

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2015 – 2016

**ETIOLOGIE EN ONTWIKKELINGSMECHANISMEN VAN  
NIERCORTEXHYPOPLASIE**

door

Lien STAELENS

Promotoren: Prof. dr. P. Cornillie  
M. Sc. Anastasia Logothetidou

Literatuurstudie in kader  
van de masterproef

© 2016 *Lien Staelens*



*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.*

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.*

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2015 – 2016

**ETIOLOGIE EN ONTWIKKELINGSMECHANISMEN VAN  
NIERCORTEXHYPOPLASIE**

door

Lien STAELENS

Promotoren: Prof. dr. P. Cornillie  
M. Sc. Anastasia Logothetidou

Literatuurstudie in kader  
van de masterproef

© 2016 *Lien Staelens*

## **VOORWOORD**

Hierbij wil ik mijn oprechte dank betuigen aan professor dr. Pieter Cornillie voor zijn hulp bij het bekritisieren en bijsturen van deze literatuurstudie. Ik zou graag mijn ouders bedanken om mij de kans te geven deze studie te verwezenlijken en uiteindelijk mijn droomberoep te mogen uitoefenen. Een extra dankwoordje aan mijn ouders en mijn zus voor hun mentale steun gedurende mijn hele opleiding en hun vertrouwen in mijn kunnen. Bedankt aan mijn vrienden voor de geweldige studententijd en de bemoedigende schouderklopjes. Als laatste een welverdiende merci aan mijn vriendin voor het herlezen, de steun en dat laatste duwtje in de rug.

## INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING .....	1
INLEIDING.....	2
LITERATUURSTUDIE .....	3
1. NORMALE ONTWIKKELING EN MORFOLOGIE VAN DE NIER.....	3
1.1    Ontwikkeling van de primitieve nier: pronefros en metanefros .....	3
1.2    Morfologische ontwikkeling van de definitieve nier: metanefros .....	5
1.3    Genetische regulatie van de metanefrogene ontwikkeling.....	7
1.3.1    Inductie van het ureteraal divertikel.....	8
1.3.2    Vertakking van het ureteraal divertikel .....	9
2. NIERCORTEXHYPOPLASIE .....	10
2.1    Definitie .....	10
2.2    Genetische oorzaken.....	10
2.2.1    RET / GDNF en Spry1 .....	11
2.2.2    Pax-genen .....	14
2.2.3    Wnt-genen .....	15
2.2.4    Six-genen.....	17
2.2.5    BMP-genen.....	17
2.2.6    Overige genen .....	19
2.3    Omgevingsfactoren.....	19
DISCUSSIE .....	20
CONCLUSIE.....	22
REFERENTIELIJST .....	23

## SAMENVATTING

De ontwikkeling van het urogenitaal stelsel is een delicaat en ingewikkeld proces in de embryogenese waarbij vele genen elk een fundamentele rol spelen. Wanneer het fout gaat in deze geneninteractie kunnen er verschillende nierpathologieën ontstaan, waaronder niercortexhypoplasie. Dit wordt gedefinieerd als nieren die globaal kleiner zijn aangelegd door een onderontwikkelde, dunnere cortex (hypoplasie van de niercortex). Op histologisch beeld wordt er een gedaald aantal nefronen gezien, waarbij elk van deze nefronen morfologisch normaal is opgebouwd. Een verstoorde organisatie van het corticaal weefsel kan eveneens aanwezig zijn.

Een van de belangrijkste mutaties die niercortexhypoplasie veroorzaken door een heterozygote Pax2-mutatie (paired-box family 2), al dan niet in combinatie met een mutatie in het RET-gen (RET-protocoon). Hierdoor wordt de ligand-receptorinteractie GDNF / RET belemmerd en is de inductie van het ureteraal divertikel vanuit het kanaal van Wolff verstoord. Een homozygote GDNF-mutatie (glial cell line – derived neurotrophic factor) leidt eveneens tot dit resultaat. Wanneer hierbij ook het Sprouty1-gen afwezig is door een homozygote mutatie, gaat de nefrogenese wel correct door. De reden hiervoor is dat door de homozygote Sprouty1-mutatie, de inhibitie van de uitgroei van het ureteraal divertikel wegvalt.

Ook in genen binnen de Wntless MMTV integration site family werd er vastgesteld dat heterozygote Wnt4-mutaties en homozygote Wnt11-mutaties de nefrogenese kunnen verstoren vanwege hun impact op het vertakkingsproces van het primitief nierbekken. Eveneens voor heterozygote Wnt11-mutaties in combinatie met een mutatie in het RET-gen resulteert in niercortexhypoplasie. Wanneer een mutatie optreedt in het Six2-gen (Six2), wordt de proliferatie van het metanefrogeen blastoom geremd, terwijl Six1-mutaties (Six1) de expressie van GDNF in het kanaal van Wolff onderdrukken. Beide resulteren in een hypoplasie van de niercortex. Mutaties in bone morphogenetic protein 4 leiden tot verschillende soorten nieraandoeningen, waaronder ook corticale hypoplasie. Heterozygote BMP4-mutatie verstoort hierbij de proliferatie of induceert een verhoogde apoptose van het metanefrogeen blastoom waardoor de nierontwikkeling belemmerd wordt.

Naast nog vele andere genmutaties kunnen ook omgevingsfactoren in utero een inhiberende invloed hebben op de nefrogenese. Voorbeelden hiervan zijn een eiwitdeficiëntie of een vitamine-A-deficiëntie in het maternale dieet of bepaalde medicatie zoals thalidomide en dexamethasone.

## INLEIDING

Niercortexhypoplasie is een erfelijke, congenitale aandoening die vaak gezien wordt bij de kleine huisdieren. Het wordt gekarakteriseerd door een onvolledige ontwikkeling – een hypoplasie – van de niercortex. Op histologisch beeld wordt het gekenmerkt door een gedaald aantal nefronen met een compensatoire hyperfiltratie door de overige nefronen. Uiteindelijk zullen de nefronen vroegtijdig afsterven met als gevolg dat de toxines gebrekkig uit het bloed gefilterd worden. Niercortexhypoplasie leidt ten slotte tot onvermijdelijk nierfalen.

Morfologisch is de aandoening getypeerd door de aanwezigheid van kleine nieren door een gedaalde verhouding cortex / medulla. Histologisch wordt een opvallend gereduceerd aantal nefronen gezien (Weber et al., 2006). De aanwezige nefronen zijn normaal aangelegd, maar worden later hyperplastisch ten gevolge van hyperfiltratie als compensatie van het nefronentekort. De nefronen zijn intact, in tegenstelling tot bij een dysplasie van de nieren. Hypoplastische nieren hebben al dan niet een abnormale organisatie van het nierweefsel, waarbij differentiatie van de cortico-medullaire regio ontbreekt (Eccles en Schimmenti, 1999; Weber et al., 2006; Sanna-Cherchi et al., 2007).

In deze literatuurstudie wordt de vraag gesteld welke oorzaken aan de basis liggen van renale corticale hypoplasie en of er nog een extra-genetische drijfveer bestaat voor deze congenitale aandoening. Het belang van deze vraagstelling ligt in de preventie. Eens de erfelijke oorzaken van niercortexhypoplasie gekend zijn, kan er hiermee rekening gehouden worden bij fokprogramma's. Dieren die drager zijn van dergelijke mutaties worden best uitgesloten voor de fok.

In deze literatuurstudie wordt dus enkel ingegaan op de meest frequente genmutaties die renale hypoplasie kunnen veroorzaken. Hierbij worden er ook kort andere oorzaken aangehaald die buiten het genoom liggen. Om deze literatuurstudie begrijpelijk te maken, wordt er eerst ingegaan op de normale morfologische aspecten en genetische regulatie van de nierontwikkeling, zodat daarna de abnormaliteiten in deze genenwerking duidelijk worden.

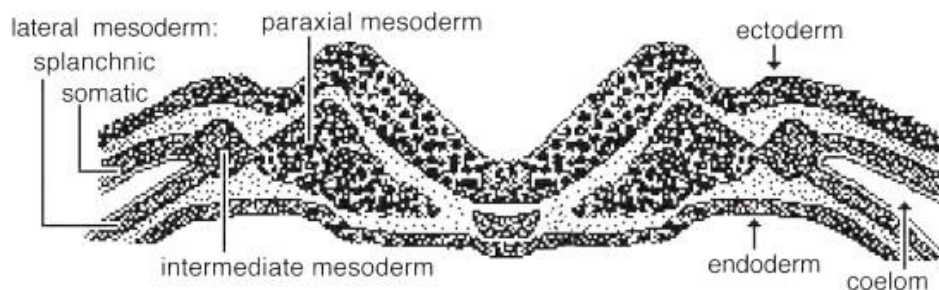


## LITERATUURSTUDIE

### 1. NORMALE ONTWIKKELING EN MORFOLOGIE VAN DE NIER

#### 1.1 Ontwikkeling van de primitieve nier: pronefros en metanefros

Na de gastrulatie is het voorheen tweebladig embryo - bestaande uit hypoblast en epiblast - uit drie kiemlagen opgebouwd: het endoderm, mesoderm en ectoderm. Het mesoderm is het middelste kiemblad gelegen tussen het uitwendig kiemblad of het ectoderm en de inwendige kiemlaag of het endoderm. Het mesoderm wordt gevormd doordat epiblastcellen in de mediaanlijn via de primitieve groeve gaan inrollen tussen de epiblast (het toekomstig ectoderm) en de hypoblast. De ingerolde cellen spreiden zich tussen de 2 bladen naar lateraal en vormen zo het mesoderm (Christ en Ordahl, 1995).

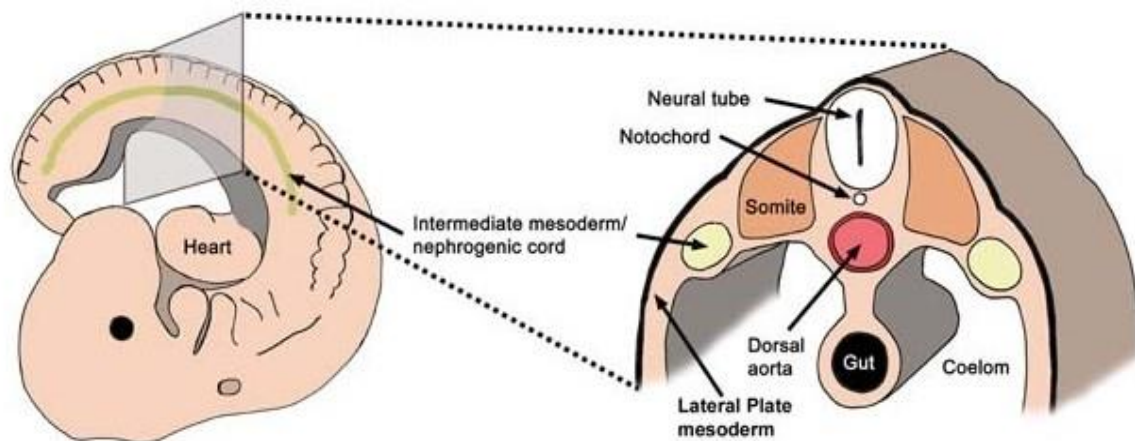


*Figuur 1: Dwarsdoorsnede van een embryo in het gastrulatiestadium:*

*Het embryo bestaat in het gastrulatiestadium uit drie kiemlagen: het binnenste blad (endoderm), het buitenste blad (ectoderm) met de primitieve groeve en het tussenliggend mesoderm. Het mesoderm wordt opgedeeld in drie domeinen: het lateraal mesoderm (onderverdeeld in het somatisch en splanchnisch mesoderm), het intermediair mesoderm en het paraxiaal mesoderm.*

*Uit: Fletcher en Weber, 2013*

Het mesoderm wordt ter hoogte van de romp onderverdeeld in drie duidelijke regio's: het paraxiaal, intermediair en lateraal mesoderm. De mesodermale cellen die het dichtst tegen de notochord liggen en de latere neurale buis flankeren, behoren tot het paraxiaal mesoderm ofwel epimeer genoemd. Deze paraxiale mesodermcellen gaan clusteren, zo een segmentaal patroon aannemen en vormen uiteindelijk de somieten (figuur 2) (Christ en Ordahl, 1995). Het aantal somieten in een embryo is indicatief voor de leeftijd van het embryo, aangezien iedere somiet chronologisch in craniocaudale richting ontstaat. De somieten zijn de basis voor de vorming van de wervels, de spieren en het bindweefsel van het axiaal skelet (Fletcher en Weber, 2013). Het meest lateraal deel van het mesoderm wordt ook wel hypomeer genoemd. Deze splitst in twee lagen waartussen een holte ontstaat: de coeloomholte (Tonegawa et al., 1997).



