

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής
Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία»
Διευθυντής: Καθηγητής Εμμανουήλ Καναβάκης

Διδακτορική Διατριβή

**Μοριακή ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών των
γονιδίων NRHS2, WT1 και ACTN4 σε ασθενείς με ανθεκτικό σε
στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο**

Σπυρίδων Μεγρέμης
Μοριακός Γενετιστής

Αθήνα 2013

Όρκος

Ὀμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγιάν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστωρας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ἐμῶν ἀδελφοῖς ἴσων ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσεως καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσεως μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί. Διαπήμασί τε χρήσομαι ἐπ’ ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξαι. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενί αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγῆσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὀμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν εἰσῶ, ἐσελεύσομαι ἐπ’ ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἐργῶν ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ ὄ ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἂ μὴ χρὴ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἀρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὀρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένω παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον, παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποροῦντι, τάναντία τουτέων.

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονεῖς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέλφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που

πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: 23/11/2005

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής-Διευθυντής Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Σοφία Κίτσιου-Τζέλη, Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Ιωάννα Ραχήλ Traeger Συνοδινού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής: 7/2/2013

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής Γενετικής, Διευθυντής Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών.

Σοφία Κίτσιου-Τζέλη, Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ιωάννα Ραχήλ Traeger Συνοδινού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών.

Χρυσάνθη Μπακούλα Τζουμάκα, Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Διευθύντρια Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων «Παν. & Αγλ. Κυριακού».

Αθανάσιος Τζιούφας, Καθηγητής Παθολογίας – Ανοσολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθυντής Κλινικής Παθολογικής Φυσιολογίας, Γ. Ν. «Λαϊκό».

Νικόλαος Γ. Παπαδόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Αλλεργιολογίας – Παιδιατρικής Αλλεργιολογίας, Υπεύθυνος Μονάδας Αλλεργιολογίας, Β΄ Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων «Παν. & Αγλ. Κυριακού».

Πολυξένη Νικολαΐδου-Καρπαθίου, Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Διευθύντρια Γ΄ Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικόν».

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώνεται στην ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών των γονιδίων NPHS2, WT1 και ACTN4 στο γενετικό υλικό ασθενών με ανθεκτικό σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο (SRNS). Το νεφρωσικό σύνδρομο αποτελεί μια κοινή νόσο των νεφρών σε παιδική ηλικία. Χαρακτηρίζεται από οξεία πρωτεϊνουρία, υποαλβουμιναιμία, οίδημα και υπερλιπιδαιμία. Συνήθως, οι ασθενείς παρουσιάζουν ύφεση της πρωτεϊνουρίας ως αποτέλεσμα μόνο της θεραπείας με κορτικοστεροειδή. Όμως, ένα μικρό ποσοστό δεν αντιδρά στην θεραπεία με αποτέλεσμα το σύνδρομο να μεταβάλλεται σε ανθεκτικό σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο. Έχει βρεθεί ότι στην παθογένεια του SRNS εμπλέκονται γονίδια τα οποία εκφράζονται στην σπειραματική μεμβράνη του νεφρού και συγκεκριμένα στο θυριδωτό διάφραγμα που σχηματίζεται από εξαιρετικά διαφοροποιημένα κύτταρα, τα ποδοκύτταρα. Τρία από αυτά τα γονίδια, κωδικοποιούν την πρωτεΐνη ποδοκίνη (NPHS2 gene), τον μεταφραστικό παράγοντα WT1 (WT1 gene) και την κυτταροσκελετική πρωτεΐνη α-ακτινίνη 4 (ACTN4 gene). Η γενετική βάση του συνδρόμου δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής στον ελληνικό πληθυσμό παρά μόνο στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Στόχος της μελέτης είναι η αναζήτηση παθολογικών μεταλλάξεων των προαναφερθέντων γονιδίων, η παρακολούθηση του τρόπου κληρονομικότητάς τους και ο συσχετισμός τους με τα κλινικά στοιχεία των ασθενών που συμμετείχαν στην εργασία αυτή. Τα συμπεράσματα της διατριβής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιόπιστη και έγκυρη διάγνωση των ασθενών με SRNS, την κατεύθυνση της θεραπευτικής αγωγής ή την επιλογή του θεραπευτικού σχήματος, παρέχοντας πληροφορίες για το γενετικό υπόβαθρο του συνδρόμου καθώς και για την πρόγνωση του ασθενούς.

