

Genetyka molekularna zespołu nerczycowego

Małgorzata JARONIEC¹

Danuta OSTALSKA-NOWICKA²

Michał NOWICKI¹

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Kierownik: Prof. dr hab. med. Maciej Zabel

²Klinika Kardiologii i Nefrologii
Kierownik: Prof. dr hab. med. Aldona Siwińska
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Słowa kluczowe:

- zespół nerczycowy
- filtracja kłębuszkowa
- podłoże genetyczne
- podocyt
- mutacje

Key words:

- nephritic syndrome
- glomerular filtration
- genetic background
- podocyte
- mutations

Praca finansowana przez
Narodowe Centrum Badań i Rozwoju,
numer umowy NR13 0033 10/2010;
projekt Nefropedia.pl.

Patogeneza zespołu nerczycowego u dzieci związana jest z zaburzeniem funkcjonowania kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Główną rolę w zachowaniu selektywnej filtracji pełnią podocyty zlokalizowane w błonie podstawnej. Uwarunkowany genetycznie zespół nerczycowy został powiązany z licznymi genami, których produkty pełnią molekularną funkcję w podocytach. Zespół nerczycowy ujawniający się w dzieciństwie został powiązany z mutacjami w genach nefryny, podocyny, białka guza Wilmsa oraz fosfolipazy C epsilon. Z kolei w przypadku uwarunkowanego genetycznie zespołu nerczycowego, który ujawnia się w wieku dorosłym, mutacje zidentyfikowano w genach α -aktyliny 4, aktywowanego receptorem kanału wapniowego, białka związanego z CD2 oraz lamininy- β 2. Liczne badania doprowadziły do identyfikacji mutacji o różnych konsekwencjach klinicznych, w tym zmian o potencjalnym zastosowaniu diagnostycznym. Ze względu na złożoność patogenetyczną zespołu nerczycowego, w kolejnych genach ujawniane są nowe mutacje, co wskazuje na istotną rolę czynnika genetycznego. (NEFROL. DIAL. POL. 2012, 16, 24-29)

Molecular genetics of nephrotic syndrome

Nephrotic syndrome results from disturbed functioning of glomerular filtration barrier, which is highly dependant on podocytes. Podocytes are differentiated cells situated in slit diaphragm of glomeruli. Based on abundant research, genetic background of nephritic syndrome was associated with genes that encode proteins crucial for molecular function of podocytes. Childhood-onset nephrotic syndrome was associated with genes encoding: nephrin, podocin, Wilms tumor protein1 and phospholipase C epsilon. However, late-onset nephritic syndrome is associated with mutations in genes encoding α -actinin 4, transient receptor potential cation channel 6, CD2 associated protein and laminin beta 2. Molecular analysis led to identification of numerous mutations with broad spectrum of clinical consequences, including mutations with potential diagnostic use. With the advance of genetic research, new genes are being associated with nephrotic syndrome. It may arise from combined pathogenesis of nephrotic syndrome and supports theory of genetic impact on nephrotic syndrome. (NEPHROL. DIAL. POL. 2012, 16, 24-29)

Zespół nerczycowy (ang. *nephrotic syndrome*, NS) jest najczęstszą przyczyną białkomoczu u dzieci i charakteryzuje się intensywną utratą białka z moczem przekraczającą 50 mg/kg masy ciała/dobę, której następstwem są obrzęki (retencja wody w ustroju), hipalbuminemia, hipercholesterolemia oraz zaburzenia krzepnięcia krwi.

Mimo znacznego postępu w leczeniu zespołu nerczycowego, wciąż nie został poznany mechanizm patogenetyczny. Jeden z najbardziej prawdopodobnych modeli dotyczy podłoża immunologicznego powiązanego z zaburzoną funkcją limfocytów T oraz wpływem interleukin i/lub ich receptorów [14]. Udział podocytów w procesach immunologicznych jest związany z obecnością na ich powierzchni C3bR. Potwierdzeniem tych obserwacji jest pozytywna reakcja pacjentów z białkomoczem na glikokortykosteroidy (GK) [39]. Ponadto, za czynnik prowadzący do zwiększonej filtracji bariery kłębuszka nerkowego uważa się hipotetyczną cytokinę pochodzącą z limfocytów T (tzw.

permeability factor, PF), która uszkadza błonę podstawną i/lub zmienia jej ładunek elektryczny.

Przez wiele lat uważano, że utrata ujemnego ładunku przez błonę podstawną pozbawioną siarczanu heparanu prowadzi do przechodzenia cząsteczek białka do przestrzeni pozanaczyniowej [14].

Według Kriza i wsp., jedną z istotnych przyczyn uszkodzenia podocytów może być zwiększone ciśnienie wewnątrzłośniczkowe i mechaniczne przeciążenie tych komórek oraz odcięcie wypustek stopowych podocytów od błony podstawnej [30].

Oprócz reakcji immunologicznych, na rozwój zespołu nerczycowego mogą wpływać także zmiany na poziomie DNA. Choć zaburzenia kłębuszkowej bariery filtracyjnej były powiązane z patofizjologią zespołu nerczycowego od ponad 40 lat, dopiero ostatnie dziesięciolecie i badania genetyczne pozwoliły na identyfikację nowych genów oraz ich produktów istotnych dla rozwoju NS [58].

Adres do korespondencji:

Małgorzata Jaroniec
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii UMP
Ul. Świecickiego 6, 60-781 Poznań
tel.(61) 854-64-55; fax.(61) 854-64-40
e-mail: malgorzata.jaroniec@gmail.com

Idiopatyczny zespół nerczycowy (ang. *idiopathic nephrotic syndrome*, INS) dotyczy pacjentów, u których nie określono dokładnie przyczyny wystąpienia choroby, natomiast pierwszy rzut wystąpił między 2, a 10 rokiem życia. Zastosowanie glikokortykosteroidów w INS w ok. 90% przynosi remisję kliniczną i biochemiczną. Taki przebieg NS określa się jako steroidowrażliwy NS (ang. *steroid-sensitive nephrotic syndrome*, SSNS) [10], z kolei brak reakcji na GK po 8 tygodniach leczenia wskazuje na steroidooporny NS (ang. *steroid-resistant nephrotic syndrome*, SRNS), który jest wskazaniem do wykonania biopsji nerki oraz zmiany leczenia.