*Figuur 2: schematische representatie en lokalisatie van het intermediair mesoderm en de nefrogene kam bij een muizenembryo (E9,5). Linker figuur: longitudinale doorsnede in de mediaanlijn van het embryo met het verloop van de nefrogene kam (nephrogenic cord; groene lijn). Deze nefrogene kam ontstaat uit het intermediair mesoderm (intermediate mesoderm). Rechter figuur: dwarsdoorsnede van het embryo ter hoogte van de romp. Anatomische positie van embryonale structuren: de neuraalbus (neural tube), het intermediair mesoderm (waaruit de nefrogene kam ontstaat), coeloomholte (coelom), dorsale aorta en de ligging van de somieten (somite).  
Uit: Davidson, 2009*

Het intermediair mesoderm is gelegen tussen de somieten en het lateraal mesoderm. Uit dit intermediair mesoderm wordt een urogenitale kam gevormd in het dak van de coeloomholte. Dit is de basis voor de vorming van het urogenitale stelsel. De urogenitale kam splitst in een lateraal gelegen nefrogene kam en een mediaal gelegen genitale kam. De nefrogene kam ligt over de volledige lengte van de coeloomholte als een soort streng die zich uitstrekt van in de cervicale regio tot aan de cloaca (zie figuur 2). Hierdoor wordt de nefrogene kam in de literatuur ook vaak aangeduid als nefrogene streng. Het meest craniale deel van de nefrogene streng groeit uit tot pronefros in de cervicale regio door signalen vanuit het paraxiaal mesoderm (Dressler, 2006; Fletcher en Weber, 2013).

Tijdens de vorming van de urogenitale kam ontstaat er bilateraal ter hoogte van de zesde somiet tot de dertiende à veertiende somiet een reeks van uitsparingen in de coeloomholte. Hierdoor worden er een soort van trechtervormige, pronefrotische kanaaltjes (tubuli pronephrotici) aangelegd tussen de coeloomholte en het intermediair mesoderm. Vanaf de elfde tot dertiende somiet vormen de cellen van het intermediair mesoderm op de contactplaats met de pronefrotische tubuli een longitudinale streng. Via mesenchym-epitheleeltransitie en lumenvorming van deze streng komt zo het pronefrotisch kanaal (ductus pronephroticus) tot stand. Deze ductus groeit caudaal verder uit tot aan de cloaca en zal met deze laatste een open verbinding vormen later in de ontwikkeling. Van daaruit vloeit de urine van de cloaca via het urachuskanaal in de allantoïsholte. De pronefrotische tubuli craniaal van de dertiende somiet reduceren snel. Net caudaal van de dertiende somiet ontstaan ongeveer drie kleine mesenchymale condensaties vanuit het pronefrotisch kanaal die hoogstwaarschijnlijk precursoren van pronefrotische nefronen voorstellen. Deze gaan evenwel niet verder differentiëren, maar wel snel regresseren, waardoor de pronefros bij zoogdieren rudimentair en niet functioneel is in de embryonale ontwikkeling (Fraser, 1950; Dressler, 2006; Davidson, 2009). Bij het schaap daarentegen (en

waarschijnlijk ook bij andere herkauwers) is de pronefros niet rudimentair en groeit ze uit tot een voornier met gedifferentieerde glomeruli en tubuli. De gevormde glomeruli fuseren tot één enorme glomerulus of ook wel 'glomus' genoemd. Bloed vanuit de dorsale aorta wordt door de glomus gefiltreerd en epitheliale tubuli verbinden de glomus met de ductus pronephroticus om zo de afvalstoffen naar de coelomholte te draineren. Deze uitzonderlijke, functionele pronefros persisteert tot laat in de embryonale ontwikkeling van het schaap en verzorgt de embryonale nierfunctie (Davies, 1951; Dressler, 2006).

De mesonefros (of oernier) is het volgend ontwikkelingsstadium, maar evenzeer slechts een tijdelijke nier in de embryonale ontwikkeling van de zoogdieren. Het pronefrotisch kanaal induceert de vorming van tubuli in de thoracolumbale regio van de nefrogene streng. Deze tubuli omgeven elk ventromediaal een primitieve vaatnetwerk. Dit kluwen van capillairen, dat aangeduid wordt met het begrip 'glomerulus', ontstaat vanuit een kleine arterie die uit de dorsale aorta ontspringt. De uiteinden van de tubuli aan de kant van het vaatkluwen vormen een soort trechter rond elke glomerulus. Deze trechter wordt het kapsel van Bowman genoemd. Van zodra de buisjes in verbinding staan met het pronefrotisch kanaal, wordt dit kanaal aangeduid als het mesonefrotisch kanaal of het kanaal van Wolff (Kuure et al., 2000). De mesonefros is de functionele filter van het bloed tijdens de embryonale ontwikkeling. De meeste van deze mesonefrotische buisjes degenereren van zodra de metanefros (de definitieve nier) functioneel wordt (Dressler, 2006). Bij mannelijke dieren blijft het mesonefrotisch kanaal bestaan en is het de basis voor de ontwikkeling van de epididymis, de ductus deferens en de zaadblaasjes (Torres et al., 1995).

## **1.2 Morfologische ontwikkeling van de definitieve nier: metanefros**

De initiële aanleg van de definitieve nier ontstaat door een wisselwerking tussen het caudaal deel van het mesonefrotisch kanaal en het aangrenzend metanefrogeen blasteem. Het metanefrogeen blasteem is een condensatie van mesenchymale cellen uit het sacraal intermediair mesoderm die de aanleg vormt voor het tot stand komen van de metanefros. Door de genetische interactie met het metanefrogeen blasteem ontwikkelt er zich een lokale uitgroei van het caudaal deel van het mesonefrotisch kanaal. Deze uitstulping van het mesonefrotisch kanaal invadeert het aangrenzend metanefrogeen blasteem en noemt men vervolgens het ureteraal divertikel. Het ureteraal divertikel induceert de verdere ontwikkeling van het metanefrogeen blasteem tot de vorming van nefronen. Vice versa induceert het metanefrogeen blasteem het ureteraal divertikel om te dilateren tot een primitief nierbekken. De steel die dit primitief nierbekken met het mesonefrotisch kanaal verbindt, is de basis voor de latere ureter (Fletcher en Weber, 2013).

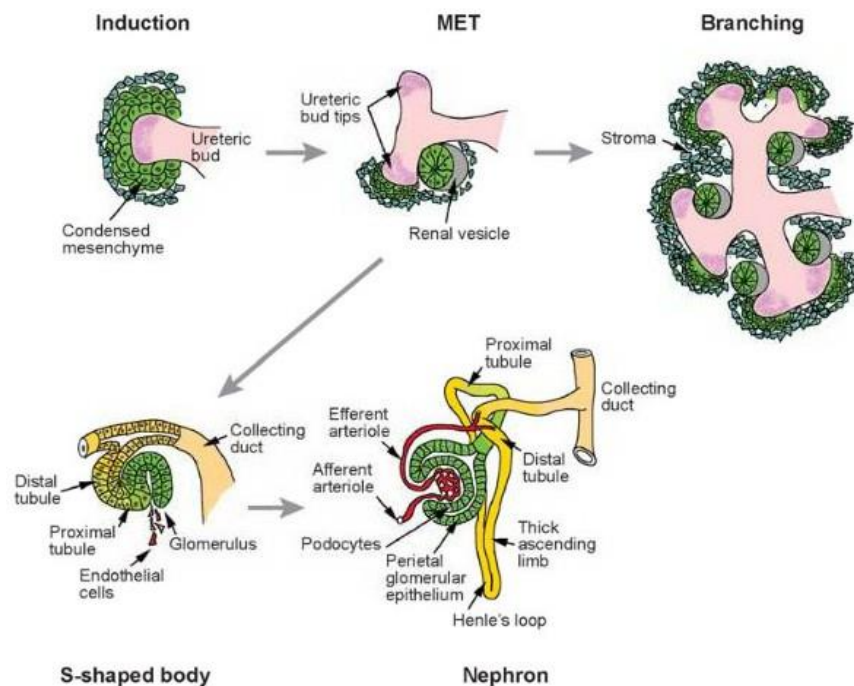
Vanuit het primitief nierbekken zullen er kanaaltjes vertrekken in het metanefrogeen blasteem die zich dichotoom zullen vertakken tot papillaire kanaaltjes (ductus papillares). Een deel van de mesenchymale cellen van het metanefrogeen blasteem vormen kapvormige celaggregaten rond de toppen van de vertakkingen en ondergaan mesenchym-epitheleeltransitie (MET). Vanaf nu worden deze celaggregaten nierkogeltjes genoemd. Doordat de nierkogeltjes aan één kant in contact staan met het

primitief nierbekken, (via de papillaire kanaaltjes) krijgen de mesenchymale cellen een apicale polariteit (Dressler, 2006; Little et al., 2010). Aan de distale pool wordt een spleet gevormd en krijgt het nierkogeltje een komma-vorm. Hierbij zal de nierkogel ook elongeren en kanaliseren, waardoor er een lumen ontstaat. Vanaf hier spreekt men van een nierblaasje. Door de vorming van een tweede kloof aan het distale einde krijgt het nierblaasje een S-vorm en wordt deze beter een metanefrotische tubulus genoemd. Het epitheel van de verschillende tubuli fusioneren met het epitheel van het primitief nierbekken en vormen zo continu kanaal (Kuure et al., 2000).

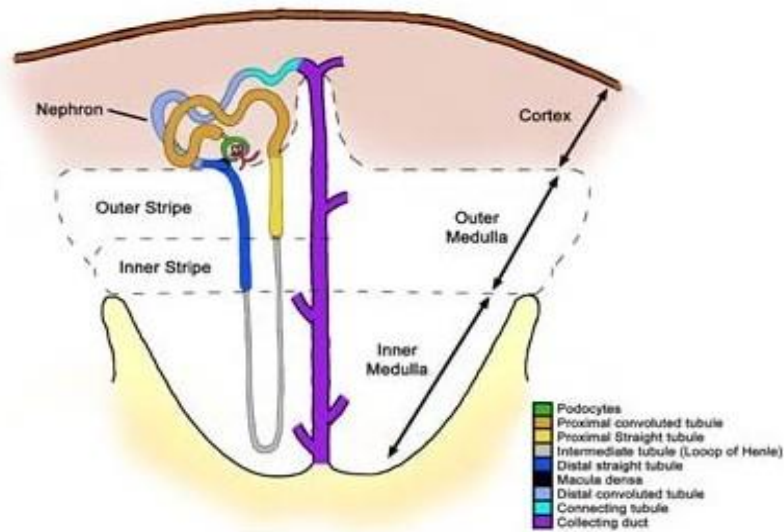
Aan het andere einde van de tubulus migreren endotheliale cellen naar de meest proximale spleet (het verst weg van de verzamelbuis) en vormen daar een gefenestreerd vasculair netwerk. Dit vaatkluwen wordt een glomerulus genoemd (gelijkaardig als de glomerulus gevormd in het mesonefrosstadium).