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία». Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Γενετικής και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής κ. Εμμανουήλ Καναβάκη για την δυνατότητα που μου προσέφερε να εκπονήσω την παρούσα διατριβή και στην Καθηγήτρια Γενετικής κ. Σοφία Κίτσιου-Τζέλη για την άριστη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια στην συγγραφή της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθίνω στην επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Ιωάννα Ραχήλ Traeger Συνοδινού για την καθοδήγηση όλα αυτά τα χρόνια, την βοήθεια στην συγγραφή της διατριβής και των δημοσιευμένων άρθρων αλλά κυρίως για την μετάδοση της επιστημονικής σκέψης και προσέγγισης που απαιτεί ο κλάδος της γενετικής.

Ευχαριστώ θερμά: (1) τους ιατρούς Δρ Κωνσταντίνο Στεφανίδη και Δρ Ανδρομάχη Μητσιώνη για την συγκέντρωση και παροχή των δειγμάτων που αναλύθηκαν και την βοήθεια που προσέφεραν στη συγγραφή των άρθρων, (2) την Δρ Φωτεινή Κομιανού για την συνεισφορά της στη συγκέντρωση ασθενών, (3) τους ασθενείς για την συγκατάθεσή τους να χρησιμοποιηθούν στην μελέτη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην Δρ Ασπασία Δεστούνη και στις υποψήφιες διδάκτορες Μυρτώ Πούλου και Ειρήνη Φυλακτού για την εκπαίδευση και κυρίως για την φιλία που μου προσέφεραν απλόχερα. Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία, εκπαίδευση, καθοδήγηση και ωραίες στιγμές που ζήσαμε.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, την αδερφή μου Σεμίνα και τους γονείς μου Γεωργία και Γιάννη, για την αγάπη τους, την ψυχολογική και οικονομική στήριξη που μου παρείχαν ώστε να μου δοθεί η δυνατότητα να φτάσω στην επίτευξη αυτού του στόχου.

Σπυρίδων Μεγρέμης

Βιογραφικό Σημείωμα

Ο Σπύρος Μεγρέμης αποφοίτησε από το «*Dundee University, Scotland, UK*» με «*Honors*» στην Μοριακή Γενετική. Στη συνέχεια προχώρησε στις διδακτορικές του σπουδές στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών όπου ασχολήθηκε με το γενετικό υπόβαθρο και την μοριακή ανάλυση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών που αφορούν το ανθεκτικό σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο σε παιδιατρικούς ασθενείς. Από το 2010 είναι μέλος της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Είναι υπεύθυνος για τον σχεδιασμό, την παρακολούθηση και εκτέλεση ποικίλων ερευνητικών προγραμμάτων. Αυτά περιλαμβάνουν την ανάλυση έκφρασης αντικών γονιδίων τα οποία μετέχουν στα μονοπάτια των ιντερφερονών, την ανάλυση των επιγενετικών μηχανισμών που οδηγούν στην ωρίμανση των ιντερφερονών καθώς και τον ρόλο που διαδραματίζουν οι αναπνευστικές λοιμώξεις στη διαδικασία αυτή, την ανίχνευση και ανάλυση δικτύων «microRNAs» ως αντικείμενοι μηχανισμοί του ρινικού επιθήλιου στον ανθρώπινο Ρινοϊό, την επιλογή κατάλληλων περιοχών-στόχων στην RNA αλληλουχία των Ρινοϊών για τον σχεδιασμό μορίων RNAi, την εύρεση ολιγονουκλεοτιδίων μοτίβων στις αλληλουχίες των Ρινοϊών τα οποία μπορούν να προκαλέσουν διέγερση της μη ειδικής και ειδικής ανοσίας και τέλος την χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής για τον σχεδιασμό και ανάλυση ποικίλων δεδομένων (data mining, target prediction, phylogenetic analysis, distance matrices, RNAseq analysis, Next generation sequencing analysis).

Έχει ασχοληθεί ιδιαίτερα με την ανάλυση του γονιδιώματος του Ρινοϊού με στόχο την χαρτογράφηση των εξελικτικών πιέσεων που καθορίζουν τις βιολογικές λειτουργίες και την εξέλιξη του ιού.