Szacuje się, że wśród dzieci z SRNS nawet 10-25% pacjentów może posiadać mutacje w genie podocyny (NPHS2), guza Wilmsa (ang. *Wilms' tumour suppressor gene 1*, WT1), aktyniny 4 (ang. α -actinin 4, ACTN4), białka związanego z CD2 (ang. *CD 2 associated protein*, CD2AP) czy przejściowego kanału kationowego (ang. *transient receptor potential cation channel*, TRPC6) [37].

Budowa molekularna błony filtracyjnej

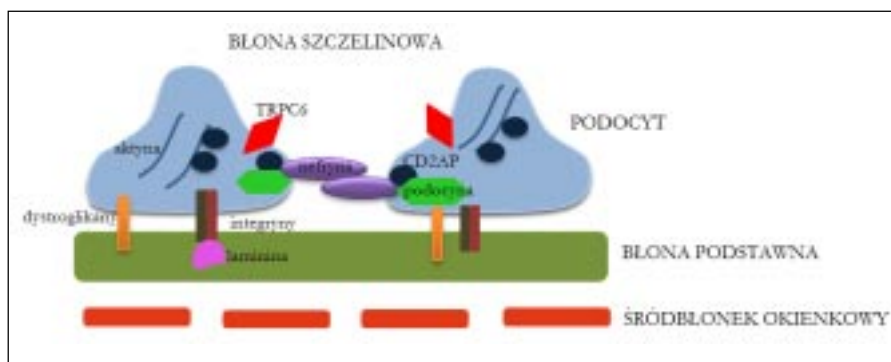
Bariera filtracyjna kłębuszka nerkowego ma fundamentalne znaczenie dla rozwoju zespołu nerczycowego i zbudowana jest z trzech elementów: śródbłonka okienkowego, błony podstawnej oraz podocytów [8]. W przypadku zespołów nerczycowych bariera filtracyjna jest niepełna i zwiększa się jej przepuszczalność [2].

Komórki śródbłonka posiadają pory o średnicy 70-100 nm, zaś błona podstawna, ogranicza przepływ substancji wielkocząsteczkowych proporcjonalnie do ich masy. Podocyty występujące w obrębie listka trzewnego torebki Bowmana są końcowo zróżnicowanymi komórkami nabłonkowymi posiadającymi liczne rozgałęzienia - wyrostki stopowate [8]. Błony szczelinowe (ang. *slit diaphragm*, SD), najważniejszy element bariery filtracyjnej kłębuszka [58], są zakotwiczone w wyrostkach stopowatych podocytów i łączą je ze sobą [25]. Głównymi białkami budującymi i wzmacniającymi błony szczelinowe są nefryna i podocyna (ryc. 1).

Błony szczelinowate powstałe na styku sąsiadujących ze sobą wyrostków stopowatych charakteryzuje obecność białek takich jak P-kadheryny, a-, b-, g- kateniny i zonula occludens-1 (ZO-1), czy CD2AP, co upodabnia je do połączeń o typie przylegania.

W odpowiedzi na wiele sygnałów wewnętrz- oraz zewnątrzkomórkowych podocyty reagują zmianami cytoszkieletu i są zdolne do wykonywania ruchów swoimi wypustkami stopowatymi, przez co regulują współczynnik ultrafiltracji.

Podocyty związane są z szeregiem białek, do cząsteczek istotnych dla ich prawidłowego rozwoju należą: WT1 [59], podoplanina [10], podokaliksyna, GLEPP1 [19], czy synaptopodyna. Na podocytach pojawia się także ekspresja C3bR, nazywanego receptorem 1 dopełniacza, inaktywującego składowe C3b i C4b dopełniacza [29], co tłumaczy immunologiczne podłoże zespołów nerczycowych. Istotną rolę pełnią również integryny, które kontrolują aparat kurczliwy podocytów [41].



Rycina 1
Budowa molekularna błony filtracyjnej.
Glomerular filtration barrier - molecular structure.

Tabela I

Genetycznie uwarunkowany zespół nerczycowy. AR = autosomalne recesywne, AD = autosomalne dominujące.

Genetic forms of nephrotic syndrome. AR = autosomal recessive, AD = autosomal dominant.

Funkcja / lokalizacja białka	Białko	Gen	Zespół genetyczny	Sposób dziedziczenia
Błona szczelinowa	Nefryna	NPHS1	CNS SRNS	AR AR
	Podocyna	NPHS2	CNS SRNS	AR AR
	PLCe1	PLCE1	SRNS	AR
	Białko związane z CD2	CD2AP	SRNS	AD / AR
Kanał jonowy błony szczelinowej	Aktywowany receptorem kanał wapniowy	TRPC6	SRNS	AD
Błona podstawna	Laminina β 2	LAMB2	Zespół Piersona	AR
Dojrzewanie podocytów	Białko guza Wilms'a	WT1	Zespół Denys-Drash Zespół Frasiera SRNS	AD AD AR
Regulacja cytoszkieletu	α aktynina 4	ACTN4	SRNS wieku dorosłego	AD
	Odwrócona forma 2	INF2	SRNS wieku dorosłego	AD

Dotychczas wskazane białka dotyczyły prawidłowej budowy cytoszkieletu podocytów oraz ich wyrostków stopowatych. Z kolei to białka błony szczelinowatej mają zasadnicze znaczenie w powstawaniu białkomoczu, w szczególności nefryna i podocyna. Model oparty o obraz z mikroskopu elektronowego zakłada, że nefryna łączy sąsiadujące wyrostki stopowate na wzór zamka błyskawicznego [1]. Liczne obserwacje i badania kliniczne potwierdziły dominującą rolę nefryny w funkcjonowaniu błony szczelinowatej [27]. Nefryna jest rozmieszczona nieregularnie, przybiera postać ziarnistości szczególnie w miejscach zlewania się wypustek podocytów [53]. Do pozostałych białek błony szczelinowej należą: podocyna, łączące się z nefryną CD2AP oraz ZO-1 i kateniny oddziałujące z NEPH1 [36]. Białkiem łączącym „wiązki” mikrofilamentów jest między innymi α -aktynina 4.