Dit capillair netwerk staat in contact met een afferente en efferente arteriole. Ieder uiteinde van de gevormde tubuli zal uitgroeien om het glomerulair vaatnetwerk

te omgrenzen als een soort trechter en zo het glomeruluskapsel te vormen (Fletcher en Weber, 2013). Het middelste gedeelte van iedere tubulus elongeert en differentieert in de karakteristieke regio's van een nefron. Net na het nierlichaampje wordt de tubulus contortus proximalis aangelegd. Deze wordt gevolgd door een rechte proximale tubulus. Een versmalde bocht van het nefron in de medulla van de nier vormt de smalle lis van Henle en verbreedt daarna tot het rechte stuk van de distale tubulus. Bij de overgang naar de cortex van de nier krijgt de distale tubulus terug een kronkelend verloop: de distale tubulus contortus. De tubulus contortus distalis sluit uiteindelijk aan op de verzamelbuis, die zijn weg vindt tot in het nierbekken. Van daaruit wordt de urine uit de nier naar de blaas afgevoerd via de ureter (Davidson, 2009).



*Figuur 3: verschillende stappen van de nefrogenesis: inductie van het ureteraal divertikel veroorzaakt condensatie van het mesenchym rond het ureteraal divertikel. De vertakking loopt verder tot een primitief nierbekken gevormd wordt en de aggregaten rond de uiteinden vormen nierkogeltjes. De uiteindelijke differentiatie tot een volledig nefron gebeurt door polarisatie van de nierkogeltjes (doordat de cellen mesenchymale – epitheliale transitie ondergaan). Hierdoor krijgt het nierkogeltje een komvorm, zal elongeren en kanaliseren tot een nierblaasje (S-vorm). De eerste groeve van het nierblaasje wordt een glomerulus, de distale groeve elongeert tot het tubulair systeem van het resulterend nefron. Ureteric bud = ureteraal divertikel; condensed mesenchyme = metanefrogeen blastoom; renal vesicle = renaal vesikel*  
 Uit: Dressler, 2006



*Figuur 4: opbouw van een nefron*

*Iedere nier is omgeven door een nierkapsel, met daaronder een buitenste cortexlaag en een binnenste medulla. Het bloed wordt gefilterd in de glomerulus (groen). In het tubulair systeem worden waardevolle stoffen zoals natrium, glucose en water actief geresorbeerd. Dit tubulair systeem wordt onderverdeeld in proximale en distale tubuli recti en de lus van Henle. De distale tubulus rectus mondt uit in de verzamelbuis die in het nierbekken draineert. Via het nierbekken wordt de geproduceerde urine afgevoerd naar de blaas via de ureter.*

*Uit: Davidson, 2009*

De dichotome vertakking blijft doorgaan en induceert zo de vorming van nieuwe celmassa's. Deze zullen verder differentiëren tot nefronen die zullen aansluiten aan de verzamelbuizen. De eerste gevormde nefronen zijn dichter bij de hilus van de nier gelokaliseerd. Deze nefronen degenereren snel zodat de medulla van de nier ontstaat. De jongste, perifeer gelegen nefronen blijven bestaan en vormen zo de cortexzone van de nier. De niet gepolariseerde mesenchymale cellen die geen dichte celmassa's vormen, migreren richting de bifurcaties van de vertakkingen en

ontwikkelen zich tot interstitieel stroma (Dressler, 2006; Little et al., 2010).

In de cortex bevinden zich de glomeruli en de proximale en distale tubuli contorti. De medulla omvat de proximale en distale rechte tubuli en de lissen van Henle. De verzamelbuizen, waarin de distale tubuli draineren, lopen vanuit de cortex doorheen de volledige medulla, richting het nierbekken (pelvis renalis) (Kriz et al., 1988).

### 1.3 Genetische regulatie van de metanefrogene ontwikkeling

De embryologische ontwikkeling van de nier wordt gereguleerd door een complex genetisch systeem waarin diverse interacties tussen verschillende genen plaatsvinden. De initiële aanleg van de metanefros gebeurt door de ontwikkeling van het ureteraal divertikel en de differentiatie van het metanefrogeen blasteem. Het metanefrogeen blasteem is de trigger voor de vorming van het ureteraal divertikel vanuit de nefrogene streng. Vice versa is de sacrale regio van de nefrogene streng de trigger voor de differentiatie van het metanefrogeen blasteem. De belangrijkste genetische interactie hierbij is de binding van een ligand GDNF, paracrien gesecreteerd vanuit de nefrogene streng, op de RET-receptoren van het mesonefrotisch kanaal. Deze ligand – receptor binding stimuleert de vorming van het ureteraal divertikel richting metanefrogeen blasteem (Dressler 2006; Davidson, 2009).

### 1.3.1 Inductie van het ureteraal divertikel

De expressie van RET in het kanaal van Wolff wordt gereguleerd door een aantal upstream genen (figuur 5). Het is onder andere afhankelijk van de Gata3-expressie, dat op zijn beurt geactiveerd moet worden door de expressie van Pax2 en Pax8. Deze genen komen enkel tot expressie in het caudaal deel van het kanaal van Wolff (Chi et al., 2009). De selectieve expressie van deze genen wordt veroorzaakt door sprouty1 (Spry1). Sprouty1 gedraagt zich in de rest van het mesonefrotisch kanaal als een intracellulaire inhibitor van de RET-expressie en voorkomt zo ectopische vorming van het ureteraal divertikel. Sprouty1 wordt evenwel niet tot expressie gebracht in het sacraal deel van het kanaal van Wolff ter hoogte van de 27<sup>e</sup> – 28<sup>e</sup> somiet, waar de ontwikkeling van de definitieve nier zal plaatsvinden (Davidson, 2009). Ook bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is een negatieve regulator van de uitgroei van het ureteraal divertikel. Heterozygote mutanten van BMP4 vertonen ectopische ureterale divertikels, wat duidt op de inhiberende functie van BMP4. Op de plaats waar het ureteraal divertikel moet doorgroeien, wordt de BMP4-inhibitie geblokkeerd door Gremlin1 (Grem1) zodat daar het ureteraal divertikel wel kan doorgroeien (Miyazaki et al., 2000).

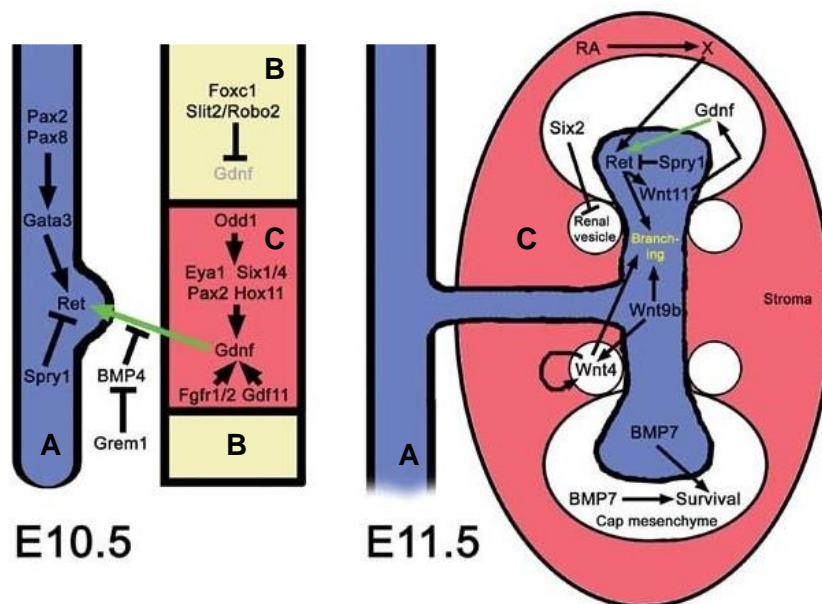
De ontwikkeling van het intermediair mesenchym van de nefrogene streng naar metanefrogeen blasteem vindt eveneens plaats door de expressie van een aantal upstream genen (figuur 5). Hierin speelt onder andere

het Odd-skipped related-1-gen (Odd1) een rol, dat enkel tot expressie komt in de regio van de 27<sup>e</sup> – 28<sup>e</sup> somiet en een cascade van diverse genexpressies

induceert. Odd1 induceert onder andere de genen Eyes-absent-1 (Eya1), Paired-box

transcription-factor-2 (Pax2) en Sine-oculis-1 en -4 (Six1/4). De combinatie van deze upstream genen activeren GDNF, zodat

de hoofdinteractie tussen de paracriene GDNF-ligand en de RET-receptoren in het kanaal van Wolff kan doorgaan. Een andere voorwaardelijke factor voor de GDNF-expressie is de binding van growth /



Figuur 5: schematische voorstelling van de genetische pathways in de metanefrogene ontwikkeling. Linker figuur: inductie van het ureteraal divertikel bij een muizenembryo op dag E10,5. Rechter figuur: vertakking tot een primitief nierbekken bij een muizenembryo op dag 11,5. A: mesonefrotisch kanaal of kanaal van Wolff; B: nefrogene streng; C: metanefrogeen blasteem. Uit: Davidson, 2009

differentiation-factor-11 (Gdf11) op fibroblast-growth-factor-receptoren (FGFR). Hierdoor worden deze fibroblast-growth-factor-receptoren geactiveerd en kan de GDNF-ligand tot expressie komen. De secretie van de GDNF-ligand activeert de RET-receptoren in het mesonefrotisch kanaal en induceert zo de vorming van het ureteraal divertikel (Davidson, 2009). Talrijke genen (waar hierin niet dieper op wordt ingegaan) inhiberen de secretie van GDNF buiten het metanefrogeen blasteem. Zo komt enkel in het metanefrogeen blasteem GDNF tot expressie en hierdoor onderscheidt het metanefrogeen blasteem zich van de rest van sacraal gelegen intermediair mesoderm. Het geheel van deze geneninteracties limiteren de RET – GDNF-binding tot deze beperkte regio in het sacraal deel van het embryo, zodat de nierontwikkeling begrensd kan doorgaan (Grieshammer et al., 2004).

### 1.3.2 Vertakking van het ureteraal divertikel

De binding GDNF / RET zorgt voor een proliferatie van cellen vanuit het mesonefrotisch kanaal richting het metanefrogeen blasteem die het ureteraal divertikel genoemd wordt. Het ureteraal divertikel gaat in het metanefrogeen blasteem dichotoom vertakken waarvan de uiteinden omgeven zijn door een kap van condens mesenchym. De basis waaruit de vertakkingen vertrekken dilateert tot een primitief nierbekken (Davidson, 2009). De dichotome vertakking van het ureteraal divertikel en het ontstaan van de papillaire kanaaltjes gebeurt door de expressie van RET, wnt4, Wnt9b en Wnt11 (Wingless type MMTV integration site family). RET zorgt op zich niet voor zijn eigen expressie, maar is wel noodzakelijk voor de Wnt11-expressie en om de dichotome vertakking te laten doorgaan (zie figuur 5, dag 11,5 van de nefrogene ontwikkeling van een muizenembryo). RET / GDNF-interactie stimuleert ook de expressie van Etv4 en Etv5 (Ets variant 4 en 5), twee genen die stroomafwaarts liggen en noodzakelijk zijn voor de verdere groei en de vertakking van de papillaire kanaaltjes vanuit het nierbekken (Michos et al., 2010).

