31 δεν φαίνεται να είναι ο κύριος υπεύθυνος για την εμφάνιση ΚΟΠ ή ΚΟΠ/ΝΥΔ στον συγκεκριμένο πληθυσμό μελέτης, αφού βρέθηκε μόνο σε 1 ασθενή, παρόλα αυτά χρειάζεται μεγαλύτερος αριθμός ασθενών για να μπορέσει να αποκλειστεί ως παθογόνος παράγοντας.

Συμπερασματικά το γονίδιο *ROBO2* δε βρέθηκε να σχετίζεται με την ύπαρξη ΚΟΠ ή ΚΟΠ/ΝΥΔ στον πληθυσμό αυτής της μελέτης, παρόλο που έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ΚΟΠ σε άλλες μελέτες και έχει εντοπισθεί ως υποψήφιος γενετικός τόπος το χρωμόσωμα 3, όπου και βρίσκεται το γονίδιο (3p12.3)<sup>85</sup>.

Τα αρνητικά αποτελέσματα αυτής της μελέτης πιθανόν να οφείλονται:

1<sup>ov</sup>) Στο γεγονός ότι δεν ελέγχθηκε ολόκληρο το γονίδιο, αλλά μόνο οι κωδικοποιούσες περιοχές (εξόνια) και τα ιντρονικά τους όρια, εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του. Η ενεργοποίηση και ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων συνήθως πραγματοποιείται από μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται σε περιοχές πριν την κωδικοποιούσα περιοχή του DNA και πιθανόν να μην συμπεριλήφθηκαν στην αλληλουχία που ενισχύθηκε. Η έκφραση ορισμένων γονιδίων και ειδικά αυτών που συμμετέχουν στον έλεγχο της διαδικασίας της ανάπτυξης μπορούν να επηρεαστούν από ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται σε κάποια απόσταση από τα σημεία μεταγραφής και τους υποκινητές<sup>114</sup>. Επομένως μια νουκλεοτιδική αλλαγή στην αλληλουχία των ρυθμιστικών στοιχείων μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου.

2<sup>ov</sup>) Η διακριτική ικανότητα για τμήματα μήκους <300 βάσεων της μεθόδου SSCP που χρησιμοποιήθηκε είναι 70-90% ως προς την ανίχνευση σημειακών αλλαγών. Ωστόσο, έγινε προσπάθεια βελτίωσης του ποσοστού αυτού με δύο διαφορετικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης (πήκτωμα ακρυλαμίδης 8% και πήκτωμα ακρυλαμίδης 8%-γλυκερόλης 5%, σε θερμοκρασία δωματίου), επανάληψη της ηλεκτροφόρησης ασαφών αποτελεσμάτων και ανάλυση αλληλουχίας DNA. Επιπλέον ο εντοπισμός στην παρούσα μελέτη ενός πολυμορφισμού για πρώτη φορά σε ασθενείς με ΚΟΠ δείχνει ότι η μέθοδος είναι αρκετά αξιόπιστη.

3<sup>ov</sup>) Όταν υπάρχει ένα μοριακό μονοπάτι, η δυσλειτουργία ενός γονιδίου στα αρχικά στάδια του μπορεί να αλλάξει τη λειτουργία ενός ή περισσότερων γονιδίων που δρουν στα επόμενα στάδια του μονοπατιού. Ακόμα μπορεί να επηρεαστούν συγγενικά μοριακά μονοπάτια, που συμμετέχουν στον καθορισμό ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου<sup>35</sup>. Η μελέτη ολόκληρου του μονοπατιού σε κυτταρικές σειρές είναι δύσκολη, εξαιτίας της δυσκολίας εξεύρεσης κυτταρικής σειράς σε τόσο πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης, όπως αυτό που δρα το γονίδιο *ROBO2*.

4<sup>ov</sup>) Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν DNA από περιφερικό αίμα. Το γονίδιο *ROBO2* δρα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και η έκφραση του αφορά, μεταξύ άλλων, το νεφρικό ιστό. Εξαιτίας του ότι τα γονίδια που συμμετέχουν στη νεφρογένεση είναι αναπτυξιακά, δεν εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στην πλειοψηφία τους σε άλλους ιστούς και έτσι δεν είναι εύκολο να μελετηθούν σε δείγμα DNA από αίμα. Συνεπώς, το καλύτερο υλικό για την μελέτη θα ήταν ο νεφρικός ιστός από τους ασθενείς για τον έλεγχο μεταλλάξεων και της γονιδιακής έκφρασης. Αυτό είναι εξαιρετικά δύσκολο καθώς θα έπρεπε να πραγματοποιηθεί βιοψία, η οποία δεν γίνεται στην καθημερινή κλινική πράξη, παρά μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις.

5<sup>ov</sup>) Υπάρχει και η πιθανότητα αυτό το γονίδιο να μην εμπλέκεται τόσο άμεσα στην εμβρυογένεση των ανθρώπινων νεφρών, σε αντίθεση με τους μύες. Είναι γνωστό ότι τα

ζωικά μοντέλα και ειδικά των μυών είναι εξαιρετικά χρήσιμα στις μελέτες για παράγοντες που επηρεάζουν την ανθρώπινη ανάπτυξη, καθώς υπάρχει πολύ μεγάλη ομολογία του γενετικού υλικού των δύο ειδών. Παρόλα αυτά, το γενετικό υλικό των δύο οργανισμών δεν είναι ταυτόσημο. Το γονίδιο *ROBO2* στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p12.3, ενώ στους μύες στο χρωμόσωμα 16 C3.1<sup>114</sup>. Ένα ακόμη στοιχείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι υπάρχουν διαφορές όσον αφορά τα ανατομικά χαρακτηριστικά του ουροποιητικού συστήματος, καθώς και τον χρόνο που πραγματοποιούνται τα γεγονότα στα έμβρυα των μυών και στα νεογνά των ανθρώπων.

6<sup>ον</sup>) Γενικά η ύπαρξη μεταλλάξεων του *ROBO2* είναι αρκετά σπάνια και υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα και στην βιβλιογραφία όσο αφορά την συσχέτιση του γονιδίου με την ύπαρξη ΚΟΠ. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα πιθανά οφείλονται στο γεγονός ότι η ΚΟΠ, όπως και οι λοιπές συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού είναι πολυπαραγοντικά νοσήματα και παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ακόμα και στην ίδια οικογένεια<sup>8</sup>, αλλά και στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε πληθυσμού ασθενών και το διαφορετικό γεωγραφικό τόπο που πραγματοποιείται η μελέτη, όπως άλλωστε ισχύει και για άλλες συγγενείς ανωμαλίες.

7<sup>ον</sup>) Η γενετική της ΚΟΠ και γενικά των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού είναι αρκετά περίπλοκη και είναι πολύ πιθανόν να συμμετέχουν πάνω από ένα γονίδια στην παθογένεση τους<sup>111</sup>, όπως και να υπάρχουν επιστατικοί μηχανισμοί γονιδίων, δηλαδή η έκφραση ενός γονιδίου να προϋποθέτει την έκφραση ή αποσιώπηση ενός άλλου<sup>24</sup>. Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις για γενετική βάση του νοσήματος, γεγονός που ενισχύεται από τον παρατηρούμενο κίνδυνο επανεμφάνισης (10,34%) στις οικογένειες του πληθυσμού της μελέτης.