Ze względu na złożoność struktury kłębuszkowej bariery filtracyjnej, wciąż nie poznano wszystkich białek zaangażowanych w zachowanie funkcji podocytów, oraz nie określono możliwych relacji międzycząsteczkowych. Prawdopodobnie kolejne badania odkryją nieznanne dotychczas proteiny zaangażowane w rozwój zespołu nerczycowego.

Genetycznie uwarunkowany zespół nerczycowy

Liczne badania nad genetycznym podłożem zespołu nerczycowego przyczyniły się do wyodrębnienia grupy białek kluczowych dla patogenezy białkomoczu. Zalicza się do nich białka strukturalne błony szczelinowatej podocytów: nefrynę, podocynę, CD2AP i ACTN4 oraz inne cząsteczki kontrolujące prawidłową filtrację kłębuszkową, w tym między innymi WT1.

Wśród zespołów nerczycowych o podłożu genetycznym wyróżnia się typ ujawniający się w wieku dziecięcym oraz w wieku dojrzałym, co zostało powiązane ze zmianami w odmiennych genach zaangażowanych w proces filtracji kłębuszkowej.

W przypadku wczesnego zespołu nerczycowego, zmiany sekwencyjne zidentyfikowano w genie nefryny, podocyny oraz WT1.

Pierwszym genem powiązanym z zespołem nerczycowym u dzieci jest NPHS1 kodujący nefrynę, która należy do nadrodziny immunoglobulin i rodziny komórkowych cząsteczek adhezyjnych [53] i jest zlokalizowana w błonie szczelinowatej znajdującej się pomiędzy wyrostkami stopowatymi dojrzałych podocytów [1].

Mutacje w genie NPHS1 powiązane są z autosomalnym recesywnym wrodzonym zespołem nerczycowym typu fińskiego (ang. *congenital nephrotic syndrome Finnish type*,

CNF), charakteryzującym się białkomoczem w życiu płodowym [31].

Jak wspomniano, mutacje nefryny początkowo powiązane z fińskim typem NS, w przypadku którego najczęstszymi, występującymi w 94% pacjentów, zmianami w populacji fińskiej są 2 mutacje [4]. Pierwszą jest zmiana L41fsX90, określana jako Fin major (główna), skracająca większą część białka, drugą R1109X znana jako Fin minor (poboczna), skracająca jedynie karboksylowy koniec nefryny [31]. Do wystąpienia objawów klinicznych NS konieczne jest odziedziczenie mutacji w obu allelach NPHS1 (homozygoty Fin major lub Fin minor lub heterozygoty Fin major/Fin minor) [29].

W obrębie genu zidentyfikowano kilka gorących miejsc (ang. *hot spot*), w których potencjalnie występuje dużo mutacji. Są one zlokalizowane w rejonach istotnych z punktu widzenia funkcji nefryny, a zatem między innymi w domenach immunoglobulinowych [27]. Wśród poznanych mutacji nefryny, wiele potencjalnych zmian sensu jest skierowanych na reszty aminokwasowe posiadające ładunek, takie jak arginina, oraz hydrofobowe jak leucyna czy izoleucyna. Wprowadzone zmiany najczęściej powodują poważne zaburzenia konformacyjne białka. Inne mutacje dotyczą reszt cysteiny, co zaburza tworzenie mostków disulfidowych [27]. Badania *in vitro* sugerują, że nefryna jest białkiem niezwykle plastycznym, które łatwo przechodzi w alternatywne formy konformacyjne [60] oraz, że blisko 75% znanych mutacji zmiany sensu genu może skutkować nieprawidłowym fałdowaniem nefryny, która zostaje uwięziona w reticulum endoplazmatycznym i w konsekwencji nie zostaje zakotwiczona w błonie podocytów [32].

Wielokrotne sekwencjonowanie nefryny przyczyniło się do identyfikacji dwóch mutacji w rejonie promotorowym, których obecności nie wykryto u zdrowych ludzi. Wstępne badania bioinformatyczne sugerują, że mutacje mogą leżeć w rejonie wiązania nowego czynnika transkrypcyjnego i w konsekwencji powodować zmianę poziomu ekspresji prawidłowego białka [27].

Niemal wszystkie mutacje w genie nefryny skutkują niezwykle ciężkimi przypadkami CNF, niezależnie od lokalizacji mutacji w genie oraz od jej konsekwencji dla kodowanego białka. Wyjątek stanowi występująca w układzie homozygotycznym mutacja R1160X, która została powiązana z łagodniejszą odmianą fińskiego zespołu nerczycowego [27]. Na poziomie molekularnym mutacja R1160X skutkuje skróceniem białka nefryny poniżej ostatniej reszty aminokwasowej w eksonie 27. W przeciwieństwie do mutacji Fin minor w eksonie 26, zmiana R1160X nie powoduje zatrzymania białka w reticulum endoplazmatycznym, nefryna mimo zmiany jest zlokalizowana prawidłowo w kłębuszkach nerkowych [31]. Ciekawe jest jednak to, że wszystkie pozostałe mutacje w eksonie 27, nawet leżące tuż obok R1160X, powodują ciężki wrodzony NS typu fińskiego [27].

Przeprowadzone przez *Koziell* i wsp. badania podjęły także temat mutacji nefryny w innych niż CNF zespołach nerczycowych. Po przeanalizowaniu 29 eksonów, intronów oraz promotora genu u pacjentów z wczesnym SRNS nie zidentyfikowano żad-

nej mutacji [27].

Drugim genem decydującym o podłożu genetycznym zespołu nerczycowego jest NPHS2, który powiązany został z typem autosomalnym recesywnym steroidoopornym, tak rodzinnym jak i sporadycznym [6].

Gen NPHS2 koduje podocynę, integralne białko o ciężarze 42kDa, charakteryzujące się wysoką homologią z łańcuchem 7 rodziny stomatyn [6], które ulega ekspresji zarówno na etapie płodowym, jak i w dojrziałych kłębuszkach [6]. Podocyna wiąże się z cytoplazmatyczną częścią nefryny oraz z dwoma innymi białkami: CD2AP oraz białkiem podobnym do nefryny, Neph1 [21].