De expressie van GDNF wordt nu gereguleerd door RET zelf. Dit gebeurt doordat RET zorgt voor de activatie van Wnt11 (Wingless type MMTV integration site family, member 11). Wnt11 gaat op zijn beurt de secretie van de GDNF-ligand stimuleren waardoor de RET / GDNF-combinatie voor de verdere vertakking zorgt. Spry1 is ook hier weer een inhiberende factor van de RET-receptor om zo de vertakkingen te coördineren. Aan de uiteinden van de vertakkingen vormen cellen aggregaten die elk een nierkogel en later een nierblaasje vormen. De Six2-transcriptiefactor inhibeert de vorming van nierblaasjes en verhindert op deze manier de vorming van ectopische nefronen. Six2 komt hierbij niet tot expressie aan de toppen van de vertakkingen, daar waar de nierblaasjes moeten ontstaan, maar wel tussen de vertakkingen. BMP7 (bone morphogenetic protein 7) komt tot expressie in de vertakkingsuiteinden van de papillaire kanaaltjes en in het gecondenseerd metanefrogeen blasteem rond die vertakkingsuiteinden. BMP7 staat daar in voor de overleving van de cellen in het condens nefrogeen blasteem. Zonder de expressie van BMP7 sterft het nefrogeen blasteem af en worden er geen nierblaasjes gevormd (Davidson, 2009).

Wnt9b en Wnt4 (wingless-type MMTV integration site family, member 9B en 4) zijn genen verantwoordelijk voor de vorming van nierkogeltjes uit het gecondenseerd mesenchym rond de vertakkingsuiteinden. Deze genen zorgen ook voor het in stand houden van de vertakking van de papillaire kanaaltjes (Park et al., 2007). Wnt4 induceert onder meer de expressie van Lim1 (LIM homeobox-1, vroeger Lhx1 genoemd), waardoor de pretubulaire aggregaten tot epitheliale vesikels worden omgevormd. Deze vesikeltjes worden nierblaasjes genoemd. Pax2 en Pax8 spelen hier ook een rol in de activatie van Lim1. Pax8 wordt eveneens geactiveerd door Wnt4 en Wnt4 houdt zijn eigen expressie op gang via positieve feedback. Het nierblaasje groeit onder expressie van Lim1 typisch uit tot een komma-vorm en later tot een S-vorm door de vorming van spleten in het nierblaasje. Er is nog weinig geweten over de mechanismen die een rol spelen in de differentiatie van nefronen. Bridgewater et al. (2008) vermoedden dat de Wnt-genen de  $\beta$ -cateninepathway stimuleren. Deze wordt ook de planaire-celpolariteit-pathway genoemd. Hierdoor zou er een polariteit van de cellen ontstaan, ondergaan de cellen mesenchym – epitheeltransitie en zou dit de basis kunnen zijn voor de differentiatie van nefronen. Toch veronderstelden Cheng et al. (2007) dat Notch2 instaat voor de polarisatie van de nefronen en de differentiatie van het proximale deel van de nefronen. Notch2 zou enkel in het proximale deel van de nefronen tot expressie komen en hierdoor zorgen voor de differentiatie. De transcriptie van Brn1 / Pou3f3 daarentegen determineert het distale deel van de nefronen die verder fusioneren met de verzamelbuizen.

## 2. NIERCORTEXHYPOPLASIE

### 2.1 Definitie

Niercortexhypoplasie wordt gekarakteriseerd als de aanwezigheid van kleiner aangelegde nieren ten gevolge van een dunnere, onvolledig ontwikkelde cortexlaag. Op histologisch beeld vertonen deze nieren een gereduceerd aantal nefronen, die wel morfologisch normaal zijn aangelegd en functioneel zijn. Nieren met een hypoplastische cortex kunnen al dan niet een wanorganisatie van het corticaal nierweefsel vertonen. Klinisch zullen deze nefronen een hyperfiltratie vertonen om met een ontoereikend aantal nefronen de nierfunctie te voorzien. Hierdoor zullen deze nefronen vroegtijdig degenereren, zal de filtratiecapaciteit van de nier in het gedrang komen en zal er uiteindelijk nierfalen ontstaan. De oorzaak van deze aandoening, die voornamelijk bij kleine huisdieren voorkomt, ligt bij één of meerdere mutaties in genen die een rol spelen in de nierontwikkeling. De overerving van een defect gen ligt dus aan de basis van niercortexhypoplasie (Eccles en Schimmenti, 1999; Weber et al., 2006).

### 2.2 Genetische oorzaken

De genetische ontwikkeling van de nier is een delicate wisselwerking tussen verschillende genen. Het is duidelijk dat als een van die genen defect is, de normale vorming van de nier grondig verstoord wordt en er sprake is van een abnormale morfogenese. Sommige mutaties in die genen verstoren zo de ontwikkeling van de niercortex, met als gevolg een hypoplasie van de nierschors. Tot nu toe is er al een



groot arsenaal aan genen gelinkt geweest aan deze aandoening, de een al wat frequenter voorkomend dan de ander. Enkel de meest voorkomende mutaties worden hier besproken.

Tabel 1: Niet-limiterende lijst van genen die niercortexhypoplasie kunnen veroorzaken en hun mechanisme waarop ze inwerken

Uit: Cain et al., 2010

Gene	Genetic model	Mechanism	Reference(s)
<b>UB</b>			
<i>Egfr</i>	<i>Egfr<sup>neo/neo</sup>, Hoxb7Cre;Egfr<sup>loxP/loxP</sup></i>	Growth and branching, elongation	20
<i>Fgfr2</i>	<i>Hoxb7Cre;Fgfr2<sup>loxP/-</sup></i>	Growth and branching	17
<i>Frs2α</i>	<i>Hoxb7Cre;Frs2α<sup>loxP/loxP</sup></i>	Growth and branching	16
<i>Gli3R</i>	<i>Hoxb7Cre;Ptc1<sup>-loxP</sup>, Hoxb7Cre;Ptc1<sup>-loxP</sup>; Gli3<sup>Δ699/+</sup>, Gli3<sup>-/-</sup></i>	Differentiation	34
<i>Lim1</i>	<i>Hoxb7Cre;Lim1<sup>loxP/loxP</sup></i>	Growth and branching, differentiation	21
<i>Met</i>	<i>Hoxb7Cre;Met<sup>loxP/loxP</sup></i>	Growth and branching	19
<i>p53</i>	<i>p53 MMTV</i>	Differentiation	33
<i>Pax2</i>	<i>Pax2<sup>1Neu/+</sup></i>	Growth and branching, survival	27
<i>Ret</i>	<i>RetY1062F</i>	Growth and branching	12
<i>Hnf1β</i>	<i>vHnf1<sup>-/-</sup></i> (tetraploid)	Growth and branching, induction	31
<i>Wnt11</i>	<i>Wnt11<sup>-/-</sup></i>	Growth and branching	15
<b>MM/stroma</b>			
<i>Bcl2</i>	<i>Bcl2<sup>-/-</sup></i>	Survival	66, 67
<i>C-myc</i>	<i>Bmp7Cre;C-myc<sup>loxP/loxP</sup></i>	Survival, progenitor pool	64
<i>Eya1</i>	<i>Eya1<sup>+/-</sup></i>	UBM	47
<i>Fgf7</i>	<i>Fgf7<sup>-/-</sup></i>	UBM	60
<i>Fgf10</i>	<i>Fgf10<sup>-/-</sup></i>	UBM	62
<i>Gdf</i>	<i>Gdf11<sup>-/-</sup></i>	UBM	45
<i>Gdnf</i>	<i>Gdnf<sup>+/-</sup></i>	UBM	41, 42
<i>Hoxa11/Hoxd11</i>	<i>Hoxa11<sup>-/-</sup>;Hoxd11<sup>-/-</sup></i>	UBM	46
<i>N-myc</i>	<i>N-myc<sup>-/-</sup></i>	Survival	63
<i>Raldh2</i>	<i>Raldh2<sup>-/-</sup></i>	UBM	56
<i>RARαβ2</i>	<i>Rarα<sup>-/-</sup>; Rarβ2<sup>-/-</sup></i>	UBM	55
<i>Sall1</i>	<i>Sall1<sup>-/-</sup></i>	UBM	51
<i>Sall4</i>	<i>Sall4<sup>+/-</sup></i>	UBM	52
<i>Six2</i>	<i>Six2<sup>-/-</sup>, Br<sup>+/-</sup></i>	Progenitor pool	69, 70

## 2.2.1 RET / GDNF en Spry1

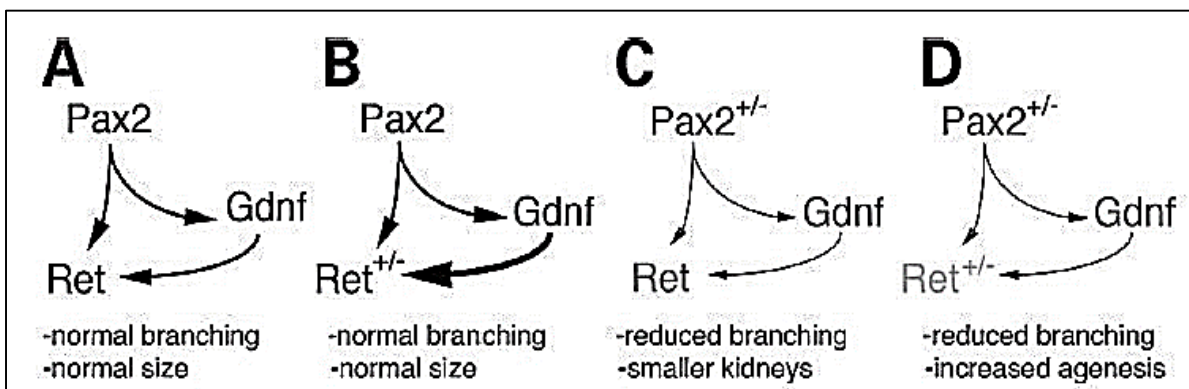
RET (Ret-proto-oncogen) is een tyrosine-kinasereceptor op het mesonefrotisch kanaal die geactiveerd wordt door binding met zijn ligand GDNF (glial cell line – derived neurothrophic factor; zo genoemd omdat dit gen ook een functie heeft in de ontwikkeling van dopaminerge neuronen (in gliacellen)). Dit is de belangrijkste ligand-receptorbinding in de ontwikkeling van de nier. GDNF wordt gesecreteerd door het metanefrogeen blastoom onder invloed van andere genen (Davidson, 2009). Activatie van de tyrosine-kinasereceptor stimuleert celproliferatie en migratie van cellen uit het RET / GDNF-expressiegebied van het mesonefrotisch kanaal en zal het ureteraal divertikel vormen (Kim & Dressler, 2007). RET / GDNF stimuleert ook de expressie van Etv4 en Etv5 (Ets variant 4 en 5), twee genen die stroomafwaarts liggen en noodzakelijk zijn voor de groei en de vertakking van het ureteraal divertikel (Michos et al., 2010). Hiervoor is Pax2 essentieel, omdat Pax2 de transcriptie van zowel GDNF als RET, respectievelijk rechtstreeks en onrechtstreeks via Gata3, activeert (Clarke et al., 2006). Ook later in de ontwikkeling spelen RET en GDNF nog een rol in de vertakking van het ureteraal divertikel en de vorming van nefronen aan de top van deze vertakkingen. De grootte van de uiteindelijke nieren en het aantal nefronen is afhankelijk van de expressie van RET. Doordat de interactie RET / GDNF zo essentieel is voor de nierontwikkeling, volgt daaruit dat homozygote mutanten voor het GDNF-gen of

het RET-gen beide resulteren in renale agenesie door geïnhibeerde groei van het ureteraal divertikel en het ontbreken van de vertakking van het ureteraal divertikel (Cullen-McEwen et al., 2002).