Δημοσιεύσεις:

- **The Genomic Signature of Human Rhinoviruses A, B and C**

Spyridon Megremis, Philippos Demetriou, Heidi Makrinioti, Alkistis E Manoussaki, Nikolaos G Papadopoulos
PLoS ONE 09/2012

- **Sertoli cell tumor and gonadoblastoma in an untreated 29-year-old 46,XY phenotypic male with Frasier syndrome carrying a WT1 IVS9+4C>T mutation.**

Sophia Kitsiou-Tzeli, Maria Deligiorgi, Sophia Malaktari-Skarantavou, Charalampos Vlachopoulos, Spyridon Megremis, Irene Fylaktou, Joanne Traeger-Synodinos, Christina Kanaka-Gantenbein, Christodoulos Stefanadis, Emmanuel Kanavakis
Hormones (Athens, Greece) 07/2012; 11(3):361-7.

- **Lymphocyte stimulation test for the diagnosis of non-IgE-mediated cow's milk allergy: a step closer to a noninvasive diagnostic tool?**

S Giavi, S Megremis, N G Papadopoulos
International Archives of Allergy and Immunology 09/2011; 157(1):1-2.

- **Broad and unexpected phenotypic expression in Greek children with steroid-resistant nephrotic syndrome due to mutations in the Wilms' tumor 1 (WT1) gene.**

Spyridon Megremis, Andromachi Mitsioni, Irene Fylaktou, Sofia Kitsiou Tzeli, Filadelfia Komianou, Constantinos J Stefanidis, Emmanuel Kanavakis, Joanne Traeger-Synodinos
European Journal of Pediatrics 04/2011; 170(12):1529-34

- **Nucleotide variations in the NPHS2 gene in Greek children with steroid-resistant nephrotic syndrome.**

Spyridon Megremis, Andromachi Mitsioni, Artemis G Mitsioni, Irene Fylaktou, Sofia Kitsiou-Tzelli, Constantinos J Stefanidis, Emmanuel Kanavakis, Joanne Traeger-Synodinos
Genetic Testing and Molecular Biomarkers 04/2009; 13(2):249-56

- **SCREENING OF MUTATIONS IN THE NPHS2 GENE IN GREEK PATIENTS WITH AUTOSOMAL-RECESSIVE STEROID-RESISTANT NEPHROTIC SYNDROME**

Spyridon Megremis, Artemis Mitsioni, Andromachi Mitsioni, Constantinos Stefanidis, Sofia Kitsiou-Tzelli, Emmanuel Kanavakis, Joanne Synodinos-Traeger
PEDIATRICS 01/2008

- **Mutations of the NPHS2 and WT1 genes are causative in Greek childhood patients with steroid resistant nephrotic syndrome**

Mitsioni A. G, Megremis S, Traeger-Synodinos J, Mitsioni A, Komianou F, Kanavakis E, Stefanidis C
Pediatric Nephrology 01/2008; 23(9)

- **Basic techniques of molecular biology and their applications in the diagnosis of childhood diseases**

Spyridon Megremis, Andreas Pampanos

Paediatrici, Journal of the Greek Pediatric Society, (2008) 71(2):105-115.

Email: spyridonmegremis@gmail.com

Τηλ: +30 210 7776964 (11)