Θα πρέπει επιπλέον να ληφθεί υπόψη ότι στα πολυπαραγοντικά νοσήματα, ακόμα και ένας πολυμορφισμός σε συνδυασμό με άλλες γενετικές αλλαγές ή περιβαλλοντολογικούς παράγοντες μπορεί να οδηγήσει τελικά στην εμφάνιση του παθολογικού φαινοτύπου<sup>35,64,85,145</sup>. Είναι χαρακτηριστικό ότι μια μετάλλαξη ενός γονιδίου μπορεί να προκαλεί διαφορετικούς φαινοτύπους και μεταλλάξεις διαφορετικών γονιδίων μπορούν να προκαλούν την ίδια ασθένεια. Η συνηθέστερη προσέγγιση για να εντοπιστούν γονίδια που προδιαθέτουν σε σύνθετα νοσήματα είναι οι μελέτες συσχέτισης. Σε αυτές συγκρίνονται οι συχνότητες συγκεκριμένων αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των υγιών ώστε να αναγνωριστούν τα άτομα υψηλού ή χαμηλού κινδύνου ως προς την προδιάθεση στο νόσημα. Αυτού του τύπου η γενετική ανάλυση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας διαφορετικούς πολυμορφισμούς, με συχνότητα μεγαλύτερη του 1-2% στον γενικό πληθυσμό<sup>35</sup>. Όσο αφορά την επίδραση του περιβάλλοντος, ένα παράδειγμα είναι ότι σε πείραμα, οι απόγονοι επίμυων που υποβλήθηκαν σε διατροφή με χαμηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης κατά την κύηση,

εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στα μεσεγχοματικά κύτταρα<sup>31</sup> και παρουσίασαν αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση στον μετάνεφρο και μειωμένο αριθμό νεφρώνων<sup>146</sup>.

Παρόλο που έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στη νεφρογένεση οι οποίες σχετίζονται με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού, η μεταβλητότητα στη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου που παρατηρείται οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που παίζουν κρίσιμο ρόλο. Η φαινοτυπική ετερογένεια που εμφανίζεται μπορεί να οφείλεται στο γενετικό υπόβαθρο του ατόμου και το περιβάλλον όπως προαναφέρθηκε, αλλά και σε παράγοντες που δρουν επιγενετικά<sup>24,58</sup>. Στους επιγενετικούς μηχανισμούς για την γονιδιακή ρύθμιση συμμετέχουν κυρίως η μεθυλίωση του DNA ή των πρωτεϊνών της χρωματίνης, η ακετυλίωση και η αναδιάταξη χρωματίνης. Η μεταμεταφραστική τροποποίηση των ιστονών μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία της χρωματίνης και να αλλάξει την έκφραση των γονιδίων χωρίς να αλλάξει η αλληλουχία του DNA. Σε αυτό το επίπεδο, η έκφραση των γονιδίων μπορεί επίσης να ελεγχθεί από micro-RNAs (miRNAs), των οποίων η συμμετοχή στη νεφρογένεση έχει αποδειχθεί<sup>24</sup>, επομένως επιγενετικές τροποποιήσεις θα μπορούσαν να εμπλέκονται και στο στάδιο ή στον ιστό που δρα το ROBO2. Το πρότυπο μεθυλίωσης του γονιδίου *ROBO2* σε νησίδες CG, θα μπορούσε να επηρεάζει την έκφραση του. Είναι γνωστό πως διαταραχές στη μεθυλίωση μπορούν να οδηγήσουν σε ανωμαλίες κατά τη μεταβίβαση του γονιδίου στους απογόνους, γεγονός που πολλές φορές οδηγεί σε απενεργοποίηση του. Στην παρούσα μελέτη, *in silico* βρέθηκε ότι το *ROBO2* φέρει συνολικά οκτώ CG νησίδες, μεγέθους >200 νουκλεοτιδίων. Επομένως μπορεί να θεωρηθεί ευαίσθητο σε ανωμαλίες της μεθυλίωσης. Επίσης *in silico* ελέγχθηκε η ομολογία της αλληλουχίας των εξονίων και των ιντρονικών τους ορίων με miRNAs. Τα miRNAs επίσης ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων, με την πρόσδεση τους στο mRNA και συνήθως καταστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση ή αποσιωπούν το γονίδιο. Το *ROBO2* περιέχει στην αλληλουχία του θέσεις πρόσδεσης 17 ώριμων και 60 ανώριμων miRNAs με  $e\text{-value} < 1$ . Μεγαλύτερη βαθμολογία σε συνδυασμό με  $e\text{-value}$  να τείνει στο μηδέν ( $e\text{-value} < 0,1$ ) είχαν 3 ώριμα και 25 ανώριμα miRNAs. Τα ώριμα εμφάνισαν μεγαλύτερη ομολογία (1-3 νουκλεοτίδια διαφορά) από ότι τα ανώριμα (διαφορά >10 νουκλεοτίδια), επομένως το γονίδιο *ROBO2* μπορεί να μην εκφράζεται εξαιτίας της διαταραχής κάποιου από αυτά.

Η έκφραση των γονιδίων μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τα μεταθετά στοιχεία. Τα μεταθετά στοιχεία είναι μετρίως επαναλαμβανόμενες μοναδιαίες ακολουθίες DNA, διάσπαρτες στο γένωμα, που έχουν την ιδιότητα να μετατίθενται σε αυτό. Μετάθεση ορίζεται η ιδιότητα ορισμένων ακολουθιών του DNA να μετακινούνται σε νέες θέσεις στο γένωμα του κυττάρου προέλευσης τους. Τα μεταθετά στοιχεία καταλαμβάνουν