Cullen-McEwen et al. (2002) onderzochten welke eventuele mutaties in het GDNF-gen en het RET-gen een oorzaak konden zijn van renale corticale hypoplasie. Mannelijke  $GDNF^{+/-}$ -muizen werden hiervoor gekruist met vrouwelijke muizen die geen mutatie bezaten voor het GDNF-gen. Hetzelfde gebeurde voor het RET-gen. Ze constateerden dat muizen, waarbij één allel voor GDNF ontbrak, 25% kleinere nieren hadden en dat het aantal nefronen ongeveer met 30% gedaald was. Hieruit konden ze besluiten dat heterozygote GDNF-mutanten niercortexhypoplasie vertoonden. Heterozygote mutanten van het RET-gen veruiterlijkten zich in een normaal fenotype.

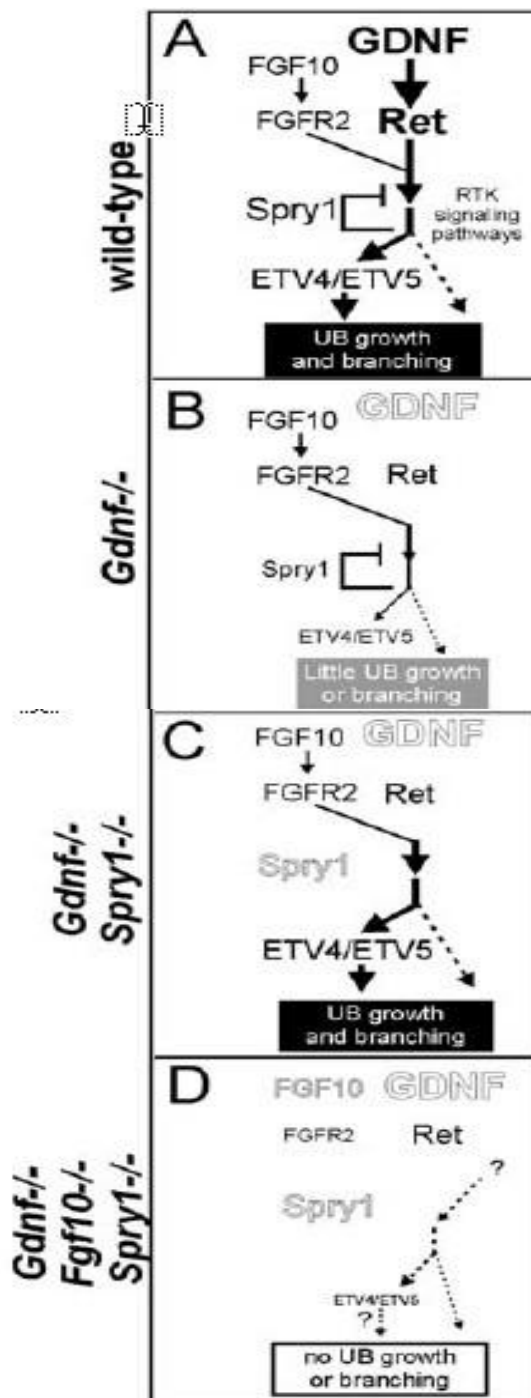
Jijwa et al. (2004) concludeerden eveneens dat 1 mutant allel in het RET-gen geen effect had op de nierontwikkeling. Ze vonden verder dat homozygote mutaties in het RET-gen resulteerden in renale hypoplasie. Tijdens de embryonale ontwikkeling hadden zij bij  $RET^{-/-}$  een reductie van de vertakking van het ureteraal divertikel opgemerkt, waardoor een hypoplasie van de niercortex ontstond. Zhang et al. (2008) kwamen tot de conclusie, in tegenstelling tot Jijwa et al. (2004), dat homozygote RET-knockout muizen renale agenesie vertoonden en een heterozygote RET-mutatie aanleiding gaf tot een daling in het aantal nefronen en dus cortexhypoplasie gaf als resultaat.

Clarke et al. (2006) vonden dat heterozygote RET-knockout muizen geen renale hypoplasie vertoonden. Een reductie van het aantal nefronen met ongeveer 22% werd wel gezien in aanwezigheid van een heterozygote Pax2-mutatie, want Pax2 reguleert de expressie van zowel GDNF als de RET-receptor. Dus enkel een heterozygote Pax2-mutatie – al dan niet in aanwezigheid van een heterozygote RET-mutatie – verstoort de nefrogenese (zie figuur 6). Een heterozygote RET-mutatie veruiterlijkte zich in een normale nierontwikkeling.



Figuur 6: RET- en GDNF-regulatie door het Pax2 gen en hun effect op de nierontwikkeling door mutaties. Figuur A: normale interactie tussen Pax2, RET en GDNF; figuur B: geen interferentie door heterozygote RET-mutatie: normale nefrogenese; figuur C: Hypoplasie van de nieren door heterozygote Pax2 mutatie; figuur D: Combinatie van heterozygote RET- en heterozygote Pax2-mutatie inhibeert de nefrogenese en leidt tot verhoogde kans op agenesie van de nieren. Uit: Clarke et al., 2006

Michos et al. (2010) vonden, in overeenstemming met Cullen-McEwen et al. (2002) dat muizen met een heterozygote GDNF-mutatie aan renale hypoplasie leden (zie figuur 7-B). Bij GDNF<sup>-/-</sup> kreeg 20% zware



hypoplasie en 80% agenesie van de nieren. In hun experimenten vonden Michos et al. (2010) ook dat bij het weghalen van één allel van Spry1, de hypoplasie door een heterozygote RET-mutatie kon voorkomen worden. De wederzijdse interactie tussen de twee gemuteerde genen zorgde er eveneens voor dat de normaal verwachte abnormale vertakking door de Spry1-mutatie werd ingeperkt door de GDNF-mutatie. Homoloog met deze bevindingen, vonden Rozen et al. (2008) al eerder dat een homozygote RET-mutatie, deels gecompenseerd werd door één allel of beide allelen van Spry1 te verwijderen.

Wanneer zowel de GDNF / RET-signalisatie als Spry1 volledig afwezig waren, vond er toch een normale ontwikkeling van de nieren plaats (figuur 7-C). De hypothese hierachter is dat er ook een ander ligand-receptorpathway, eveneens negatief gereguleerd door Spry1, de groei van het ureteraal divertikel kan induceren. In hun onderzoek kwamen ze tot de conclusie dat Fgf10 (fibroblast growth factor 10), dat bindt op de FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) een agonistische werking had ten opzichte van GDNF. Normaal spelen deze genen een kleine rol in de nierontwikkeling, maar bij RET<sup>-/-</sup> of GDNF<sup>-/-</sup> en homozygote mutanten van Spry1 kon deze pathway de groei van het ureteraal divertikel compenseren. Wanneer een homozygote RET- of GDNF-mutatie voorkwam in combinatie met het verlies van één of twee allelen van fgf10, resulteerde dit in renale agenesie (Michos et al., 2010).

Figuur 7: Resultaat van experimentele GDNF, Spry1 en homozygote Fgf10-mutaties: figuur A: normale regulatie van het ureteraal divertikel en de vertakking tot een primitief nierbekken (wild-type). Figuur B: homozygote GDNF-mutaties verhinderen de nefrogenese en kunnen aanleiding geven tot ofwel hypoplasie of agenesie van de nier. Figuur C: het voorkomen van een homozygote GDNF-mutatie in combinatie met een Spry1-mutatie leidt tot een normale nierontwikkeling. Figuur D: Homozygote mutaties van zowel GDNF, FGF10 als Spry1 resulteren in bilaterale agenesie van de nieren. (UB growth = uitgroei ureteraal divertikel / branching = vertakking ureteraal divertikel tot een primitief nierbekken) Uit: Michos et al., 2010.

Homozygote mutanten van FgfR2 gaven aanleiding tot renale hypoplasie door een abnormaal dun en verlengd vertakkingspatroon van het ureteraal divertikel. De vertakkingen waren langer en smaller, het aantal vertakkingen lag lager en er was meer interstitieel weefsel aanwezig, waardoor er ook een lager aantal nefronen gevormd werden. Dit leidde tot een abnormale vorm van de nieren en tot corticale hypoplasie (Cain et al., 2010). Daartegenover staan de bevindingen van Michos et al. (2010), die beweerden dat een verstoorde Fgf10 / FgfR2-signalisatie door homozygote Fgf10-mutanten zorgde voor een gereduceerde vertakking van het ureteraal divertikel, maar een veel milder effect had door het hoge expressielevel van GDNF.

### 2.2.2 Pax-genen

Pax2 is een gen dat behoort tot de paired-box family. Dit gen is één van de eerste genen die tot expressie komt tijdens de ontwikkeling van het metanefros en heeft een functie in alle stadia van de nierontwikkeling. Het is vooral een belangrijk upstream-gen voor de expressie van zowel GDNF als RET te verzekeren (zie ook figuur 5) (Dressler et al., 1990). Het Pax2-gen is dus noodzakelijk voor de uitgroei en de vertakking van het ureteraal divertikel. Later heeft Pax2 een anti-apoptotische werking in de verzamelbuizen, nefronen en het mesenchym van de metanefros (Davidson, 2009). Nadat de tubuli in de nier ontwikkeld zijn, wordt de expressie van het Pax2-gen onderdrukt (Torres et al., 1995). Homozygote mutanten worden gekenmerkt door agenesis van de nieren en sterven snel postnataal, heterozygote mutanten van Pax2 kunnen overleven met hypoplastische nierschorsen (Sanna-Cherchi et al., 2007).

Het allelisch expressiepatroon van Pax2-mutanten bij muizen werd geanalyseerd om de eventuele verschillen te diagnosticeren tussen normaal genotype en het genotype bij muizen met niercortexhypoplasie. De muizen die leden aan niercortexhypoplasie, hadden een puntmutatie in het Pax2-gen, waardoor de expressie van het gen gehalveerd werd. De abnormaliteiten in de nier bij Pax2-mutanten zouden dus te wijten zijn aan gedaalde genexpressie (Dressler et al., 1990). Er werd geredeneerd dat mono-allelische expressie van Pax2 (zoals het geval is bij een heterozygote Pax2-mutatie) zou leiden tot gedeeltelijke nefrogenese aangezien bij sommige cellen hierbij Pax2 wel tot expressie zou komen (wild-type allel) en bij sommige cellen totaal geen Pax2-expressie zou plaatsvinden (allel met de Pax2-mutatie). Deze redenering werd bevestigd doordat ze konden aantonen dat quasi elke cel in het ureteraal divertikel van een normale nier Pax2 tot expressie bracht (Porteous et al., 2000). Daartegenover beweren Nutt et al. (1999) dat heterozygote Pax2-genexpressie gerelateerd zou kunnen zijn aan de semi-dominante gevolgen van Pax2-mutaties en dat het semi-dominante mutatiegen dus de reden is voor hypoplasie van de nieren.