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	σελ. 12-64
1.1 Νεφρωσικό σύνδρομο- Ορισμός	σελ. 12
1.2 Επιδημιολογία νεφρωσικού συνδρόμου	σελ. 16
1.3 Παθογένεια νεφρωσικού συνδρόμου	σελ. 19
1.3.1 Πρωτογενής δυσλειτουργία του νεφρικού σπειράματος	σελ. 19
1.3.2 Κυκλοποιητικοί παράγοντες	σελ. 21
1.3.3 Ανοσολογικές ανωμαλίες	σελ. 22
1.4. Ιδιοπαθές Ανθεκτικό σε Στεροειδή Νεφρωσικό Σύνδρομο (SRNS)	σελ. 24
1.4.1 Ιστολογία SRNS	σελ. 24
1.4.2 Παθογένεια SRNS	σελ. 28
1.4.2.1 Το ποδοκύτταρο	σελ. 28
1.4.2.2 Ποδοκυτταρικές προσεκβολές, ποδίσκοι	σελ. 30
1.4.2.3 Το θυριδωτό διάφραγμα	σελ. 33
1.4.2.4 Μεταβίβαση σημάτων στα ποδοκύτταρα	σελ. 40
1.4.2.5 Οι μεταγραφικοί παράγοντες του ποδοκυττάρου	σελ. 45
1.4.3 Μεταλλάξεις γονιδίων που οδηγούν στο SRNS	σελ. 48
1.4.3.1 Μεταλλάξεις γονιδίων που οδηγούν σε SRNS στη παιδική ηλικία	σελ. 49
1.4.3.2 Μεταλλάξεις γονιδίων που οδηγούν σε SRNS σε ενήλικες	σελ. 59
1.4.4 Αντιμετώπιση του SRNS	σελ. 62
Κεφάλαιο 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	σελ. 65-79
2.1 Κλινικό δείγμα και ομάδα ελέγχου	σελ 65
2.2 Σχεδιασμός Μοριακής Ανάλυσης των γονιδίων NPHS2, WT1, ACTN4	σελ. 70
2.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού	σελ. 70
2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	σελ. 71

2.2.3 Σχεδιασμός PCR για περιοχές του γονιδίου NPHS2	σελ. 72
2.2.4 Σχεδιασμός PCR για περιοχές του γονιδίου WT1	σελ. 72
2.2.5 Σχεδιασμός PCR για περιοχές του γονιδίου ACTN4	σελ. 73
2.2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού	σελ. 74
2.2.7 Ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με τη μέθοδο «resequencing»	σελ. 75
2.2.8 In Silico ανάλυση αποτελεσμάτων	σελ. 78
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα	σελ. 80-86
3.1 Ανάλυση νουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου της ποδοκίνης (NPHS2)	σελ. 80
3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου WT1	σελ. 84
3.3 Ανάλυση νουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου ACTN4	σελ. 86
Κεφάλαιο 4: Σχολιασμός αποτελεσμάτων / σχέση γονότυπου-φαινότυπου	σελ. 87-98
4.1 Συσχέτιση γονότυπου NPHS2 και κλινικού φαινότυπου	σελ. 87
4.2 Συσχέτιση γονότυπου WT1 και κλινικού φαινότυπου	σελ. 93
4.3 Συσχέτιση γονότυπου ACTN4 και κλινικού φαινότυπου	σελ. 98
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα	σελ. 99-104
Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά και ανακοινώσεις σε συνέδρια	σελ. 105
Βιβλιογραφία	σελ. 107
Ευρετήριο πινάκων και εικόνων	σελ. 122

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Νεφρωσικό σύνδρομο- Ορισμός

Το νεφρωσικό σύνδρομο (**Nephrotic Syndrome, NS**) αποτελεί κοινή νόσο των νεφρών στην παιδική ηλικία. Χαρακτηρίζεται από οξεία πρωτεϊνουρία ($>40 \text{ mg/m}^2/\text{hr}$ ή κλάσμα πρωτεΐνης ουρίας/κρεατινίνη $>2.0 \text{ mg/mg}$), υποαλβουμιναιμία ($<2.5 \text{ g/dl}$), οίδημα και υπερλιπιδαιμία (ISKDC 1981; Niaudet 2004). Τα παιδιά με NS εμφανίζουν συχνά στα πρώτα χρόνια της ζωής τους περικογχική διόγκωση με ή χωρίς γενικότερο οίδημα. Η νόσος οφείλεται σε δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες του σπειραματικού διηθητικού φραγμού οδηγώντας στην ανικανότητα του νεφρού να περιορίσει τη διέρευση πρωτεΐνης στα ούρα. Το NS αναπτύσσεται όταν η απώλεια πρωτεΐνης στα ούρα υπερκαλύπτει το ρυθμό παραγωγής αλβουμίνης στο ήπαρ, με αποτέλεσμα την εμφάνιση υποαλβουμιναιμίας και οιδήματος. Ενώ το NS μπορεί να προκληθεί από πληθώρα σπειραματικών και συστημικών νόσων (πίνακας 1), ο συνηθέστερος τύπος στη παιδική ηλικία είναι το ιδιοπαθές νεφρωσικό σύνδρομο (Idiopathic nephrotic syndrome, INS).