Do identyfikacji genu przyczyniła się analiza rodzin chorujących na autosomalny recesywny SRNS [12], następnie opisano szereg mutacji recesywnych powiązanych z NS. Obraz kliniczny u pacjentów posiadających mutacje podocyny wykazuje duże zróżnicowanie, od pierwszych objawów pojawiających się wcześniej po urodzeniu, jak w przypadku mutacji genu nefryny, do ujawnienia się tych objawów w drugiej dekadzie życia. Średni wiek wystąpienia rzutu NS określa się między 3, a 5 rokiem życia. W badaniu histologicznym nerek tych pacjentów wykazano obecność zmian w postaci FSGS, choć opisano także zmiany minimalne, które w kolejnych biopsjach przekształciły się w zmiany ogniskowej segmentalnej sklerotyzacji kłębuszków [50].

Dane zebrane przez *Winna* i wsp. wskazują, że mutacje NPHS2 są obecne w 20-30% sporadycznych, nie rodzinnych, SRNS [55]. Jest to obiecujący wynik, który wymaga weryfikacji oraz znacznego poszerzenia grupy badanej oraz kontrolnej [6].

Co ciekawe, wykazano, że u pacjentów, którzy posiadali mutacje podocyny i przeszli zabieg transplantacji nerki, ryzyko nawrotu zespołu nerczycowego było znacznie niższe w porównaniu z pacjentami nie posiadającymi takich zmian. Prawdopodobieństwo nawrotu białkomoczu było na poziomie 8% u pacjentów posiadających mutacje podocyny, w porównaniu z wartością 35%, u osób nie posiadających mutacji [21]. Taka korelacja byłaby niezwykle pomocna w skutecznym planowaniu ewentualnego zabiegu, choć wyniki badań genetycznych nie są jednoznaczne. *Bertelli* w swojej pracy polemizuje z doniesieniami o roli mutacji podocyny, wskazując, że zmiany w genie NPHS2 nie zwiększają szans na powodzenie przeszczepu. Wskazuje bowiem, że u ponad 40% przebadanych pacjentów z mutacjami w podocynie, po transplantacji nerki doszło do ponownego rozwoju FSGS [5]. Weryfikacja wniosków *Bertelli*go pokazała jednak, że potwierdzenie nawrotu FSGS zostało potwierdzone poprzez biopsję zaledwie u jednego pacjenta. Przytoczony przykład pokazuje, jak łatwo o fałszywe wnioski w badaniach DNA i uzmysławia, jak istotne jest porozumienie w kwestii definicji. Dotyczy to między innymi pojęcia FSGS, którego diagnoza powinna być zawsze potwierdzona wynikiem biopsji, w przeciwnym razie nie będzie możliwe zestawienie wyników różnych autorów.

Dotychczas opisano ponad 30 różnych mutacji chorobotwórczych w genie podocyny, z których większość dotyczy domeny stomatyny w c-końcowej części białka [51].

Wśród poznanych zmian ponad połowę stanowią mutacje zmiany sensu, część dotyczy zmiany ramki odczytu, co skraca powstający łańcuch polipeptydowy, obecne są także mutacje w miejscu składania mRNA generujące nieprawidłowy produkt transkrypcji [45].

Niektóre mutacje genu NPHS2 zaburzają zdolność podocyny do przekazywania nefryny do tratw lipidowych, dotyczy to w szczególności zmiany R138Q [20], powiązanej z ujawnieniem się choroby we wczesnym dzieciństwie [51]. Mutacja R138Q leży w gorącym miejscu szczególnie silnie powiązanych ze steroidoopornym zespołem nerczycowym typu 1 [6]. Ze względu na jej obecność nawet u 30% pacjentów, mutacja R138Q została zaproponowana jako test przesiewowy do diagnostyki steroidoopornego zespołu nerczycowego.

Zupełnie inny charakter ma mutacja R229Q, która przez niektórych badaczy określana jest jako polimorfizm, gdyż obecna jest u około 3% ogólnej populacji [11]. Co ciekawe, wykazano powiązanie między obecnością wariantu R229Q, a przebiegiem klinicznym choroby. U niektórych pacjentów z SRNS, obecność innej mutacji podocyny w połączeniu ze zmianą R229Q wiąże się z późniejszym wystąpieniem objawów choroby, w porównaniu z osobami nie posiadającymi zmiany R229Q [47]. Obserwacje te sugerują, że zmiana nukleotydowa w loci R229Q powoduje złagodzenie objawów zespołu nerczycowego. Z drugiej jednak strony, zmianę R229Q powiązano z wystąpieniem mikroalbuminurii [42] oraz wykazano, iż jej obecność obniża zdolność podocyny do wiązania z nefryną [47].

Jak wspomniano, podocyna została wielokrotnie powiązana ze steroidoopornym zespołem nerczycowym. Prowadzono także badania w odniesieniu do pacjentów wrażliwych na leczenie steroidami, co zaowocowało wykluczeniem genu NPHS2 jako genu kandydata SSNS [12].

Liczba badań nad podłożem genetycznym NS doprowadziła do zaskakujących wniosków. W rzadkich przypadkach wrodzonego zespołu nerczycowego typu fińskiego lub steroidoopornego zespołu nerczycowego zidentyfikowano jednocześnie mutacje w dwóch genach - NPHS1 i NPHS2. Przypadki te skłaniają do modelu trójallelicznego, w którym u pacjentów występują dwa zmienione allele jednego genu i jeden zmieniony w drugim genie. Hipoteza zakłada, że dodatkowa zmiana pojedynczego allelu w drugim genie działa jako genetyczny modulator, prawdopodobnie pogarszając fenotyp danego pacjenta. Założenie to popiera też o współdziałaniu genów podocyny i nefryny w dziedziczeniu zespołu nerczycowego i podkreśla ich rolę w regulowaniu kłębuszkowej filtracji białek. W modelu wielogenowym oprócz NPHS1 i NPHS2, nie wyklucza się możliwości udziału dodatkowych genów modyfikujących obraz kliniczny [2].