De tegenstelling kan verklaard worden doordat Pax2 eventueel mono-allelisch tot expressie kan komen in de vroege stadia van de ontwikkeling (voor dag 15 in de embryonale ontwikkeling van de proefmuizen), want dit is niet onderzocht in de studie van Porteous et al. (2000). Ook geven ze toe dat

mono-allelische expressie van Pax2 eventueel zou voorkomen in stamcellen die niet bestudeerd konden worden via immunohistochemie op dag E15. Dit is iets wat nog onderzocht zou kunnen worden.

Diverse auteurs hadden al aangetoond dat een mutatie in het Pax2-gen hypoplasie van de niercortex kan veroorzaken (Porteous et al., 1999; Lozanoff et al., 2001; Martinovic-Bouriel et al., 2010). Over het mechanisme van de hypoplasieontwikkeling waren er nogal wat contradicties. Zo suggereerden Torres et al. (1995) dat de heterozygote Pax2-mutanten renale hypoplasie ontwikkelden door een gedaalde epitheliale epithelisatie en/of een gedaalde celproliferatie. Porteous et al. (2000) steunden in hun studie op de hypothese dat de mutatie eerder een effect had op het overleven van de cellen dan op een gestegen proliferatie. Er zou een verhoogde celdood zijn door een gestegen expressie van het tumorsuppressoreiwit p53. Deze bewering werd ondersteund door de bevindingen van Stuart et al. (1995). Zij vonden, onafhankelijk van de aandoening, dat Pax2, Pax5 en Pax8 de transcriptie van p53 inhiberen en dus de apoptosepathway zouden blokkeren. Daaruit zou men kunnen afleiden dat Pax-mutaties voor een verhoogde celdood zouden zorgen.

Aangezien Pax2, Pax5 en Pax8 alle drie via hetzelfde mechanisme zouden werken (de inhibitie van p53), stelden Porteous et al. (1999) vast dat Pax8 eventuele mutaties in het Pax2-gen kon compenseren. Door de belangrijke co-expressie tussen Pax2 en Pax8 konden bij heterozygote Pax2-mutanten de nierblaasjes toch uitgroeien en werden deze cellen gered van de apoptose. Deze co-expressie werd vooral gezien in de structuren die ontstaan vanuit het metanefrogeen blastoom en ontbrak in het ureteraal divertikel. Er werd dus een blijvend verhoogde apoptose vastgesteld in het ureteraal divertikel en de verzamelbuizen. In deze laatste twee werd de apoptose niet gecompenseerd. Hierdoor werd er nog altijd een niercortexhypoplasie vastgesteld bij heterozygote Pax2-mutanten, maar door de grote rol van Pax2 zou zonder de compensatie van Pax8 renale agenesie ontstaan. Dankzij de evenredige functie van Pax2 en Pax8 kan de nier toch nog uitgroeien tot een suboptimale functionele nier (Dressler et al., 1990; Porteous et al., 1999).

### 2.2.3 Wnt-genen

Er zijn verschillende types binnen de familie van de Wingless MMTV integration site family. Een van deze genen is Wnt11. Deze wordt geactiveerd door RET en staat in voor de verdere activatie van GDNF. Hierdoor wordt de GDNF / RET-binding in stand gehouden en is de verdere vertakking van de papillaire kanaaltjes verzekerd (zie ook figuur 5) (Davidson, 2009). Ook andere Wnt-genen hebben een functie in de nefrogenese. Ze staan onder andere in voor de expressie van  $\beta$ -catenine. Deze  $\beta$ -cateninepathway zorgt voor diverse veranderingen in de genexpressie in de cel die de polariteit, proliferatie en het overleven van de cellen beïnvloeden (Vivante, 2013). Wnt4 en Wnt9b onderhouden de RET / GDNF-expressie tijdens de vertakkingsfase en induceren de vorming van nefronen uit het gecondenseerd mesenchym rond de vertakkingsuiteinden. Ze spelen hierin een essentiële rol in de inductie van mesenchymale progenitorcellen om epithelisatie te ondergaan en zich om te vormen tot pretubulaire aggregaten. Hierdoor ontstaan de nierkogeltjes. Samen met Pax2 en Pax8 activeert Wnt4 het Lim1-

gen. Lim1 is verantwoordelijk voor de vorming van een lumen in de nierkogeltjes, waardoor ze differentiëren naar nierblaasjes (Park et al., 2007).

Er werd vastgesteld in muismodellen dat een suboptimale Wnt4-expressie resulteerde in niercortexhypoplasie (heterozygote mutanten). Wnt4-defecten zijn dan ook de belangrijkste oorzaak van niercortexhypoplasie van de nier onder de Wnt-genen. In bepaalde families werd de overerving van een Wnt4-mutatie opgemerkt, maar onder de nakomelingen met de Wnt4 mutatie leed niet elk individu aan renale hypoplasie. Er werd verondersteld dat de graad van hypoplasie afhankelijk was van variabele expressie van het Wnt4-gen (Park et al., 2007). Een andere hypothese was de incomplete penetrantie van de overerving (Vivante, 2013). Schmidt-Ott en Barasch (2008) kwamen tot de conclusie dat Wnt4 op zichzelf de Wnt /  $\beta$ -catenine-signalisatie, nodig voor de verdere nierontwikkeling, niet kan triggeren. Er zouden dus andere genen noodzakelijk zijn om de calciumpathway op gang te zetten en deze genen zouden meespelen in het al dan niet tot uiting komen van niercortexhypoplasie.

Schmidt-Ott en Barasch (2008) concludeerden dat heterozygote Wnt4-mutanties een inhiberende werking hadden op Wnt3A en daardoor een extreme inhibitie vertoonden op de  $\beta$ -cateninepathway. Inhibitie van Wnt3A heeft namelijk een remmende invloed op de calciumpathway, maar aangezien Wnt3A geen fysiologische participant is in de nefrogenese, zou dit normaal geen effect kunnen hebben op de nierontwikkeling (Schmidt-Ott en Barasch, 2008). Toch is deze essentiële pathway gereduceerd en een belangrijke oorzaak van renale cortexhypoplasie. Vivante et al. (2013) maakten de veronderstelling dat de inhibitie van Wnt3A door een Wnt4-mutatie en daardoor de blokkering van de  $\beta$ -cateninepathway het resultaat is van competitieve inhibitie van de receptoren voor deze pathway-activatie. Deze hypothese deden ze op basis van analoge resultaten voor het Wnt5A-gen, waarbij Wnt5A-mutaties de receptoren voor de  $\beta$ -cateninepathway konden inhiberen, zodat Wnt3A deze niet meer kon activeren.

In een onderzoek van Shaw et al. (2002) werd er eveneens vastgesteld dat Wnt3A de Wnt /  $\beta$ -cateninepathway niet kon activeren. Daarbij werd er toch een basale activiteit van deze pathway opgemerkt, onafhankelijk van de overexpressie van het niet-gemuteerd gen. Dit gezond Wnt4-gen kon desalniettemin de  $\beta$ -cateninepathway triggeren, waar de mutante versiede calciumpathway net inhibeerde.

Ook andere Wnt-genmutaties werden gelinkt aan niercortexhypoplasie. Zo werd bij een dubbele mutatie van het Wnt11-gen (Wnt11<sup>-/-</sup>) een gebrekkige vertakking van het ureteraal divertikel gezien en een dalende expressie van GDNF is het metanefrogeen blasteem. Wnt11 staat dan ook in voor de continue expressie van GDNF en RET in de toppen van de vertakkingen als een soort autoregulatie-feedback. Eveneens voor Wnt11<sup>+/-</sup>-mutaties in combinatie met heterozygote RET-mutaties werd er erge hypoplasie van de nierschors gezien door een gebrekkige vertakking (Cain et al., 2010). In een studie van Cain et al. (2009) merkten ze dat een bepaald expressieniveau van de GLI3-repressor de expressie van de homozygote RET en Wnt11 kon redden en alsnog een normaal niervolume en aantal nefronen

kon verwezenlijken. Het uitblijven van de expressie van deze GLI3-repressor boven een bepaalde drempelwaarde resulteerde in het uitblijven van deze compensatie en gaf dus niercortexhypoplasie.

#### 2.2.4 Six-genen

Six-1 en -4 (Sine-oculis-genen) spelen een belangrijke rol in de activatie van GDNF in het mesenchym van de nefrogene streng (upstream genen). Zo kan de belangrijkste interactie RET / GDNF doorgaan en kan het intermediair mesenchym in de expressieregio omvormen tot het metanefrogeen blastoom. Six2 heeft iets later in de ontwikkeling van de nier een inhiberende werking op het proces van de nierkogeltjes (downstream). Deze remming is noodzakelijk om ectopische nefronen te voorkomen (Davidson, 2009).

Bij heterozygote Six2-mutanten werd er niercortexhypoplasie beschreven, waarbij de nieren waren kleiner dan bij non-mutanten. Histologisch was het tubulusepitheel gezwollen, waren de lumina van de tubuli verbreed en de densiteit en het aantal glomeruli waren gedaald. Het volume van de aanwezige glomeruli was enorm gestegen (Fogelgren et al., 2009). Wong et al. (2010) veronderstelden dat de activiteit van Six2 noodzakelijk is om de proliferatiezone van de mesenchymale, ongedifferentieerde cellen te onderhouden. Dat een gedaalde expressie van een inhibitor de nefrogenese kan onderdrukken, is omwille van het feit dat het ontwikkelingsproces net te snel doorgaat. Hierdoor gaat de stamcelpopulatie verloren, met als gevolg een belemmering van de nierontwikkeling (Fogelgren et al., 2009). De hypothese van Self et al. (2006) was dat heterozygote Six2-mutaties niet echt interfereerden met de initiële groei en differentiatie van de glomeruli, maar hebben wel een effect hadden op de ruimtelijke distributie van de verschillende glomeruli. Ten opzichte van normale nieren, waar de glomeruli relatief dicht georganiseerd waren, waren bij de Six2-mutanten de cortices kleiner, met ook een relatief kleiner aantal glomeruli per volume-eenheid. Dit duidde dus op relatief meer tussenliggend stroma. Of Six2 nu effectief een rol speelt in de ruimtelijke ordening van de glomeruli, is nog niet bewezen.

Eveneens voor heterozygote Six1-mutaties werd er een link met niercortexhypoplasie beschreven. Door de mutatie in het Six1-gen is de vorming van Eya1 – Six1 – DNA complexen verstoord. Deze complexen zijn nodig om GDNF voldoende tot expressie te doen brengen in het kanaal van Wolff. Homozygote mutaties van Six1 uitten zich vooral in renale agenesie en slechts bij 2,5% van de gevallen werd er cortexhypoplasie van de nier gezien. Deze aandoening wordt vaak als een syndroom gezien, bekend als het 'branchio-oto-renal syndrome'. Hierbij kunnen eveneens branchiale cysten en doofheid voorkomen (Ruf et al., 2004).

#### 2.2.5 BMP-genen

Van de bone morphogenetic proteins (BMP) zijn vooral BMP4 en BMP7 belangrijk voor de nefrogenese. BMP4 is een sterke inhibitor van de GDNF / RET-binding. Hierdoor wordt de uitgroei van ectopische

ureterale divertikels verhinderd. Op de plaats waar het ureteraal divertikel wel moet uitgroeien, wordt BMP4 geblokkeerd door Gremlin1 (Grem1) (Miyazaki et al., 2000). BMP7 heeft pas later in de ontwikkeling zijn functie (downstream), namelijk bij het vertakken van de papillaire kanaaltjes. Tijdens deze fase van de ontwikkeling komt BMP7 tot expressie in de vertakkingsuiteinden van de papillaire kanaaltjes en in het gecondenseerd metanefrogeen blasteem rond deze vertakkingsuiteinden. Dankzij BMP7 overleven de cellen van het gecondenseerd metanefrogeen blasteem en wordt apoptose van deze cellen verhinderd (Davidson, 2009).