Περίπου το 80% των παιδιών με INS ανταποκρίνονται σε θεραπεία με κορτικοστεροειδή με ολική απαλοιφή της πρωτεϊνουρίας και του οιδήματος. Ωστόσο η κλινική πορεία τους ποικίλλει εφόσον περίπου 60% αυτών εμφανίζουν συχνές υποτροπές ή εξαρτώνται από τη θεραπεία στεροειδών προκειμένου να διατηρήσουν την ύφεση της πρωτεϊνουρίας (ISKDC 1981; Niaudet 2004). Με βάση

την ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία με στεροειδή το INS χωρίζεται σε 4 βασικούς τύπους:

1. **Ευαίσθητο σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο (Steroid Sensitive Nephrotic Syndrome, SSNS)**. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι ασθενείς που παρουσιάζουν ύφεση της πρωτεϊνουρίας ως αποτέλεσμα μόνο της θεραπείας με κορτικοστεροειδή.
2. **Εξαρτώμενο σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο (Steroid Dependent Nephrotic Syndrome, SDNS)**. Ασθενείς που ανταποκρίνονται στην αρχική θεραπεία με κορτικοστεροειδή εμφανίζοντας ολική ύφεση αλλά υποτροπιάζουν μέσα σε δύο εβδομάδες μετά τη διακοπή της θεραπείας. Αυτοί οι ασθενείς τυπικά απαιτούν τη συνέχιση της θεραπείας με μικρή δόση στεροειδών προκειμένου να μην επανεμφανίσουν πρωτεϊνουρία. Για αυτό το λόγο θεωρούνται εξαρτώμενοι από τα στεροειδή (Schulman, Kaiser et al. 1988).
3. **Νεφρωσικό σύνδρομο με συχνές υποτροπές (Frequent Relapsing Nephrotic Syndrome, FRNS)**. Οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν ολική ύφεση σε ανταπόκριση στα στεροειδή. Παραμένουν σε ύφεση για αρκετές εβδομάδες μετά τη διακοπή της θεραπείας παρουσιάζουν όμως αρκετές υποτροπές. Εάν οι υποτροπές εμφανιστούν περισσότερες από 4 φορές σε μια χρονική περίοδο 12 μηνών, τότε οι ασθενείς ανήκουν σε αυτό τον κλινικό τύπο INS (Schulman, Kaiser et al. 1988).
4. **Ανθεκτικό σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο (Steroid Resistant Nephrotic Syndrome, SRNS)**. Ασθενείς οι οποίοι δεν εμφανίζουν ύφεση μετά από 8

εβδομάδες θεραπείας με κορτικοστεροειδή κατηγοριοποιούνται ως ασθενείς με SRNS (ISKDC 1981; Niaudet 2004). Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αρκετές διαφορετικές απόψεις στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά τον ορισμό του SRNS. Μερικοί συγγραφείς ορίζουν ως SRNS τη παθολογική κατάσταση κατά την οποία ο ασθενής δεν εμφανίζει ύφεση μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας με πρεδνιζόνη (60 mg/m²/day), ενώ άλλοι ως την αποτυχία εμφάνισης ύφεσης μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας με πρεδνιζόνη (60 mg/m²/day) η οποία συνεχίζεται για 4 επιπρόσθετες εβδομάδες χορήγησης πρεδνιζόνης (40 mg/m²/dose) κάθε 2^η ημέρα, ή ως 4 εβδομάδες χορήγησης πρεδνιζόνης (60 mg/m²/day) ακολουθούμενης από ενδοφλέβιες ώσεις μεθυλπρεδνιζόνης (1000 mg/1.73 m²/dose) (ISKDC 1981; Niaudet, Gagnadoux et al. 1998).