περίπου το μισό γένωμα στον άνθρωπο, αποτελώντας περίπου το 46% του γενώματος και συναντώνται σε  $3.2 \times 10^6$  θέσεις<sup>122</sup>. Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία του γενώματος, κυρίως επιφέροντας σημαντικές μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση. Ενσωματώσεις τους σε μεταγραφικές ρυθμιστικές περιοχές, όπως εξόνια, ιντρόνια και περιοχές που ρυθμίζουν το μάτισμα, οδηγούν στην μειορρυθμιση έως και τη διακοπή της έκφρασης γονιδίων<sup>123, 125</sup>. Ακόμη, ενσωματώσεις στο 5' άκρο των γονιδίων μπορεί να ενθέσουν σε αυτά εναλλακτικούς υποκινητές οδηγώντας στην έκτοπη έκφρασή τους<sup>126</sup>. Επιπλέον, γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ μεταθετών στοιχείων μπορεί να προκαλέσουν εναλλακτικό μάτισμα εξαιτίας των λειτουργικών θέσεων ματίσματος των μεταθετών στοιχείων<sup>127</sup>. Τέλος, είναι γνωστό ότι διαφορετικοί μηχανισμοί ελέγχου ρυθμίζουν την έκφραση και ενεργότητα των μεταθετών στοιχείων, με κυριότερους τη μεθυλίωση του DNA και την αποσιώπηση μέσω RNA παρεμπόδισης (RNA interference), διαμεσολαβούμενη από αντινοσηματικά ρετροτρανσποζονιακά μεταγραφήματα<sup>123,147</sup>. Συνέπεια αυτής της αρνητικής ρύθμισης μπορεί να αποτελέσει η αποσιώπηση γονιδίων που φέρουν είτε σε παρακείμενες περιοχές ή στο εσωτερικό των ιντρονικών ακολουθιών τους μεταθετά στοιχεία<sup>148</sup>. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή υπάρχουν στα θηλαστικά 4 ομόλογα γονίδια *Robo*. Η οργάνωσή τους ανά δυάδες σε διαφορετικά χρωμοσώματα (στον άνθρωπο *ROBO1* και *ROBO2* στο χρωμόσωμα 3, *ROBO3* και *ROBO4* στο χρωμόσωμα 11), θεωρείται ότι είναι συντηρημένη και πιθανόν τα ομόλογα αυτά γονίδια προέκυψαν από γεγονότα διπλασιασμού, πριν από 350εκ χρόνια<sup>114</sup>. Τα μεταθετά στοιχεία έχουν την ικανότητα να επαναδιατάσσουν το γένωμα του κυττάρου. Η επικρατέστερη άποψη για τη σημασία της ύπαρξης τους αποδίδει σε αυτά ένα σημαντικό ρόλο ως κατευθυντών της εξέλιξης και ρυθμιστών της λειτουργίας του γενώματος. Η παρουσία τους στο γένωμα και η μετάθεσή τους σε νέες γενωμικές θέσεις, σε συνάρτηση με το γεγονός ότι κληρονομούνται τα καθιστά έναν από τους βασικότερους παράγοντες γενωμικής επαναδιάταξης προάγοντας την γενωμική εξέλιξη<sup>123</sup>. Φυσιολογικά, η ενεργότητα των μεταθετών στοιχείων είναι κατασταλαμμένη και αυστηρά ελεγχόμενη. Εντούτοις, έχει αποδειχτεί ότι ενεργοποιούνται μεταγραφικά και μετατίθενται σε πολλαπλασιαστικά ενεργά κυτταρικά περιβάλλοντα, όπως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης<sup>149</sup>. Μολονότι η ελεγχόμενη δραστηριότητα των μεταθετών στοιχείων μπορεί να είναι επωφελής για το κύτταρο, η ανεξέλεγκτη ενεργοποίησή τους δύναται να προκαλέσει γενωμική αστάθεια και γενετικές ασθένειες, όπως μονογονιδιακές, πολυπαραγοντικές και αναπτυξιακές ασθένειες<sup>123, 150</sup>. Με βάση αυτά που προαναφέρθηκαν για τα μεταθετά στοιχεία, το *ROBO2* ελέγχθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη για παρουσία μεταθετών στοιχείων στην αλληλουχία του. Το εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος ολόκληρου του γονιδίου και των ιντρονικών περιοχών (μη κωδικοποιούσες περιοχές) του αποτέλεσε επιπλέον ένδειξη για τον έλεγχο παρουσίας

μεταθετών στοιχείων στο εσωτερικό του γονιδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην αλληλουχία του γονιδίου *ROBO2* περιέχονται σε ποσοστό 21,35% ρετρομεταθετά στοιχεία. Σε αυτό το ποσοστό δεν συμπεριλαμβάνονται τα DNA τρανσποζόνια (η αλληλουχία του *ROBO2* έχει περιεκτικότητα 4,55%), επειδή μέχρι σήμερα δεν έχει περιγραφεί καμία βιολογική διεργασία που να συμμετέχουν DNA τρανσποζόνια, παρόλο που βρίσκονται σε ποσοστό 2,84% στο ανθρώπινο γονιδίωμα<sup>122</sup>. Επομένως άλλη μία πιθανή αιτία δυσλειτουργίας του γονιδίου και πιθανής πρόκλησης εξαιτίας αυτής της δυσλειτουργίας των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού που μελετήθηκαν, πιθανόν να είναι η μεγάλη συγκέντρωση μεταθετών στοιχείων στην αλληλουχία του, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στη συλλογή και έλεγχο μεγαλύτερου αριθμού ασθενών, ίσως και από ευρύτερες περιοχές και όχι μόνο την περιφέρεια της Ηπείρου. Έτσι θα μπορούσε συλλογικά να ελεγχθεί και να συγκριθεί η συμβολή των νουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου *ROBO2* στην παθογένεια των συγγενών ανωμαλιών και πιο συγκεκριμένα στις κατηγορίες που εμφανίζουν ΚΟΠ. Όπως έχει αναφερθεί διαφέρει η συχνότητα των πολυμορφισμών που βρέθηκαν από τα δεδομένα της βάσης δεδομένων NCBI. Ένας επιπλέον τρόπος για να πραγματοποιηθεί ανάλυση σύνδεσης είναι η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος. Αν και έχουν πραγματοποιηθεί τέτοιες μελέτες, η τεχνική next generation sequencing δίνει και άλλες δυνατότητες όπως προσδιορισμό έκφρασης γονιδίων και μη κωδικοποιούντων RNA, εντοπισμό θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, προσδιορισμό DNA μεθυλίωσης και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ιστονών. Άλλη ερευνητική κατεύθυνση θα ήταν ο εστιασμός στο μοριακό μηχανισμό στον οποίο εμπλέκεται το γονίδιο *ROBO2*. Οι νουκλεοτιδικές αλλαγές που βρέθηκαν, μπορούν να αξιολογηθούν σε κυτταρικά μοντέλα, για να διαπιστωθεί πώς επηρεάζουν τα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης του ουροποιητικού συστήματος. Ακριβώς επειδή το *ROBO2* δρα συνεργικά με τον προσδέτη του (τον *SLIT2*), η βλάβη σε ένα από τα δύο μόρια θα επηρέαζε τη σηματοδότηση μεταξύ τους και επομένως δεν θα περιόριζε το κεντρικό μόριο της επαγωγής της OK (*GDNF*) από το να εκφράζεται έκτοπα ή πολλαπλές φορές.

Η παρούσα μελέτη προσθέτει επιπλέον δεδομένα που θα συμβάλλουν στην περαιτέρω αποσαφήνιση της παθογένειας των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού συστήματος στον άνθρωπο, αλλά και το σχεδιασμό νέων μελετών. Μακροπρόθεσμα, η κατανόηση της γενετικής βάσης των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού θα συμβάλλει στον προσδιορισμό συγκεκριμένων γενετικών δεικτών για τις ανωμαλίες αυτές ώστε να μπορέσουν να σχεδιαστούν γενετικά τεστ με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση, την άρτια γενετική καθοδήγηση, αλλά και την κατάλληλη εμβρυϊκή χειρουργική παρέμβαση σε επιλεγμένες περιπτώσεις σοβαρών ανωμαλιών.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