Oprócz mutacji w genach nefryny i podocyny, u pacjentów z zespołem nerczycowym wykryto szereg zmian w innych genach zarówno struktury kłębuszkowej bariery filtracyjnej, jak i genach kontrolujących szlaki metaboliczne.

Istotnym czynnikiem transkrypcyjnym okazało się białko guza *Wilmsa* (*Wilms tu-*

mor 1, WT1). Gen supresorowy guza Wilmsa (*WT1*) koduje białko regulujące ekspresję wielu genów podczas rozwoju nerek oraz układu moczowo-płciowego i zawiera 4 domeny cynkowe. *WT1* to czynnik transkrypcyjny i potranskrypcyjny niezbędny do utrzymania prawidłowego fenotypu podocyta i odpowiedzialny za różnicowanie komórek kłębuszka [3].

W przypadku genu *WT1*, mutacje zostały początkowo zidentyfikowane u pacjentów z guzem Wilmsa, brakiem tęczówki, deformacjami narządów moczowo-płciowych oraz opóźnieniem umysłowym [40]. Były to mutacje skracające powiązane z całkowitą utratą funkcji *WT1*. Podobne mutacje zostały powiązane z izolowanym guzem Wilmsa, zaś przypadki rodzinne odpowiadały schematowi dziedziczenia dominującego [22]. Następnie, mutacje w tym genie powiązane z zespołem *Denys-Drash* (ang. *Denys-Drash Syndrome*, DDS). Zmiany dotyczyły w znacznej mierze kodujących elementów genu, eksonu 8 i 9 i były mutacjami powstałymi *de novo*, a zatem nie zostały odziedziczone od rodziców. Najczęściej występującą mutacją jest R394W, która powoduje zmianę argininy na tryptofan w pozycji 394 [13].

Kolejne badania powiązały zmiany w genie *WT1* także z zespołem nerczycowym, za czym przemawia fakt, że białko guza Wilmsa odgrywa ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej czynności podocyta, a w konsekwencji prawidłowej morfologii kłębuszka. U myszy mutacja genu *WT1* powoduje sklerotyzację kłębuszków przebiegającą z pogrubieniem błony podstawnej i fuzją wyrostków stopowatych podocytów [16]. Rola mutacji genu *WT1* w NS może wynikać także z faktu, iż białko guza Wilmsa kontroluje poziom ekspresji genu nefryny [22].

Gen *WT1* został powiązany także z Zespołem Frasiera (ang. *Frasier Syndrome*, FS), w którym występuje ogniskowa sklerotyzacja kłębuszków, męskie obojnactwo rzekome i występowanie gonadoblastomy [3].

W przypadku zespołów nerczycowych wykryto mutacje zmiany sensu dotyczące eksonów: 8 i 9 w obrębie domeny cynkowej, oraz intronu 9 [3]. Mutacje genu *WT1* stwierdzono także w chorobach rozrostowych, takich jak białaczka, retinoblastoma, rak piersi i płuc, a także guz Wilmsa [49]. Co więcej, obniżoną ekspresję białka *WT1* zaobserwowano w kłębuszkach nerkowych chorych na glomerulopatie przebiegające z rozplemem podocytów, tzn. w wariacie FSGS z zapadaniem włócniczek i nefropatii związanej z HIV [59].

Ciekawe wydają się spostrzeżenia *Kozieł* i wsp. [28] dotyczące mutacji *WT1* obecnych w FSGS wrodzonym lub o wczesnym początku, bez innych cech DDS lub FS. W DDS mutacja *WT1* nie prowadzi do powstania patologicznego białka strukturalnego, ale uszkodzonego czynnika transkrypcyjnego. Uszkodzenie obu alleli wyzwało nowotworzenie.

Po przebadaniu większej i bardziej zróżnicowanej populacji autorzy wynioskowali, że mutacje *WT1* są niespotykane w izolowanym FSGS, mimo podobnego obrazu histopatologicznego obu chorób. Może to sugerować wpływ mutacji w innych, specyficznych dla kłębuszka, genach [28].

Kolejnym czynnikiem powiązanim z

autosomalnym recesywnym zespołem nerczycowym genetycznym są mutacje w genie *PLCE1*, który koduje fosfolipazę c epsilon. Pozycja genu została ustalona dzięki analizie podwyższonego poziomu ekspresji w kłębuszkach szczerów oraz identyfikacji sześciu mutacji skracających białko [18]. Dwie spośród dotychczas opisanych mutacji *PLCE1* powiązane były z odpowiedzią na leczenie steroidami lub cyklosporyną A. W związku z tą heterogennością, określenie wpływu mutacji *PLCE1* na odpowiedź na zastosowane leczenie wymaga dodatkowych badań na większej grupie pacjentów.

W przypadku uwarunkowanego genetycznie zespołu nerczycowego ujawniającego się w późniejszym wieku, mutacje, głównie dominujące, zidentyfikowano w genach *ACTN4*, *TRPC6*, *CD2AP* oraz *LAMB2*.

Pierwszym z genów, którego mutacje odpowiadają za objawy choroby jest *ACTN4*, powiązany z autosomalnym dominującym FSGS [52] kodujący białko liczące 634 aminokwasy. W genie *ACTN4* zidentyfikowano mutacje warunkujące rozwój choroby. U pacjentów z mutacją *ACTN4* przebieg kliniczny choroby charakteryzował się stopniowo narastającym białkomoczem rozpoczynającym się w wieku dorosłym i prowadzącym do rozwoju FSGS, a następie do schyłkowej niewydolności nerek (ang. *end stage renal disease*, ESRD) [52]. Wśród dotychczas poznanych mutacji genu *ACTN4*, większość dotyczy substytucji aminokwasów w niekonserwatywnych domenach białka, co w konsekwencji wpływa na domenę, która wiąże aktyne. Badania *in vitro* pokazały, że zmutowana α -aktylina 4 silniej wiąże filamenty aktynowane niż forma dzika białka [26]. Zaproponowano zatem, że dominujące mutacje *ACTN4* zaburzą prawidłową architekturę podocytów, która jest niezbędna dla zachowania funkcji wyrostków stopowatych. Opisano przypadek nosicielstwa mutacji *ACTN4* bez konsekwencji fenotypowych, co sugeruje udział dodatkowych elementów genetycznych lub innych w patogenezie FSGS [52]. Najprawdopodobniej połączenie zmian w sekwencji *ACTN4* z innymi czynnikami genetycznymi powoduje zmiany w postaci FSGS. Mutacje w genie α -aktyliny 4 mogą wpływać na podatność na wystąpienie zespołu nerczycowego, jednak stanowią one rzadki powód dziedzicznego FSGS obejmując zaledwie 4% przypadków rodzinnych [52].