Πίνακας 1: Αίτια νεφρωσικού συνδρόμου (μετά τους πρώτους 3 μήνες ζωής)

Ιδιοπαθές υπόβαθρο	<p>Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων (MCD)</p> <p>Εστιακή τμηματική σπειραματική σκλήρυνση (FSGS)</p> <p>Μεμβρανώδης πολλαπλασιαστική σπειραματονεφρίτιδα (MPGN)</p> <p>Μεμβρανώδης νεφροπάθεια (MN)</p> <p>IgM Νεφροπάθεια</p> <p>C1q Νεφροπάθεια</p>
Γενετικό υπόβαθρο	<p>Αυτοσωματικό υπολειπόμενο NS με FSGS λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου της ποδοκίνης (NPHS2)</p> <p>Αυτοσωματικό υπολειπόμενο NS με FSGS λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου PLCE1</p> <p>Αυτοσωματικό επικρατητικό NS με διάχυτη μεσαγγειακή σκλήρυνση (DMS) λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου WT1</p> <p>Αυτοσωματικό επικρατητικό NS με FSGS λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου CD2AP</p> <p>Αυτοσωματικό επικρατητικό NS με FSGS λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου ACTN4</p> <p>Αυτοσωματικό επικρατητικό NS με FSGS λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου TRPC6</p>
Λοιμώξεις	<p>Ηπατίτιδα Β και C</p> <p>HIV</p> <p>Ελονοσία</p> <p>Σχιστοσωμίαση</p> <p>Φιλάρια</p>

Συστηματικές ασθένειες	<p>Πορφύρα Henoch-Schönlein</p> <p>Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος</p> <p>Σακχαρώδης διαβήτης</p> <p>Σαρκοείδωση</p>
Μεταβολικές ασθένειες	<p>Νόσος Fabry</p> <p>Γλουταρική οξαμία</p> <p>Γλυκογονιάσεις</p> <p>Μιτοχονδριακές κυτταροπάθειες</p>
Αιματολογικές και ογκολογικές ασθένειες	<p>Λευχαιμία</p> <p>Λέμφωμα (Το λέμφωμα Hodgkin's είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει σε νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων)</p> <p>Δρεπανοκυτταρική νόσος</p>
Φάρμακα	<p>Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs)</p> <p>Χρυσός</p> <p>Πενικιλλαμίνη</p> <p>Αναστολείς ενζύμου μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACEIs)</p> <p>Υδράργυρος</p> <p>Ιντερφερόνη</p> <p>Ηρωίνη</p> <p>Λίθιο</p>
Διάφορα	<p>Τσίμπημα μέλισσας (MCNS)</p> <p>Αλλεργίες σε τρόφιμα</p> <p>Παχυσαρκία (συνήθως με FSGS)</p> <p>Κύηση</p>

1.2 Επιδημιολογία νεφρωσικού συνδρόμου

Η ετήσια συχνότητα εμφάνισης νεφρωσικού συνδρόμου στις περισσότερες χώρες του δυτικού ημισφαιρίου υπολογίζεται σε 2-7 περιστατικά/ 100.000 παιδιά (McEneaney and Strife 1982; Nash 1992; Srivastava, Simon et al. 1999; Hogg, Portman et al. 2000; Niaudet 2004). Ο επιπολασμός είναι 16 περιστατικά/ 100.000 παιδιά (Niaudet 2004). Αν και τα τελευταία 30 χρόνια η συχνότητα εμφάνισης του NS παραμένει σταθερή ωστόσο παρατηρούνται αλλαγές στα ιστολογικά ευρήματα. Για παράδειγμα, αναφορές ανά τον κόσμο δείχνουν αύξηση των περιστατικών με εστιακή και τμηματική σπειραματική σκλήρυνση ακόμα και όταν λαμβάνεται υπόψη η γενικότερη υπόθεση ότι όλοι οι ασθενείς στους οποίους δεν πραγματοποιήθηκε βιοψία νεφρού είχαν NS με MCD (Bonilla-Felix, Parra et al. 1999; Srivastava, Simon et al. 1999; Kari 2002; Eddy and Symons 2003; Filler, Young et al. 2003).

Η συχνότητα και η ιστομορφολογία του NS επηρεάζεται από τη γεωγραφική θέση και την φυλή των ασθενών. Σε μια μελέτη που έλαβε χώρα στη Μεγάλη Βρετανία βρέθηκε ότι το ιδιοπαθές NS είναι 6 φορές συχνότερο στους Ασιάτες σε σχέση με τους Ευρωπαίους ασθενείς (Sharples, Roulton et al. 1985). Παράλληλα, στους αφρικανικούς πληθυσμούς το INS εμφανίζεται σε μικρότερο ποσοστό διότι είναι συνήθως δευτερογενές ως αποτέλεσμα μολυσματικών παραγόντων (Hendrickse, Adeniyi et al. 1972; Coovadia, Adhikari et al. 1979; Abdurrahman, Aikhionbare et al. 1990). Στις Η.Π.Α η συχνότητα του συνδρόμου καταμερίζεται ισότιμα μεταξύ των διαφόρων εθνικοτήτων (Bonilla-Felix, Parra et al. 1999). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η παθογένεια του NS εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ωστόσο, ο φυλετικός παράγων διαδραματίζει

σημαντικό ρόλο στο τύπο ιστομορφολογίας των νεφρωσικών σπειραμάτων(Bonilla-Felix, Parra et al. 1999).