1. Η ΚΟΠ και η ΚΟΠ/ΝΥΔ, αλλά και γενικότερα οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού είναι πολυπαραγοντικά νοσήματα ως εκ τούτου στην εμφάνιση τους εμπλέκονται περισσότεροι του ενός παράγοντες. Έχουν όμως γενετική βάση, γεγονός που ενισχύεται από το ποσοστό επανεμφάνισης (10,34%) στις οικογένειες της μελέτης που έχουν πάνω από ένα παιδί.
2. Το γονίδιο *ROBO2* στην αλληλουχία του οποίου βρέθηκαν δύο πολυμορφισμοί στον πληθυσμό της μελέτης, φαίνεται να μην είναι υπεύθυνο για την παθογένεια των συγκεκριμένων συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού στον ελληνικό παιδιατρικό πληθυσμό, παρόλο που στη βιβλιογραφία έχει συσχετιστεί με την παρουσία ΚΟΠ (OMIM #610878), είτε στον άνθρωπο είτε σε πειραματόζωα.
3. Ο πρώτος πολυμορφισμός, ο IVS1-53G>A (rs9874095) βρέθηκε σε 27/103 ασθενείς. Έχει αναφερθεί μόνο μία φορά σε μελέτη για συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού<sup>9</sup>. Η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντική διαφορά υπέρ της ομάδας ελέγχου, ενώ ομόζυγα άτομα για τον πολυμορφισμό βρέθηκαν μόνο στην ομάδα ελέγχου. Η *in silico* ανάλυση έδειξε ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν επηρεάζει το μάτισμα.
4. Ο δεύτερος πολυμορφισμός που βρέθηκε, ο IVS5-31A>G (rs76571990) αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, παρόλο που είναι καταγεγραμμένος στο πρόγραμμα SNP, στη βάση δεδομένων NCBI. Βρέθηκε μόνο σε έναν ασθενή σε ετερόζυγη κατάσταση και σε κανένα από τα παιδιά της ομάδας ελέγχου. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει το μάτισμα του mRNA, όπως προέκυψε από την *in silico* ανάλυση.
5. Το γονίδιο *ROBO2* βρέθηκε ότι περιέχει οκτώ νησίδες CpG, επομένως ανωμαλίες στη μεθυλίωση θα επηρέαζαν την έκφραση του, είτε αποσιωπώντας το γονίδιο, είτε μέσω εκτόπισης μεταγραφικών παραγόντων που δεσμεύονται στο DNA.
6. Το γονίδιο *ROBO2* βρέθηκε ότι έχει ομολογία με 17 ώριμα και 60 ανώριμα miRNAs. Από αυτά μεγαλύτερη στοίχιση με την αλληλουχία του γονιδίου (μεγάλη βαθμολογία και e-value να τείνει στο μηδέν) είχαν 3 ώριμα και 25

ανώριμα, ενώ πιο πλήρης ομολογία εμφανίζεται στα ώριμα. Τα miRNAs ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων, με πιο συχνή την αποσιώπηση τους ή την καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Εξαιτίας της ομολογίας του γονιδίου με αυτά, είναι πιθανόν miRNAs να προσδένονται στην αλληλουχία του επηρεάζοντας έτσι την έκφραση του.

7. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά, ότι το 21,35% της αλληλουχίας του γονιδίου *ROBO2* είναι ρετρομεταθετά στοιχεία και το 4,55% DNA τρανσποζόνια, για τα οποία όμως μέχρι σήμερα δεν έχει περιγραφεί κάποια βιολογική διεργασία στην οποία να συμμετέχουν. Το ποσοστό 21,35% αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο φορτίο και επομένως η έκφραση του γονιδίου μπορεί επηρεάζεται από αυτό. Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να μειώσουν ή ακόμα και να διακόψουν την έκφραση του γονιδίου, να προκαλέσουν εναλλακτικό μάτισμα ή να επηρεαστούν τα ίδια τα μεταθετά από επιγενετικούς παράγοντες, όπως η μεθυλίωση.
8. Η προσέγγιση των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού με την κλασική γενετική δεν μπορεί να δώσει ολοκληρωμένη εικόνα για την παθογένεια τους. Η έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί σε πιο ολοκληρωμένα μοντέλα με κυτταρικές σειρές, ή όπου είναι δυνατό σε ιστό προερχόμενο από βιοψίες. Εξαιτίας του ότι τα γονίδια που συμμετέχουν στη νεφρογένεση είναι αναπτυξιακά, δεν εκφράζονται στην πλειοψηφία τους σε μεγάλο βαθμό σε άλλους ιστούς και έτσι δεν είναι εύκολο να μελετηθούν σε δείγμα DNA από περιφερικό αίμα.



## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

### Εισαγωγή

Οι συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος ανευρίσκονται περίπου στο 0,5% όλων των κυήσεων και αποτελούν την πλέον συχνή αιτία τελικού σταδίου χρόνιας νεφρικής νόσου στα βρέφη και μικρά παιδιά. Περίπου το 30-40% των παιδιών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια εμφανίζουν συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού. Από τις πιο συχνές είναι η κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση (ΚΟΠ), η οποία συχνά συνοδεύεται από νεφρική υποπλασία/δυσπλασία (ΝΥΔ). Έως σήμερα η κληρονομικότητα και η παθογένεια αυτών των ανωμαλιών δεν έχει εξακριβωθεί. Το γονίδιο *ROBO2* συμμετέχει στο αρχικό στάδιο της νεφρογένεσης που χαρακτηρίζεται από την επαγωγή ανάπτυξης της ουρητηρικής καταβολής (ΟΚ). Ωστόσο, δεν υπάρχει ομοφωνία στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την συμμετοχή αυτού του γονιδίου στην παθογένεια της ΚΟΠ.

### Σκοπός

Ο σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι ο έλεγχος για την ύπαρξη μεταλλάξεων του γονιδίου *ROBO2* σε παιδιά με ΚΟΠ και ΚΟΠ-ΝΥΔ. Επιπλέον ελέγχθηκαν *in silico* παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν επιγενετικά την έκφραση του γονιδίου.

### Υλικά και μέθοδοι

Ελέγχθηκαν για νουκλεοτιδικές αλλαγές 103 παιδιατρικοί ασθενείς: 65 με ΚΟΠ (10 με οικογενή ΚΟΠ) και 38 με ΚΟΠ-ΝΥΔ. Επιπλέον ελέγχθηκαν 200 παιδιά παρόμοιας ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Η ανάλυση στους ασθενείς πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ή MRF-SSCP (Multiple Restriction Fragment-SSCP), σε δύο διαφορετικές συνθήκες. Στα δείγματα που τα πρότυπα ζωνώσεων απέκλιναν από το φυσιολογικό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας DNA (DNA sequencing). Η ομάδα ελέγχου ελέγχθηκε με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή με MRF-SSCP. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ( $\chi^2$  τεστ) και *in silico* ανάλυση για τις νουκλεοτιδικές αλλαγές που βρέθηκαν (ESEfinder και SplicePort). *In silico* ανάλυση πραγματοποιήθηκε επίσης για την περιεκτικότητα του γονιδίου σε CpG νησίδες (EMBOSS CpGPlot), την ομολογία του με miRNAs (miRBase) και την περιεκτικότητα του σε μεταθετά στοιχεία (UCSC Genome Bioinformatics, RepeatMasker).