Przykładami opisanych zmian są mutacje zmiany sensu: K228G, T232I i S235P [24], jednak ich obecność nie zawsze koreluje z wystąpieniem białkomoczu.

W wyniku kilkunastu analiz zidentyfikowano drugi czynnik genetyczny odpowiedzialny na rozwój NS w późniejszym wieku, gen *TRPC6*, który koduje aktywowany receptorem kanał wapniowy liczący 931 aminokwasów. W jego sekwencji opisano kilka dominujących mutacji, spośród których dwie powodują wzrost przewodnictwa prądu przez kanał białkowy, a zatem stanowią przykład uzyskania dodatkowej funkcji [17]. Co zaskakujące, podobnie jak w przypadku genu *ACTN4*, również analiza *TRPC6* wskazała przykłady osób posiadających mutację, u których brak zmian fenotypowych, co sugeruje istnienie dodatkowych czynników genetycznych. Mutacje genu *TRPC6* powią-

zane są FSGS w wieku dorosłym, jednak opisano kilka przypadków mutacji u dzieci [56]. Mimo poznania mutacji w genie, wciąż nie jest znany mechanizm zaburzonego działania kanału kationowego, który powoduje nieprawidłowy rozwój podocytów oraz kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Ponieważ białko *TRPC6* oddziałuje z podocyną i nefryną przy błonach szczelinowych, proponuje się model przekazywania sygnałów przez podocynę na kanał *TRPC6*, co moduluje wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w podocytach [44]. W związku z tym, kompleks białkowy zawierający nefrynę, podocynę, *CD2AP* i kanał jonowy *TRPC6* jest tworzony dla zachowania struktury błon szczelinowych wyrostków stopowatych. Mutacje w genie *TRPC6* najprawdopodobniej wpływają na funkcjonalność kompleksu i zaburząją wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w podocytach.

W swoich badaniach *Reiser* i wsp. wykazali, że u pacjentów posiadających mutacje w *TRPC6*, wiek pojawienia się pierwszych objawów NS waha się między 17, a 52 rokiem życia, zaś w ciągu 10 lat od pojawienia się choroby dochodzi do rozwoju ESRD [44].

Trzecim genem związanym z postacią dorosłą zespołu nerczycowego jest *CD2AP* kodujący białko związane z *CD2* [57] zbudowane z 639 aminokwasów, które zaangażowane jest w regulację aktywności cytoszkieletu. Badania pacjentów pozwoliły zidentyfikować mutacje w wysoce konserwatywnej domenie SH3 oraz w rejonie bogatym w prolinę, który wiąże domeny SH3 innych białek podocytów [15]. Założono, że wzrost podatności rozwoju zespołu nerczycowego koreluje z poziomem ekspresji *CD2AP*, gdyż nieprawidłowy przebieg składania mRNA wpływa na poziom ekspresji białka. Białko *CD2AP* oddziałuje z nefryną i oba białka kotwiczą się w tratwach lipidowych w błonie komórkowej [46]. Zaburzenia funkcji *CD2AP* mogą być powiązane ze zwiększoną kruchością cytoszkieletu, co zaburza funkcjonowanie podocytów. Opisany przypadek jest jednym z nielicznych przykładów mutacji w genie *CD2AP*, zatem pełne zrozumienie roli tego białka na patogenezę choroby, wymaga przeprowadzenia badań na dużo liczniejszej grupie pacjentów z objawami NS w dorosłym wieku.

Mutacje genu *CD2AP* powodują zaburzenia nie tylko w nefronie, ale także w innych narządach, głównie naczyniach włosowatych mózgu, mięśni szkieletowych, serca, enterocytach jelitowych, przewodach trzustkowych i śliniankach [46]. Może to wyjaśniać heterogenność obrazu klinicznego niektórych przypadków, w którym dominującym elementem pozostaje NS.

Kolejnym białkiem, które może mieć znaczenie w etiologii NS jest laminina $\beta 2$ (*LAMB2*), której łańcuchy b występują w błonie podstawnej kłębuszka ($\beta 1$ w nerkach niedojrzałych, a $\beta 2$ u osobników dorosłych). Dotychczasowe badania u myszy pozwalają podejrzewać, że zmieniona w wyniku mutacji łańcucha β laminina powoduje uszkodzenie procesu ultrafiltracji kłębuszkowej, a obraz histopatologiczny przypomina zmiany minimalne [33]. Gen *LAMB2* koduje białko będące złożoną glikoproteiną i liczące 1798 aminokwasów. Mutacje *LAMB2*

występują u pacjentów z zespołem Piersona, który charakteryzuje się wrodzonym zespołem nerczycowym (CNS) wywołanym przez rozlany rozplam mezangium oraz specyficzne zmiany w obrębie oczu [7]. Większość alleli związanych z wystąpieniem zespołu Piersona dotyczy mutacji skracających białko i prowadzących do całkowitego braku ekspresji lamininy $\beta 2$ w nerkach [35]. Badania genotypowo-fenotypowe wykazały, że niektóre mutacje zmiany sensu genu LAMB2 mogą być powiązane z szerokim spektrum fenotypowym, począwszy od izolowanego wrodzonego zespołu nerczycowego (CNS), skończywszy na dodatkowych pobocznych zmianach ocznych [33]. Z tego względu stosowne jest przeprowadzenie analiz pod kątem mutacji w genie LAMB2 u pacjentów z izolowanym CNS, u których nie zidentyfikowano żadnych zmian w obrębie genów nefryny, podocyny czy WT1.

Dodatkowo trwają badania nad innymi białkami występującymi w obrębie kłębuszka oraz próby identyfikacji genów je kodujących. Do białek tych należą białka nefrynopodobne NEPH1, NEPH2 i NEPH3, które ulegają ekspresji w podocytach.