Door het kruisen van honden met het normale BMP4-gen met heterozygote BMP4-mutante honden, kon men de morfologische nierafwijkingen bij de puppy's bestuderen. BMP4<sup>+/-</sup>-mutanten vertoonden verschillende soorten abnormaliteiten. Naast niercortexhypoplasie, werden er ook nakomelingen met dysplasie, hydronefrose of dubbele nieraanleg met een gevorkte ureter gediagnosticeerd. Een gestoorde functie van BMP4 kan wel de misvormingen ter hoogte van ureter en nierbekken verklaren. Desalniettemin zijn er ook afwijkingen ter hoogte van de cortex gevonden. Met deze bevindingen vonden Miyazaki et al. (2000) het plausibel dat BMP4 ook de ontwikkeling van het metanefrogeen blasteem reguleert. De bewijzen hiervoor kwamen van Hatini et al. (1996) en Mendelsohn et al. (1999). Zij vonden dat de heterozygote BMP4-mutaties gecorreleerd waren met de inactiviteit van een ander gen. Volgens Hatini et al. (1996) was dit het winged-helix transcription factor BF2. Mendelsohn et al. (1999) linkten de abnormaliteit aan de inactiviteit van de retinoic acid receptor (RAR). Deze zijn beide essentieel voor het compartimenteren van het stroma, wat noodzakelijk is voor het vertakken en dus de verdere nefrogenese. Met deze resultaten kon het optreden van niercortexhypoplasie toch geassocieerd worden met BMP4-mutaties. Dudley et al. (1999) suggereerden, aangezien BMP4 en BMP7 tot dezelfde genengroep behoren (de bone morphogenetic proteins), dat BMP4 ook in staat zou zijn om de proliferatie te stimuleren en / of apoptose van het metanefrogeen blasteem te verhinderen. Een alleenstaande mutatie in het BMP4-gen zou dus ook de oorzaak kunnen zijn van de hypoplastische niercortex.

In diezelfde studie beschreven Dudley et al. (1999) ook hoe homozygote BMP7-mutanten resulteerden in een lager aantal nefronen en hierdoor een dunnere niercortex. De tubuli konden wel doorgroeien. Er werd verondersteld dat BMP7 wel verantwoordelijk is voor het overleven van het metanefrogeen blasteem, maar geen effect heeft op het al dan niet doorgaan van de tubulogenese. Dit is in tegenstrijdigheid met de conclusies van Vukicevic et al. (1996). Zij voegden BMP7 toe aan een mesenchymcultuur en zagen dat de transcriptiefactor Pax2 tot expressie kwam, wat een merker is voor inductie van het mesenchym en dus bewijs is dat BMP7 wel noodzakelijk is voor activatie van het metanefrogeen blasteem. Dudley et al. (1999) probeerden dit experiment te reconstrueren, maar konden activatie van het metanefrogeen blasteem door toevoeging van BMP7 niet verwezenlijken.



## 2.2.6 Overige genen

Naast bovenstaande besproken genen, zijn er nog talrijke andere genen die evenwel voor het ontstaan van niercortexhypoplasie kunnen zorgen. Gdf11, die bindt op de receptoren van de fibroblast growth factor om de expressie van GDNF te stimuleren (upstream), is een noodzakelijk gen in de nefrogenese. Het totaal ontbreken van Gdf11 zorgt voor verlies van GDNF-expressie, waardoor de vertakking van het ureteraal divertikel niet doorgaat en dit resulteert in kleinere nieren. Ook uit dubbele mutaties aan de receptoren (FGFR) volgt deze aandoening ondanks dat bij homozygote FGFR-mutaties de vertakking van de papillaire kanaaltjes net verlengd wordt, waardoor de niercortexhypoplasie gecombineerd is met een grillige niervorm (Cain et al., 2010). Om het gehele complex van geneninteractie te reguleren worden er Eya1 – Six – Pax-complexen gevormd. Mutaties in Six en Pax werden hogerop al besproken, maar evenzo geven heterozygote mutaties in Eya1 renale corticale hypoplasie (Ruf et al., 2004). Daarnaast is er nog een hele lijst vol minor genes die een rol spelen in de nephrogenesis, maar toch een oorzaak kunnen zijn van een onderontwikkeld, te dunne schors van de nier. Daarenboven zijn er nog veel onbekende genen, zowel in de nierontwikkeling als voor de oorzaak van niercortexhypoplasie (Weber et al., 2006; Sanna-Cherchi et al., 2007; Cain et al., 2010)

## 2.3 Omgevingsfactoren

Naast genetische mutaties kunnen omgevingsfactoren eveneens tijdens de embryogenese en foetale fase in utero een rol spelen in de ontwikkeling van de nieren. Een suboptimale omgeving in de baarmoeder kan tijdens het metanefrosstadium aanleiding geven tot een gereduceerd aantal nefronen. Een van de redenen voor een suboptimale omgeving in utero was volgens Hoppe et al. (2007) een eiwitdeficiënt dieet. Wanneer de moeders een laag proteïnegehalte gevoederd kregen tijdens de dracht, vertoonden de mannelijke nakomelingen 10 tot 30% minder nefronen vergeleken met hun leeftijdsgenoten van goed gevoederde moeders. Ze vermoedden al een geslachtsverschil, niettegenstaande dat de ontwikkeling van de nier of andere organen onafhankelijk is van het geslacht. Toch konden ze toch een lager niervolume vaststellen bij mannelijke muizen. McMullen en Langley-Evans kwamen in 2005 tot de conclusie dat ook de vrouwelijke nakomelingen een nefrondeficiet vertoonden. Daarentegen besloten Woods et al. (2005) dat de vrouwtjes resistent waren aan de lage eiwitconcentratie in utero. Zij vertoonden postnataal geen daling van het aantal nefronen. Hoppe et al. (2007) suggereerden dat de contradictie te maken had met het gebruik van de maceratiemethode in de studie van McMullen en Langley-Evans (2005).

Cain et al. (2010) bewezen in hun studie dat een vitamine-A-deficiëntie bij de moeder zorgt voor verstoorde retinolsignalisatie bij de foeti. Retinol (retinoïnezuur) is de actieve metaboliet van het vetoplosbaar vitamine-A. Deze deficiëntie leidde tot een verminderde RET-expressie, met als gevolg een lager aantal glomeruli in de niercortex van de foeti. Vitamine-A blijkt dus een kritische rol te spelen in de blijvende expressie van RET. Ook bleek bepaalde medicatie zoals dexamethasone en thalidomide

een risicofactor te zijn voor niercortexhypoplasie. Maternale diabetes tijdens de dracht of hyperglycemie werd ook al gelinkt met een significante daling in het aantal nefronen.

## DISCUSSIE

Hoewel de morfologische aspecten en de genetische regulatie van de nierontwikkeling al sinds ruime tijd aan bod komen in wetenschappelijke studies, is zeker nog niet alles volledig opgehelderd. Er zijn nog vele onbekende genen en onontdekte functies en interacties die nodig zijn om de nefrogenese volledig te kunnen reconstrueren en verklaren. Om de resterende zwarte gaten op te vullen, zijn er al vele hypothesen opgesteld door verschillende auteurs, maar tot nu toe is nog geen auteur erin geslaagd een van die hypothesen te bewijzen.

Niercortexhypoplasie een redelijk recent onderwerp in de wetenschap. Hierdoor heeft men eerst de focus proberen te leggen op de genen die een hoofdrol spelen in de genetische regulatie. De allereerste knock-out-experimenten hierbij kwamen al direct met vele verschillende, maar ook tegenstrijdige resultaten naar buiten. Een reden voor deze tegenstrijdigheden is misschien dat er nog geen standaard onderzoeksmethode is vastgelegd of ontwikkeld is om de variaties en contradicties in mutatie-experimenten te vermijden. Bovendien komen sommige genen maar kortstondig tot expressie tijdens de nieraanleg, waardoor ze op sommige momenten niet terug te vinden zijn met technieken zoals immunohistochemie. Er is dus een nauwkeurige kennis vereist van welke genen op welk moment van de nefrogenese tot expressie komen. Daarenboven is niet elke mutatie schadelijk voor de nierontwikkeling. Bij dosisgebonden expressie van een bepaald gen zijn twee correcte allelen nodig om voor voldoende genexpressie te zorgen. Bij genen waar enkel de aanwezigheid van genexpressie voldoende is, ondervinden de cellen geen nadeel aan heterozygote expressie in vergelijking met normale expressie zonder mutaties. Een andere invalshoek is dat niet elk gen een rol speelt die groot genoeg is om met een mutatie de nefrogenese te verstoren. Mutaties in minor genes hebben over het algemeen een kleinere impact dan mutaties in major genes.

Het ogenblik van expressie in de nierontwikkeling is eveneens een participerende factor. Genen die vroeg in de nefrogenese een rol spelen – in het bijzondere de genen upstream van RET en GDNF – zullen bij mutatie de uitgroei van het ureteraal divertikel verstoren. Hierdoor hebben ze een grote impact op de verdere nierontwikkeling en zal er eerder agenesie van de nieren ontstaan. Genen downstream van deze belangrijke RET – GDNF-interactie hebben een kleiner effect op de nefrogenese. Bij een mutatie in deze downstreamgenen zal er eerder niercortexhypoplasie ontstaan, omdat de uitgroei van het ureteraal divertikel wel kan doorgaan en enkel de vertakking van het ureteraal divertikel verstoord is.

De interacties tussen de verschillende genen blijken niet alleen belangrijk te zijn voor een correcte nierontwikkeling, maar ook spelen ze een rol in het al dan niet tot uiting komen van mutaties. Zo kan een mutatie in één gen onschuldig blijven, tot het in combinatie voorkomt met een andere mutatie en

plots voor zware ontwikkelingsstoornissen van de nier zorgt. Omgekeerd kan een mutatie in een inhibitor een mutatie in een inducerend gen opheffen, waardoor de nefrogenese wel correct verloopt. Dit maakt het wetenschappelijk onderzoek naar genetische oorzaken van renale corticale hypoplasie extra complex en verduidelijkt de noodzaak van voldoende inzicht in deze genetische regulatie en interactie.

Naast de vele genetische factoren valt het eveneens op dat in utero omgevingsfactoren de nieraanleg kunnen verstoren. Hiermee wordt aangetoond dat niet alleen een genoom zonder mutaties, maar ook optimale levensomstandigheden voor de moeder noodzakelijk zijn om een goed functionele nierontwikkeling te krijgen. Deze omgevingsfactoren zijn echter niet altijd even gemakkelijk te bepalen of te meten, wat verder onderzoek naar extra-chromosale oorzaken van niercortexhypoplasie bemoeilijkt.

Welke mutaties / abnormaliteiten tijdens de embryonale ontwikkeling nog allemaal aanleiding kunnen geven tot niercortexhypoplasie is enorm variërend en daarvoor is er nog veel onderzoek vereist. Daardoor liggen er nog vele pistes open om de volledige regulatie van de nefrogenese met alle mogelijke abnormaliteiten uit te diepen. Een groot knelpunt blijkt het gebrek aan een gestandaardiseerde methode voor het meten van de hoedanigheid van niercortexhypoplasie. Het bepalen van genmutaties is al gevestigd in uniforme tests zoals de PCR en reverse transcriptase PCR. Het bepalen van niervolume, glomerulair volume en aantal nefronen om een graad van niercortexhypoplasie te bepalen, is nog onderhevig aan veel variatie. Deze variatie kan verklaard worden doordat het fixeren van de niercoupes nog niet gestandaardiseerd is en verschillende tests, zoals immunohistochemie, microscopische analyse, histologie en het gebruik van diverse formules, aanleiding kunnen geven voor uiteenlopende resultaten. Een goede definiëring van de aandoening is eveneens van belang om standaardisatie in de hand te werken.