### Αποτελέσματα

Από την ανάλυση του γονιδίου, εντοπίστηκαν δύο πολυμορφισμοί: ο IVS1-53G>A (rs9874095) και ο IVS5-31A>G (rs76571990). Για τον IVS1-53, το  $\chi^2$  τεστ έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά υπέρ των μαρτύρων και η *in silico* ανάλυση έδειξε ότι δεν επηρεάζεται η αντίστοιχη περιοχή ματίσματος. Ο IVS5-31 ο οποίος αναφέρεται για

πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, παρόλο που είναι καταγεγραμμένος στη βάση δεδομένων, βρέθηκε μόνο σε έναν ασθενή. Τα *in silico* αποτελέσματα για την επίδραση του στο μάτισμα του mRNA έδειξαν αλλαγή της σύνδεσης δύο SR πρωτεϊνών (ESEfinder) και δύο επιπλέον αλληλουχίες δέκτες (SplicePort), επομένως πιθανότατα αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει το μάτισμα. Όσο αφορά την περιεκτικότητα του γονιδίου σε CpG νησίδες φέρει συνολικά οκτώ, μεγέθους >200 νουκλεοτίδια. Η αλληλουχία του *ROBO2* έχει ομολογία με 17 ώριμα και 60 ανώριμα miRNAs. Μεγαλύτερη βαθμολογία και e-value<0,1 παρουσιάζουν 3 ώριμα και 25 ανώριμα. Η στοίχιση στα ώριμα έχει διαφορά από 1-3 νουκλεοτίδια ενώ στα ανώριμα miRNAs, τα περισσότερα έχουν διαφορά >10 νουκλεοτίδια. Η περιεκτικότητα του γονιδίου *ROBO2* σε μεταθετά στοιχεία είναι 25,9% συμπεριλαμβανομένου των DNA τρανσποζονίων (4,55%), τα οποία όμως μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν σε κάποια βιολογική διεργασία.

### **Συμπεράσματα**

Οι νουκλεοτιδικές αλλαγές του γονιδίου *ROBO2* δε βρέθηκε να είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ΚΟΠ ή ΚΟΠ-ΝΥΔ στον πληθυσμό της μελέτης, ενισχύοντας την υποκείμενη γενετική ετερογένεια αυτών των νοσημάτων. Αν και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις του γονιδίου *ROBO2* συσχετίζονται με την παρουσία ΚΟΠ, η παρούσα μελέτη δεν επιβεβαίωσε μια τέτοια συσχέτιση, υπογραμμίζοντας το γεγονός ότι η ΚΟΠ και η ΚΟΠ-ΝΥΔ είναι πολυπαραγοντικά νοσήματα. Ωστόσο, εκτός από τις αλλαγές στη αλληλουχία του DNA, η έκφραση του γονιδίου μπορεί να επηρεαστεί επιγενετικά από παράγοντες όπως είναι η μεθυλίωση, μέσω των CpG νησίδων, τα miRNAs ή τα μεταθετά στοιχεία. Από τα αποτελέσματα της μελέτης βρέθηκε ότι το γονίδιο *ROBO2* είναι πιθανό να επηρεάζεται από αυτούς τους παράγοντες, καθώς (1) περιέχει οκτώ CpG νησίδες, (2) έχει ομολογία με υψηλή στοίχιση με 3 ώριμα miRNAs και με μικρότερη με 25 ανώριμα miRNAs και (3) το 21,35% της αλληλουχίας του είναι μεταθετά στοιχεία. Αυτοί οι παράγοντες ρύθμισης είναι πιθανό να μειώνουν την έκφραση του γονιδίου, ή να το αποσιωπούν, και έτσι να συμβάλουν στην εμφάνιση των ανωμαλιών που μελετήθηκαν, παρά την απουσία συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλλαγών. Συνολικά, από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η προσέγγιση των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιητικού στον άνθρωπο είναι εξαιρετικά δύσκολη και θα πρέπει να επικεντρωθεί σε πιο ολοκληρωμένα μοντέλα μελέτης, με κυτταρικές σειρές ή όπου είναι δυνατόν να μελετηθεί ιστός από νεφρικές βιοψίες.

## 8. SUMMARY

---

### Introduction

Congenital anomalies of kidney and urinary tract account for almost 0,5% of all pregnancies and are the most often cause of chronic kidney disease in infants and young children. About 30-40% of children with chronic renal disease or end stage renal disease have congenital anomalies of kidney and urinary tract. One of the most frequent is vesico-ureteric reflux (VUR), which is often accompanied by renal hypodysplasia (VUR-RHD). To date, the heritability and the pathogenesis of these anomalies has not been established. *ROBO2* gene is involved during nephrogenesis at the early stage of the ureteric bud induction. However, in the literature it is not clear if the gene is implicated in the pathogenesis of VUR.

### Objectives

The aim of the present study is to evaluate the presence of sequence variations in the *ROBO2* gene in children with VUR and VUR-RHD. *In silico* evaluation was also performed for factors that can epigenetically affect the gene's expression.

### Materials and Methods

A total of 103 paediatric patients were studied: 65 with VUR (10 familial VUR) and 38 with VUR-RHD. A control group of 200 healthy children, age and sex matched with the patients were also screened.

The gene screening was performed by single strand conformation polymorphism (SSCP) or multiple restriction fragment (MRF)-SSCP electrophoresis, in two different running conditions. Subsequently the samples with variations were characterized by direct DNA sequencing. The control group was screened using restriction enzymes or MRF-SSCP. Statistical analysis (chi-square test) was carried out as well as *in silico* analysis for the nucleotide changes that were found (ESEfinder and SplicePort). *In silico* analysis was also performed regarding the content of the gene in CpG islands (EMBOSS CpGPlot), the homology with miRNAs (miRBase) and the content in transposable elements (UCSC Genome Bioinformatics, RepeatMasker).

### Results

The Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) IVS1-53G>A (rs9874095) and IVS5-31A>G (rs76571990) were found. Statistical analysis for IVS1-53G>A showed a significance difference toward the control group and *in silico* analysis showed that the SNP does not affect mRNA splicing. The second SNP, IVS1-53G>A, is reported for the first time, even though it is already recorded, and was detected only in one of the patients. *In silico* results demonstrated an alteration in two SR proteins' binding (ESEfinder) and two additional acceptor sites (SplicePort), exhibiting a high possibility

for the splice site to be affected. The gene has eight CpG islands >200 nucleotides long. The sequence of the gene displays homology with 17 mature miRNAs and 60 pre-miRNAs. Higher score and e-value<0,1 had 3 mature miRNAs and 25 pre-miRNAs. The alignment with the mature miRNAs has a difference from 1-3 bases, whereas with the pre-miRNAs >10 bases. Also the sequence of the gene has a content of 25,9% in transposable elements, including DNA transposons (4,55%), although the last do not participate in any biological procedure, until today.

### **Conclusions**

The results so far indicate that mutations in *ROBO2* are not a major cause of VUR and VUR-RHD in our studied patients, reinforcing the findings for genetic heterogeneity of these anomalies. Even though the gene's implication in the presence of VUR has been reported before, in this study it could not be confirmed, underlining the fact that VUR and VUR-RHD are multifactorial disorders. Besides the changes in the nucleotide sequence, gene expression can be affected epigenetically from factors like methylation, through CpG islands, miRNAs or transposable elements. According to the results of the present study, the *ROBO2* gene could be affected by these factors as (1) it contains eight CpG islands, (2) it has homology with 3 mature miRNAs with high affinity and 25 pre-miRNAs with less and (3) the 21.35% of its sequence are transposable elements. These factors can reduce the gene expression or even silence it, resulting in the pathogenesis of the anomalies studied, even though the gene's sequence is not altered. In total, the study of congenital anomalies of kidney and urinary tract in human is extremely difficult and their research should focus in more complete models, with cell lines or with tissue from biopsies whenever it is possible.

## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Woolf AS. A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. *Kidney International*. 2000;58:500–512.
2. Pope JC 4<sup>th</sup>, Brock JW 3<sup>rd</sup>, Adams MC, 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;10:2018-2028
3. Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation* 2006;74:402–421.
4. Broyer M, Chantler C, Donckerwolcke R, et al. The paediatric registry of the European Dialysis and Transplant Association: 20 years' experience. *Pediatr Nephrol*. 1993;7:758-68.
5. Assael BM, Guez S, Marra G et al, Congenital reflux nephropathy: a follow-up of 180 cases diagnosed perinatally. *British Journal of Urology* 1998;82:252-257.
6. Piper M, Georgas K, Yamada T, et al. Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev*. 2000;94:213-217.
7. Grieshammer U, Ma L, Plump AS, et al. SLIT2-Mediated ROBO2 Signaling Restricts Kidney Induction to a Single Site. *Developmental Cell* 2004;6:709–717.
8. Lu W, van Eerde AM, Fan X, et al. Disruption of ROBO2 Is Associated with Urinary Tract Anomalies and Confers Risk of Vesicoureteral Reflux. *Am J Hum Genet*. 2007;80:616-632.
9. Bertoli-Avella AM, Conte ML, Punzo F, et al. ROBO2 gene variants are associated with familial vesicoureteral reflux. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:825-831.
10. Zu S, Bartik Z, Zhao S, et al. Mutations in the ROBO2 and SLIT2 genes are rare causes of familial vesico-ureteral reflux. *Pediatr Nephrol*. 2009;24:1501-1508.
11. Sanna-Cherchi S, Reese A, Hensle T, et al Familial Vesicoureteral Reflux: Testing Replication of Linkage in Seven New Multigenerational Kindreds. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1781–1787.
12. van Eerde AM, Koeleman BP, van de Kamp JM, et al. Linkage study of 14 candidate genes and loci in four large Dutch families with vesico-ureteralreflux. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:1129-1133.

13. Cordell HJ, Darlay R, Charoen P, et al. Whole-genome linkage and association scan in primary, nonsyndromic vesicoureteric reflux. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:113-123.
14. Vize P, Woolf A, Bard J The Kidney from Normal Development to Congenital Disease 2003 p149-150.
15. Akhtar M, Al Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 2004;11:304-309.
16. Cuckow PM, Nyirady P, Winyard PJD. Normal and abnormal development of the urogenital tract. *Prenat Diagn* 2001;21:908-916.
17. Vainio S, Lin Y Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat RevGenet* 2002;3:533-543.
18. Alpern RJ, Hebert SC, Seldin and Giebisch's The Kidney, 4th Edition, Physiology & Pathophysiology 1-2 2007 p342-344, 488.
19. Woolf AS Embryology. In Barratt TM, Avner ED, Harmon WE, eds. Pediatric Nephrology. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1999:1-19.
20. Schedl A, Hastie ND. Cross-talk in kidney development. *Cur. Opin. Genet. Dev.* 2000;10:543-549.
21. Brodbeck S, Englert C. Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network. *Pediatr Nephrol* 2004;19:249-255.
22. Perantoni AO Renal development: perspectives on a Wnt-dependent process. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2003;14:201-208.
23. Rumballe B, Georgas K, Wilkinson L, et al. Molecular anatomy of the kidney: what have we learned from gene expression and functional genomics? *Pediatr Nephrol* 2010;25:1005-1016.
24. Song R, Yosypiv IV. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol* 2011;26:353-364.
25. Woolf AS, Winyard PJD. Molecular Mechanisms of Human Embryogenesis: Developmental Pathogenesis of Renal Tract Malformations. *Pediatric and Developmental Pathology* 2002;5:108-129.
26. Menke AL, Schedl A. WT1 and glomerular function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2003;14:233-240.
27. Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signalling and the development of the kidney. *Bioessays* 2006;28:117-127.
28. Pohl M, Bhatnagar V, Mendoza SA. Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract. *Kidney Int.* 2002;61:10-19.

29. Yu J, McMahon AP, Valerius T. Recent genetic studies of mouse kidney development. *Current Opinion in Genetics & Development* 2004;14:550–557.
30. Shah MM, Sampogna RV, Sakurai H, and al. Branching morphogenesis and kidney disease. *Development* 2004;131:1449-1462.
31. Welham SJ, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int.* 2002;61:1231-1242.
32. Ribes D, Fischer E, Calmont A, et al. Transcriptional Control of Epithelial Differentiation during Kidney Development. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S9–S15.
33. Bush KT, Vaughn DA, Li X, et al. Development and differentiation of the ureteric bud into the ureter in the absence of a kidney collecting system. *Developmental Biology* 2006;298:571–584.
34. Bridgewater D, Rosenblum ND. Stimulatory and inhibitory signaling molecules that regulate renal branching morphogenesis. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1611–1619.
35. Murer L, Benetti E, Artifoni L. Embryology and genetics of primary vesico-ureteric reflux and associated renal dysplasia. *Pediatr Nephrol* 2007;22:788-797.
36. Piscione TD, Rosenblum ND. The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights. *Differentiation.* 2002;70:227-246.
37. Winyard P, Chitty LS. Dysplastic kidneys. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:142-151.
38. Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, et al. Evolving concepts in human renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:998–1007.
39. Hu P, Deng FM, Liang FX. Ablation of Uroplakin III Gene Results in Small Urothelial Plaques, Urothelial Leakage, and Vesicoureteral Reflux. *The Journal of Cell Biology* 2000;151:961-971.
40. Davies JA, Fisher CE. Genes and Proteins in Renal Development. *Exp Nephrol* 2002;10:102–113.
41. Bates CM. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *Pediatr Nephrol* 2007;22:343–349.
42. Hains D, Sims-Lucas S, Kish K, et al. Role of fibroblast growth factor receptor 2 in kidney mesenchyme. *Pediatr Res.* 2008;64:592-598.