W tabeli I zestawiono informacje dotyczące genów, które powiązane z uwarunkowanym genetycznie zespołem nerczycowym.

Kliniczne aspekty mutacji w genach powiązanych z zespołem nerczycowym

Jak wspomniano, zespół nerczycowy jest złożonym zespołem objawów, którego przyczyna nie została w pełni poznana. Teorie zakładają rolę układu immunologicznego oraz zaburzenia strukturalne o charakterze genetycznym.

Zmiany w sekwencji DNA zostały wielokrotnie wykazane w przypadku wrodzonego oraz idiopatycznego NS [58]. Istnieje szereg powodów, dla których badania te są niezwykle istotne zarówno z punktu widzenia diagnostyki, jak i doboru terapii leczenia choroby.

Analiza sekwencji genów zaangażowanych w funkcjonowanie kłębuszkowej bariery filtracyjnej polega na poszukiwaniu zarówno mutacji, jak i polimorfizmów SNP. Identyfikacja mutacji stanowi bezpośrednie potwierdzenie nieprawidłowego funkcjonowania podocytów, natomiast poznanie charakteru mutacji umożliwia określenie konsekwencji jakie niesie ona dla struktury białka. Co więcej, wiedza o tym, czy mutacja występuje w układzie homo- czy też heterozygotycznym informuje, czy dany pacjent posiada jedynie część cząsteczkę nieprawidłową, czy też częściową pulę prawidłowego białka.

Zmiany w DNA kodującym nefrynę dotyczą zwykle pacjentów, u których pierwszy rzut choroby ujawnił się przed ukończeniem pierwszego roku życia [53]. Dla nefrologa informacja o takiej mutacji sugeruje trudniejszy w leczeniu przebieg zespołu nerczycowego.

Z kolei analiza sekwencji podocyny jest zasadna w szczególności u pacjentów chorujących na idiopatyczny zespół nerczycowy [6]. Informacja o mutacjach w tym genie jest niezwykle cenna, ponieważ wielokrotnie powiązano ich występowanie z brakiem odpowiedzi na leczenie glikokortykostero-

idami. Zatem przeprowadzenie analizy sekwencji genu NPHS2 pozwala na dobór terapii immunosupresyjnej dla danego pacjenta. Nie oznacza to rezygnacji z leczenia GK, ale modyfikację leczenia z zastosowaniem dodatkowych leków.

Analiza genetyczna jest cennym źródłem wiedzy o pacjentach, ponieważ ujawnia zaburzenia, które nie podlegają przekształceniom w wyniku zastosowania dostępnych terapii. W przypadku pacjentów, którzy nie odpowiadają na zastosowane leczenie, lub u których dochodzi do częstych nawrotów, wiedza o zaburzeniach na poziomie DNA stanowi wyjaśnienie zaistniałej sytuacji. Niejednokrotnie u takich pacjentów dochodzi do rozwoju schyłkowej niewydolności nerek i jedynym skutecznym rozwiązaniem może okazać się transplantacja nerki, której kłębuszki zbudowane są z prawidłowych białek strukturalnych.

Ze względu na konsekwencje mutacji, w szczególności w genie podocyny, badania sekwencji DNA mogą stanowić nie tylko element pomocny przy podejmowaniu decyzji o doborze leczenia, ale mogą stanowić również test diagnostyczny dostarczający dodatkowych informacji o pacjencie.

Co ciekawe, badania dotyczące terapii steroidowej u pacjentów z zespołem nerczycowym wykazały dodatkowe, poza genowe działanie leków. Steroidy oprócz hamowania produkcji cytokin prozapalnych i immunosupresji mają bezpośredni wpływ na strukturę podocytów. Działanie ochronne polega na hamowaniu apoptozy w podocytach [43] oraz stabilizacji cytoszkieletu aktynowego [48]. Taki mechanizm tłumaczy sporadyczne przypadki, gdy mimo obecności mutacji w genach kodujących białka strukturalne błony filtracyjnej, obserwowana jest remisja i ustąpienie białkomoczu.

Badania genetyczne są zatem uzupełnieniem tradycyjnej diagnostyki oraz profilaktyki. Ich komercjalizacja oraz wprowadzenie do praktyki lekarskiej wymaga przebadania tysięcy pacjentów oraz osób zdrowych, zatem w celu powodzenia takich projektów niezbędna jest współpraca licznych ośrodków badawczych i wspólna analiza otrzymanych wyników.

Piśmiennictwo

- Aaltonen P., Holthöfer H.: The nephrin-based slit diaphragm: new insight into the signalling platform identifies targets for therapy. *Review. Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 3408.
- Antignac C.: Genetic models: clues for understanding the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2002, 109, 447.
- Bache M., Dheu C., Doray B. et al.: Frasier syndrome, a potential cause of end-stage renal failure in childhood. *Pediatr. Nephrol.* 2010, 25, 549.
- Beltcheva O., Martin P., Lenkkeri U.: Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome. *Hum. Mutat.* 2001, 17, 368.
- Bertelli R., Ginevri F., Caridi G.: Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in patients with mutations of podocin. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 41, 1314.
- Boute N., Gribouval O., Roselli S.: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 2000, 24, 349.
- Choi H.J., Lee B.H., Kang J.H. et al.: Variable phenotype of Pierson syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2008, 6, 995.
- Chiang C.K., Inagi R.: Glomerular diseases: genetic

causes and future therapeutics. *Review Nat. Rev. Nephrol.* 2010, 6, 539.