Het wetenschappelijk onderzoek naar renale cortexhypoplasie kan heel belangrijk zijn in het oogpunt van fokprogramma's. Als genmutaties met een link naar niercortexhypoplasie opgespoord kunnen worden in bepaalde familielijnen, kan men hiermee rekening houden bij bepaalde fokprogramma's. In het bijzonder voor homozygote mutaties kan het diagnosticeren van heterozygote dragers praktisch gebruikt worden om corticale hypoplasie van de nier bij de nakomelingen te vermijden. Hierdoor kan de zware klinische impact van nierfalen misschien wel voor een stuk vermeden worden. De moeilijkheid in het opsporen van dragers voor één van deze genmutaties ligt in de vele geneninteracties en complexiteit van alle genen. Bij een individu met een heterozygote RET-mutatie bijvoorbeeld, zullen de nieren zich normaal ontwikkelen in aanwezigheid van een gezond Pax2-gen. Indien Pax2 ook een heterozygote mutatie bevat, zal er toch niercortexhypoplasie ontstaan. Hieruit blijkt dat één genetische test dus niet voldoende is om een individu al dan niet als drager te bestempelen.

## **CONCLUSIE**

De grote complexiteit en het moeilijk onderscheid tussen dragers en gezonde dieren zijn de reden dat de praktische aanpak van de preventie nog in de kinderschoenen staat. Er zijn allereerst nog veel onderzoeksmogelijkheden om de volledige nierontwikkeling volledig uit te diepen. Daarnaast liggen er nog veel pistes open om alle mogelijk oorzaken van niercortexhypoplasie te ontrafelen, wat gecompliceerd wordt door de vele geneninteracties. Daarenboven kan er nog gezocht worden naar een genentest om dragers van niercortexhypoplasie op te sporen met oog op fokprogramma's. De moeilijkheid hierin ligt bij de voorwaardelijke uiting van niercortexhypoplasie. Hierdoor zou de test rekening moeten kunnen houden met de verschillende genen en hun interactie op elkaar. Hierbij kan er tot besluit gekomen worden dat er nog veel onderzoek nodig is vooraleer efficiënte preventie van niercortexhypoplasie kan toegepast worden in fokprogramma's.

## REFERENTIELIJST

1. Bridgewater, D., Cox, B., Cain, J., Lau, A., Athaide, V., Gill, P. S. & Rosenblum, N. D. (2008). Canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling is required for ureteric branching. *Developmental biology*, 317, 83-94.
2. Cain, J. E., Islam, E., Haxho, F., Chen, L., Bridgewater, D., Nieuwenhuis, E. & Rosenblum, N. D. (2009). GLI3 repressor controls nephron number via regulation of Wnt11 and Ret in ureteric tip cells. *PLoS One*, 4, 7313.
3. Cain, J. E., Di Giovanni, V., Smeeton, J. & Rosenblum, N. D. (2010). Genetics of renal hypoplasia: insights into the mechanisms controlling nephron endowment. *Pediatric research*, 68, 91-98.
4. Cheng, H. T., Kim, M., Valerius, M. T., Surendran, K., Schuster-Gossler, K., Gossler, A. & Kopan, R. (2007). Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development*, 134, 801-811.
5. Chi, X., Michos, O., Shakya, R., Riccio, P., Enomoto, H., Licht, J. D. & Costantini, F. (2009). Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis. *Developmental cell*, 17, 199-209.
6. Christ, B. & Ordahl, C. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anatomy and embryology*, 191, 381-396.
7. Clarke, J. C., Patel, S. R., Raymond, R. M., Andrew, S., Robinson, B. G., Dressler, G. R. & Brophy, P. D. (2006). Regulation of c-Ret in the developing kidney is responsive to Pax2 gene dosage. *Human molecular genetics*, 15, 3420-3428.
8. Cullen-McEwen, L. A., Kett, M. M., Dowling, J., Anderson, W. P. & Bertram, J. F. (2003). Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice. *Hypertension*, 41, 335-340.
9. Davidson, A.J., Mouse kidney development (2009), *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, doi/10.3824/stembook.1.34.1, <http://www.stembook.org>.
10. Davies, J. (1951). Nephric development in the sheep with reference to the problem of the ruminant pronephros. *Journal of anatomy*, 85, 1-6.
11. Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O. & Gruss, P. (1990). Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development*, 109, 787-795.
12. Dressler, G. R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annual Reviews Cellular Developmental Biology*, 22, 509-529.
13. Dudley, A. T., Godin, R. E. & Robertson, E. J. (1999). Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes & development*, 13, 1601-1613.
14. Eccles, M. R. & Schimmenti, L. A. (1999). Renal-coloboma syndrome: a multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations. *Clinical genetics*, 56, 1-9.

15. Fletcher, T. F. & Weber, A. F. (2013). *Veterinary Developmental Anatomy (Veterinary Embryology)*.
16. Fogelgren, B., Yang, S., Sharp, I. C., Huckstep, O. J., Ma, W., Somponpun, S. J. & Lozanoff, S. (2009). Deficiency in Six2 during prenatal development is associated with reduced nephron number, chronic renal failure, and hypertension in Br/+ adult mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296, 1166-1178.
17. Fraser, E. A. (1950). The development of the vertebrate excretory system. *Biological Reviews*, 25, 159-187.
18. Grieshammer, U., Ma, L., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M. & Martin, G. R. (2004). SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Developmental cell*, 6, 709-717.
19. Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C. & Lai, E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes & development*, 10, 1467-1478.
20. Hoppe, C. C., Evans, R. G., Bertram, J. F. & Moritz, K. M. (2007). Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292, 1768-1774.
21. Jijiwa, M., Fukuda, T., Kawai, K., Nakamura, A., Kurokawa, K., Murakumo, Y. & Takahashi, M. (2004). A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia. *Molecular and cellular biology*, 24, 8026-8036.
22. Kim, D. & Dressler, G. R. (2007). PTEN modulates GDNF/RET mediated chemotaxis and branching morphogenesis in the developing kidney. *Developmental biology*, 307, 290-299.
23. Kriz, W., Bankir, L., Bulger, R. E., Burg, M. B., Goncharevskaya, O. A., Imai, M. & Wright, F. S. (1988). A standard nomenclature for structures of the kidney. *Comprehensive Physiology*.
24. Kuure, S., Vuolteenaho, R. & Vainio, S. (2000). Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mechanisms of development*, 92, 31-45.
25. Little, M., Georgas, K., Pennisi, D. & Wilkinson, L. (2010). Chapter Five-Kidney Development: Two Tales of Tubulogenesis. *Current topics in developmental biology*, 90, 193-229.
26. Lozanoff, S., Johnston, J., Ma, W. & Jourdan-Le Saux, C. (2001). Immunohistochemical localization of Pax2 and associated proteins in the developing kidney of mice with renal hypoplasia. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49, 1081-1097.
27. Martinovic-Bouriel, J., Benachi, A., Bonnière, M., Brahimi, N., Esculpavit, C., Morichon, N. & Gubler, M. C. (2010). PAX2 mutations in fetal renal hypodysplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152, 830-835.
28. McMullen, S. & Langley-Evans, S. C. (2005). Sex-specific effects of prenatal low-protein and carbenoxolone exposure on renal angiotensin receptor expression in rats. *Hypertension*, 46, 1374-1380.
29. Mendelsohn, C., Batourina, E., Fung, S., Gilbert, T. & Dodd, J. (1999). Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development*, 126, 1139-1148.

30. Michos O., Cebrian C., Hyink D., Grieshammer U., Williams L., D'Agati, V. & Costantini, F. (2010) Kidney Development in the Absence of Gdnf and Spry1 Requires Fgf10. *PLoS Genetics*, 6, e1000809. doi: 10.1371/journal.pgen.1000809
31. Miyazaki, Y., Oshima, K., Fogo, A., Hogan, B. L. & Ichikawa, I. (2000). Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 863.
32. Nutt, S. L., Vambrie, S., Steinlein, P., Kozmik, Z., Rolink, A., Weith, A. & Buslinger, M. (1999). Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nature genetics*, 21, 390-395.
33. Park, J. S., Valerius, M. T. & McMahon, A. P. (2007). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development*, 134, 2533-2539.
34. Porteous, S., Torban, E., Cho, N. P., Cunliffe, H., Chua, L., McNoe, L. & Eccles, M. (2000). Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2<sup>Neu+/-</sup> mutant mice. *Human molecular genetics*, 9, 1-11.
35. Rozen, E. J., Schmidt, H., Dolcet, X., Basson, M. A., Jain, S. & Encinas, M. (2009). Loss of Sprout1 rescues renal agenesis caused by Ret mutation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20, 255-259.
36. Ruf, R. G., Xu, P. X., Silviu, D., Otto, E. A., Beekmann, F., Muerb, U. T. & Brophy, P. D. (2004). SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 8090-8095.
37. Sanna-Cherchi, S., Caridi, G., Weng, P. L., Scolari, F., Perfumo, F., Gharavi, A. G. & Ghiggeri, G. M. (2007). Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia. *Pediatric nephrology*, 22, 1675-1684.
38. Schmidt-Ott, K. M. & Barasch, J. (2008). WNT/ $\beta$ -catenin signaling in nephron progenitors and their epithelial progeny. *Kidney international*, 74, 1004-1008.
39. Self, M., Lagutin, O. V., Bowling, B., Hendrix, J., Cai, Y., Dressler, G. R. & Oliver, G. (2006). Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *The EMBO Journal*, 25, 5214-5228.
40. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal*, 16, 869-871.
41. Smith, C. & Mackay, S. (1991). Morphological development and fate of the mouse mesonephros. *Journal of anatomy*, 174, 171.
42. Stuart, E. T., Haffner, R., Oren, M. & Gruss, P. (1995). Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *The EMBO Journal*, 14, 5638.
43. Tonegawa, A., Funayama, N., Ueno, N. & Takahashi, Y. (1997). Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development*, 124, 1975-1984.

44. Torres, M., Gómez-Pardo, E., Dressler, G. R. & Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*, 121, 4057-4065.
45. Vivante, A., Mark-Danieli, M., Davidovits, M., Harari-Steinberg, O., Omer, D., Gnatek, Y. & Eisenstein, I. (2013). Renal hypodysplasia associates with a WNT4 variant that causes aberrant canonical WNT signaling. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24, 550-558.
46. Vukicevic, S., Kopp, J. B., Luyten, F. P. & Sampath, T. K. (1996). Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 9021-9026.
47. Weber S., Moriniere V., Knüppel T., Charbit M., Dusek J., Ghiggeri G.M., Jankauskienė A., Mir S., Montini G., Peco-Antic A., Wühl E., Zurowska A.M., Mehls O., Antignac C., Schaefer F. & Salomon R. (2006). Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 2864-2870.
48. Wong, B., Farrell, M. L., Yang, S., Freitas, T. & Lozanoff, S. (2010). Tessellation Analysis of Glomerular Spatial Arrangement in Mice with Heritable Renal Hypoplasia. *The anatomical record*, 293, 280-290.
49. Woods, L. L., Ingelfinger, J. R. & Rasch, R. (2005). Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289, 1131-1136.
50. Zhang, Z., Quinlan, J., Hoy, W., Hughson, M. D., Lemire, M., Hudson, T. & Goodyer, P. (2008). A common RET variant is associated with reduced newborn kidney size and function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19, 2027-2034.