43. Mori K, Yang J, Barasch J. Ureteric bud controls multiple steps in the conversion of mesenchyme to epithelia. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2003;14:209–216.
44. Kelly H, Molony CM, Darlow JM, et al. A genome-wide scan for genes involved in primary vesicoureteric reflux. *J Med Genet.* 2007;44:710-717.
45. Mizuno R. Increase in male fetal deaths in Japan and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Reproductive Toxicology* 2010;30:405–408.
46. Basson MA, Watson-Johnson J, Shakya R, et al. Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. *Developmental Biology* 2006;299:466–477.
47. Jain S, Encinas M, Johnson EM Jr, et al. Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development. *Genes Development* 2006;20:321-333.
48. Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* 2007;8:791-802.
49. Sakurai H. Molecular mechanism of ureteric bud development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2003;14:217–224.
50. Rosenblum ND. Developmental biology of the human kidney. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:125-132.
51. Dressler GR. The Cellular Basis of Kidney Development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:509–529.
52. Grote D, Boualia SK, Souabni A, et al. Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS Genet.* 2008;4:e1000316.
53. Jain S. The many faces of RET dysfunction in kidney. *Organogenesis.* 2009;5:95-108.
54. Cacalano G, Farinas I, Wang L, et al GFRa1 Is an Essential Receptor Component for GDNF in the Developing Nervous System and Kidney. *Neuron* 1998;21:53–62.
55. Enomoto H, Araki T, Jackman A, et al. GFRa1-Deficient Mice Have Deficits in the Enteric Nervous System and Kidneys. *Neuron* 1998;21:317-324.
56. Tomac AC, Grinberg A, Huang SP, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor  $\alpha 1$  availability regulates Glial cell line-derived neurotrophic factor signalling: evidence from mice carrying one or two mutated alleles. *Neuroscience* 2000;95:1011–1023.



57. Gambaro G, Fabris A, Citron L, et al. An unusual association of contralateral congenital small kidney, reduced renal function and hyperparathyroidism in sponge kidney patients: on the track of the molecular basis. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1042–1047.
58. Dressler GR. Epigenetics, development, and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2060-2067.
59. Rozen EJ, Schmidt H, Dolcet X, et al. Loss of Sprouty1 rescues renal agenesis caused by Ret mutation. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:255-259.
60. Masson JM, Morrison DJ, Basson MA, et al. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signalling. *Trends Cell Biol*. 2006;16:45-54.
61. Stahl AD, Koul HK, Chacko JK, et al. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): A current review of cell signalling processes in ureteral development. *Journal of Pediatric Urology* 2006;2:2-9.
62. Hoshino T, Shimizu R, Ohmori S, et al. Reduced BMP4 abundance in Gata2 hypomorphic mutant mice result in uropathies resembling human CAKUT. *Genes to Cells* 2008;13:159-170.
63. Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, et al. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J. Clin. Invest*. 2000;105:863–873.
64. Chen F. Genetic and development basis for urinary tract obstruction. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1621–1632.
65. Murawski IJ, Gupta IR. Vesicoureteric reflux and renal malformations: a developmental problem. *Clin Genet* 2006;69;105–117.
66. Marose TD, Merkel CE, McMahon AP, et al.  $\beta$ -catenin is necessary to keep cells of ureteric bud/Wolffian duct epithelium in a precursor state. *Dev Biol*. 2008;314:112-126.
67. Ichikawa I, Kuwayama F, Pope JC 4th, et al. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney International* 2002;61:889–898.
68. Sanna-Cherchi S, Caridi G, Weng PL, et al. Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia. *Pediatr Nephrol* 2007;22:1675–1684.
69. Maxwell PA. Genetic renal abnormalities. *Medicine* 2007;35:386-392.
70. Woolf AS. Renal Hypoplasia and Dysplasia: Starting to Put the Puzzle Together. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2647–2649.
71. Seikaly MG, Ho PL, Emmett L, et al. Chronic renal insufficiency in children: the 2001 Annual Report of the NAPRTCS. *Pediatr Nephrol*. 2003;18:796-804.

72. Pasch A, Hoefele J, Grimminger H, et al. Multiple urinary tract malformations with likely recessive inheritance in a large Somalian kindred. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:3172–3175.
73. Kuwayama F, Miyazaki Y, Ichikawa I. Embryogenesis of the congenital anomalies of the kidney and the urinary tract. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:45–47.
74. Feather SA, Malcolm S, Woolf AS, et al. Primary, Nonsyndromic Vesicoureteric Reflux and Its Nephropathy Is Genetically Heterogeneous, with a Locus on Chromosome 1. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;66:1420–1425.
75. Greenbaum LA, Mesrobian HG. Vesicoureteral reflux. *Pediatr Clin North Am.* 2006;53:413–427.
76. Viana R, Batourina E, Huang H, et al. The development of the bladder trigone, the center of the anti-reflux mechanism. *Development.* 2007;134:3763–3769.
77. Shefelbine S, Khorana S, Schultz P, et al. Mutational analysis of the GDNF/RET-GDNFRa signalling complex in a kindred with vesicoureteral reflux. *Hum Genet* 1998;102:474–478.
78. Yu OH, Murawski IJ, Myburgh DB, et al. Overexpression of RET leads to vesicoureteric reflux in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1123–F1130.
79. Brodeur AE, Goyer RA, Melick W. A potential hazard of barium cystography. *Radiology.* 1965;85:1080–1084.
80. Ransley PG, Risdon RA. Renal papillae and intrarenal reflux in the pig. *Lancet.* 1974;2:1114.
81. Zaffanello M, Tardivo S, Cataldi L, et al. Genetic susceptibility to renal scar formation after urinary tract infection: a systematic review and meta-analysis of candidate gene polymorphisms. *Pediatr Nephrol.* 2011;26:1017–1029.
82. Akil I, Ozkinay F, Onay H, et al. Assessment of Toll-like receptor-4 gene polymorphism on pyelonephritis and renal scar. *Int J Immunogenet.* 2012 ahead of print (doi: 10.1111/j.1744-313X.2012.01090.x).
83. Aslan S, Akil I, Aslan G, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism in children with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:417–421.
84. Cendron M. Reflux nephropathy. *Journal of Pediatric Urology* 2008;4:414–421.
85. Conte ML, Bertoli-Avella AM, de Graaf BM, et al. A genome search for primary vesicoureteral reflux shows further evidence for genetic heterogeneity. *Pediatr Nephrol.* 2008;23:587–595.

86. Vats KR, Ishwad C, Singla I, et al. A Locus for Renal Malformations Including Vesico-Ureteric Reflux on Chromosome 13q33–34. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1158–1167.
87. Chapman CJ, Bailey RR, Janus ED, et al. Vesicoureteric reflux: segregation analysis. *Am. J. Med. Genet.* 1985;20:577–584.
88. Middleton GW, Howards SS, Gillenwater JY. Sex-linked familial reflux. *J Urol* 1975;114:36–39.
89. Burger RH, Smith C. Hereditary and familial vesicoureteral reflux. *J Urol.* 1971;106:845-851.
90. de Vargas A, Evans K, Ransley P, et al. A family study of vesicoureteric reflux. *J Med Genet* 1978;15:85–96.
91. Eccles MR, Bailey RR, Abbott GD, et al. Unravelling the genetics of vesicoureteric reflux: a common familial disorder. *Hum Mol Genet* 1996;5:1425–1429.
92. Rosenfeld JB, Cohen L, Garty I, et al. Unilateral renal hypoplasia with hypertension (Ask-Upmark kidney). *Br Med J.* 1973;2:217-218.
93. Arant BS Jr, Sotelo-Avila C, Bernstein J. Segmental "hypoplasia" of the kidney (Ask-Upmark). *J Pediatr.* 1979;95:931-9.
94. Abdelraheem M, Watson AR, McCulloch TA. Oligomeganephronia: an unexpected cause of chronic renal failure. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2004;15:53-56.
95. Cain JE, Di Giovanni V, Smeeton J, et al. Genetics of renal hypoplasia: insights into the mechanisms controlling nephron endowment. *Pediatr Res.* 2010;68:91-98.
96. Risdon RA, Young LW, Chrispin AR Renal hypoplasia and dysplasia: a radiological and pathological correlation. *Pediatr Radiol.* 1975;3:213-225.
97. Sanna-Cherchi S, Caridi G, Weng PL, et al. Localization of a Gene for Nonsyndromic Renal Hypodysplasia to Chromosome 1p32-33. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;80:539–549.
98. Weber S, Moriniere V, Knuppel T, et al. Prevalence of Mutations in Renal Developmental Genes in Children with Renal Hypodysplasia: Results of the ESCAPE Study. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2864–2870.
99. Jiang S, Gitlin J, Deng FM, et al. Lack of major involvement of human uroplakin genes in vesicoureteral reflux: Implications for disease heterogeneity. *Kidney International* 2004;66:10–19.
100. Murawski IJ, Gupta IR. Gene discovery and vesicoureteric reflux. *Pediatr Nephrol* 2008;23:1021–1027.