- Christou C.M., Pearce A.C., Watson A.A. et al.: Renal cells activate the platelet receptor CLEC-2 through podoplanin. *Biochem. J.* 2008, 411, 133.
- Eddy A.A., Symons J.M.: Nephrotic syndrome in childhood. *Review. Lancet* 2003, 23, 629.
- Franceschini N., North K.E., Kopp J.B. et al.: NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review. *Genet. Med.* 2006, 8, 63.
- Fuchshuber A., Gribouval O., Ronner V. et al.: Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, 374.
- Gao F., Maiti S., Sun G. et al.: The Wt1+/R394W mouse displays glomerulosclerosis and early-onset renal failure characteristic of human Denys-Drash syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24, 9899.
- Garin E.H., West L., Zheng W.: Interleukin-8 alters glomerular heparan sulfate glycosaminoglycan chain size and charge in rats. *Pediatr. Nephrol.* 2000, 14, 284.
- Gigante M., Pontrelli P., Montemurro E. et al.: CD2AP mutations are associated with sporadic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 6, 1858.
- Guo J.K., Menke A.L., Gubler M.C. et al.: WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 2002, 11, 651.
- Heeringa S.F., Möller C.C., Du J. et al.: A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One.* 2009, 4, e7771.
- Hinkes B., Wiggins R.C., Gbadegesin R. et al.: Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for nephrotic syndrome variant may be reversible. *Nat. Genet.* 2006, 38, 1397.
- Hirakawa M., Tsuruya K., Yotsueda H. et al.: Expression of synaptopodin and GLEPP1 as markers of steroid responsiveness in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Life Sci.* 2006, 17, 757.
- Huber T.B., Simons M., Hartleben B. et al.: Molecular basis of the functional podocin nephrin complex: Mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol. Genet.* 2003, 12, 3397.
- Ichikawa I., Fogo A.: Focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol.* 1996, 10, 374.
- Ito S., Takata A., Hataya H. et al.: Isolated diffuse mesangial sclerosis and Wilms tumor suppressor gene. *J. Pediatr.* 2001, 138, 425.
- Jalanko H.: Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin. *Pediatr. Nephrol.* 2003, 18, 487.
- Kaplan J.M., Kim S.H., North K.N. et al.: Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* 2000, 24, 251.
- Kerjaschki D.: Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 1583.
- Kos C.H., Le T.C., Sinha S. et al.: Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 1683.
- Koziell A., Gech V., Hussain S. et al.: Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum. Mol. Genet.* 2002, 11, 379.
- Koziell A., Grundy R., Barratt T.M. et al.: Evidence for genetic heterogeneity of nephropathic phenotypes associated with Denys-Drash and Frasier syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 1994, 64, 1778.
- Koziell A., Iyer V.K., Moghul N.E. et al.: Congenital nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2001, 16, 185.
- Kriz W., Gretz N., Lemley K.: Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int.* 1998, 54, 687.
- Lenkkeri U., Mannikko M., McCready P.: Struc-

- ture of the gene of congenial nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64, 51.
32. Liu L., Done S., Khoshnoodi J.: Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: Insight into the mechanisms of congenial nephrotic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2001, 10, 2637.
 33. Maselli R.A., Ng J.J., Anderson J.A. et al.: Mutations in LAMB2 causing a severe form of synaptic congenital myasthenic syndrome. *J. Med. Genet.* 2009, 46, 203.
 34. Matejas V., Al-Gazali L., Amirlak I., Zenker M.: A syndrome comprising childhood-onset glomerular kidney disease and ocular abnormalities with progressive loss of vision is caused by mutated LAMB2. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 3283.
 35. Matejas V., Hinkes B., Alkandari F.: Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 2010, 9, 992.
 36. Miner J.: Focusing on glomerular slit diaphragm. *Am. J. Pathol.* 2002, 160, 3.
 37. Mucha B.: Members of the APN Study Group. Mutations in the Wilm's tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr. Res.* 2006, 59, 325.
 38. Mundel P., Heid H.W., Mundel T.M. et al.: Synaptopodin: an actin associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J. Cell Biol.* 1997, 139, 193.
 39. Nangaku M., Johnson R.J., Couser W.G.: Glomerulonephritis and complement regulatory proteins. *Exp. Nephrol.* 1997, 5, 345.
 40. Niaudet P., Gubler M.C.: WT1 and glomerular diseases. *Review. Pediatr. Nephrol.* 2006, 21, 1653.
 41. Pavenstadt H.: Roles of the podocyte in glomerular function. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2000, 278, F173.
 42. Pereira A.C., Pereira A.B., Mota G.F. et al.: NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int.* 2004, 65, 1026.
 43. Ranson R.F., Lam N.G., Hallett M.A. et al.: Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization. *Kidney Int.* 2005, 68, 2473.
 44. Reiser J., Polu K.R., Moller C.C. et al.: TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat. Genet.* 2005, 37, 739.
 45. Ruf R.G., Lichtenberger A., Karle S.M. et al.: Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15, 722.
 46. Schwarz K., Simons M., Reiser J. et al.: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 1621.
 47. Tsukaguchi H., Sudhakar A., Le T.C. et al.: NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J. Clin. Invest.* 2002, 110, 1659.
 48. Wada T., Pippin J.W., Marshall C.B. et al.: Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl-2-related family proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, 16, 2615.
 49. Wagner K.D., Wagner N., Schedl A.: The complex life of WT1. *J. Cell Sci.* 2003, 16, 1653.
 50. Weber S.: Hereditary Nephrotic Syndrome. [W:] *Comprehensive pediatric nephrology*, Philadelphia, Elsevier, 2008, 219.
 51. Weber S., Gribouval O., Esquivel E.L. et al.: NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int.* 2004, 66, 571.
 52. Weins A., Kenlan P., Herbert S. et al.: Mutational and Biological Analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, 16, 3694.
 53. Welsh G.I., Saleem M.A.: Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *Review. J. Pathol.* 2010, 220, 328.
 54. Wernerson A., Duner F., Petterson E. et al.: Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003, 18, 70.
 55. Winn M.P.: Not all in the family: Mutations of podocin in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 577.
 56. Winn M.P., Conlon P.J., Lynn K.L. et al.: A mutation in TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005, 308, 1801.
 57. Wolf G., Stahl R.A.: CD2-associated protein and glomerular disease. *Review. Lancet* 2003, 362, 1746.
 58. Woroniecki R.P., Kopp J.B.: Genetics of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol.* 2007, 22, 638.
 59. Yang Y., Gubler M.C., Beaufile H.: Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron* 2002, 91, 416.
 60. Zhang J., Ofevrsedt L., Khoshnoodi J.: Molecular structure of recombinant nephrin by electron tomography, Abstract A2924, presented at the ASN/ISN World Congress of Nephrology, 2001, San Francisco, CA, USA.