101. Kelly H, Ennis S, Yoneda A, et al. Uroplakin III is not a major candidate gene for primary vesicoureteral reflux. *European Journal of Human Genetics* 2005;13:500–502.
102. Zagradisnik B, Bracic K, Varda NM, et al. G-protein  $\beta 3$  subunit gene C825T polymorphism in patients with vesico-ureteric reflux. *Annales de Génétique* 2004;47:209–216.
103. Yim HE, Bae IS, Yoo KH, et al. Genetic control of VEGF and TGF- $\beta 1$  gene polymorphisms in childhood urinary tract infection and vesicoureteral reflux. *Pediatr Res.* 2007;62:183-187.
104. Hildebrandt F. Genetic kidney diseases. *Lancet.* 2010;375:1287-1295
105. Skinner MA, Safford SD, Reeves JG, et al. Renal aplasia in humans is associated with RET mutations. *Am J Hum Genet.* 2008;82:344-51.
106. Yang Y, Houle AM, Letendre J, et al. RET Gly691Ser mutation is associated with primary vesicoureteral reflux in the French-Canadian population from Quebec. *Hum Mutat.* 2008;29:695-702.
107. Kerecuk L, Sajoo A, McGregor L, et al. Autosomal dominant inheritance of non-syndromic renal hypoplasia and dysplasia: dramatic variation in clinical severity in a single kindred. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:259–263.
108. Dudziak K, Mottalebi N, Senkel S, et al. Transcription factor HNF1beta and novel partners affect nephrogenesis. *Kidney Int.* 2008;74:210-217.
109. Fischer E, Pontoglio M. HNF1beta and defective nephrogenesis: a role for interacting partners? *Kidney Int.* 2008;74:145-147.
110. Zaffanello M, Brugnara M, Franchini M, et al. TCF2 gene mutation leads to nephro-urological defects of unequal severity: an open question. *Med Sci Monit.* 2008;14:RA78-RA86.
111. Woolf AS. Perspectives on human perinatal renal tract disease. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2008;13:196-201.
112. Tabatabaeifar M, Schlingmann KP, Litwin M, et al. Functional analysis of BMP4 mutations identified in pediatric CAKUT patients. *Pediatr Nephrol.* 2009;24:2361-2368.
113. Brose K, Bland KS, Wang KH, et al. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell.* 1999;96:795-806.
114. Yue Y, Grossmann B, Galetzka D, et al. Isolation and differential expression of two isoforms of the ROBO2/Robo2 axon guidance receptor gene in humans and mice. *Genomics* 2006;88:772-8.

115. Piper M, Nurcombe V, Wilkinson L, et al. Exogenous Slit2 does not affect ureteric branching or nephron formation during kidney development. *Int. J. Dev. Biol.* 2002;46:545-550.
116. Lu W, Quintero-Rivera F, Fan Y, et al. NFIA Haploinsufficiency Is Associated with a CNS Malformation Syndrome and Urinary Tract Defects. *PLoS Genet* 2007;3:e80.
117. Nagase T, Kikuno R, Nakayama M, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 2000;7:273-281.
118. Stein RA. Epigenetics and environmental exposures. *J Epidemiol Community Health.* 2012;66:8-13.
119. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19:92-105.
120. Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. *Immune Netw.* 2011;11:309-323.
121. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, et al. miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun Rev.* 2012;11:636-641.
122. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
123. Goodier JL, Kazazian HH. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 2008;135:23-35.
124. Shapiro JA. Genome system architecture and natural genetic engineering in evolution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1999;870:23-35.
125. Perepelitsa-Belancio V, Deininger PL. RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nat. Genet.* 2003;35:363-6.
126. Buzdin A, Kovalskaya-Alexandrova E, Gogvadze E, et al. At least 50% of human-specific HERV-K (HML-2) long terminal repeats serve in vivo as active promoters for host nonrepetitive DNA transcription. *J Virol.* 2006;80:10752-10762.
127. Babushok DV, Kazazian HH Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum. Mutat.* 2007;28:527-39.

128. Georgiou I, Noutsopoulos D, Dimitriadou E, et al. Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Hum Mol Genet.* 2009;18:1221-1228.
129. Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 2004;303:1626-1632.
130. International Reflux Study Committee 1981 Medical versus surgical treatment of primary vesicoureteral reflux: report of the International Reflux Study Committee. *Pediatrics* 67:392-400.
131. Avni FE, Hall M. 2004 Diagnostic imaging. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (eds) Pediatric Nephrology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 449-473.
132. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990;48:579-582.
133. Humphries SE, Gudnason V, Whittall R, et al. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division: Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem.* 1997;43:427-35.
134. Kalvatchev Z, Draganov P. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis: A rapid and sensitive method for detection of genetic diversity among virus population. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2005;19:9-14.
135. Sato Y, Nishio T. Mutation detection in rice waxy mutants by PCR-RF-SSCP. *Theor Appl Genet* 2003;107:560-567.
136. Thongnoppakhun W, Limwongse C, Vareesangthip K, et al. Novel and de novo PKD1 mutations identified by multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP). *BMC Med Genet.* 2004;5:2.
137. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291:1304-1351.
138. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
139. Enayat MS Restriction fragment length polymorphism. *Methods Mol Biol.* 2002;187:29-35.
140. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, et al. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3568-3571.
141. Dogan RI, Getoor L, Wilbur WJ, et al. SplicePort - an interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W285-W291.

142. Macfarlan TS, Gifford WD, Driscoll S, et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* 2012 Ahead of print, doi:10.1038/nature11244.
143. Shakya R, Jho EH, Kotka P, et al. The role of GDNF in patterning the excretory system. *Developmental Biology* 2005;283:70–84.
144. Kapoor S. Vesicoureteral reflux: genetic associations besides the Hinman syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 2008;12:416.
145. Yosypiv IV Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a genetic disorder? *Int J Nephrol*. 2012;2012:909083.
146. Welham SJ, Riley PR, Wade A, et al. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics*. 2005;22:48-56.
147. Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002;418:244-251.
148. Hedges DJ, Deininger PL. Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutat Res*. 2007;616:46-59.
149. Kano H, Godoy I, Courtney C, et al. L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes Dev* 2009;23:1303-1312.
150. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet*. 2009;10:691-703.