Η ηλικία είναι ένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται με τη συχνότητα εμφάνισης και τα ιστολογικά ευρήματα του NS. Η συνηθέστερη ηλικία εμφάνισης NS είναι 2 ετών, ενώ 70-80% των περιστατικών αφορούν παιδιά ηλικίας μέχρι 6 ετών (Nash 1992; Niaudet 2004). Μέχρι ενός σημείου η ηλικία μπορεί να αποτελέσει παράγοντα πρόβλεψης των ιστολογικών αλλοιώσεων στο NS. Παιδιά τα οποία διαγνώστηκαν με NS πριν την ηλικία των 6 ετών εκπροσωπούν το 79.6% των περιστατικών με MCD σε σύγκριση με το 50% αυτών με FSGS και μόνο 2.6% αυτών με MPGN (ISKDC 1978). Όταν τα παραπάνω αποτελέσματα αναλύθηκαν με βάση τα ιστολογικά ευρήματα, η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου ήταν 3 ετών για τα περιστατικά με MCD, 6 ετών για τα περιστατικά με FSGS και 10 ετών για τα περιστατικά με MPGN (ISKDC 1978). Αν εξαιρέσουμε το 1^ο έτος ζωής, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η πιθανότητα εμφάνισης νόσου ελαχίστων αλλοιώσεων μειώνεται όσο αυξάνεται η ηλικία, ενώ αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης FSGS με χειρότερη πρόγνωση (ISKDC 1978; Sorof, Hawkins et al. 1998). Οι ιστολογικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με το NS έχουν σημαντικές προεκτάσεις όσον αφορά τη πιθανότητα ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία στεροειδών. Αν και το 80% των παιδιατρικών ασθενών που διαγιγνώσκονται με NS παρουσιάζουν ύφεση ακολουθώντας θεραπεία πρεδνιζόνης για 8 εβδομάδες, ανταπόκριση στα στεροειδή παρουσιάζεται σε 93% αυτών με MCD, σε 30% αυτών με FSGS και σε 7% αυτών με MPGN (ISKDC 1978; ISKDC 1981). Ταυτόχρονα, η ανταπόκριση σε στεροειδή σχετίζεται και με τη γεωγραφική θέση και εθνικότητα των ασθενών. Στις δυτικές

χώρες το 80% των παιδιών με NS παρουσιάζουν ανταπόκριση, σε αντίθεση με τις χώρες της Νοτίου Αφρικής , της Νιγηρίας και της Γκάνας όπου το ποσοστό αυτό μειώνεται σε 9-50% (Abdurrahman, Aikhionbare et al. 1990; Bhimma, Coovadia et al. 1997; Doe, Funk et al. 2006).

Η αποτυχία στην ανταπόκριση σε θεραπεία στεροειδών παίζει ρόλο και στην πιθανότητα εμφάνισης τελικού σταδίου προοδευτικής νεφρικής ανεπάρκειας αργότερα στη ζωή. Σε μια πολυεθνική μελέτη, από τα 75 παιδιά με FSGS, βρέθηκε ότι 5 χρόνια μετά τη διάγνωση 21% είχε τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια, 23% είχε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και 37% είχε εμφανίσει επίμονη πρωτεϊνουρία ενώ μόνο το 11% παρέμεινε σε ύφεση (Group 1985). Για αυτό το λόγο από τη στιγμή που ένα παιδί θα διαγνωσθεί με FSGS, η πιθανότητα εμφάνισης μέσα σε χρονικό διάστημα 5 ετών χρόνιας ή τελικού σταδίου νεφρικής ανεπάρκειας είναι 50%.

1.3 Παθogenεία νεφρωσικού συνδρόμου

Το βασικό σύμπτωμα σε όλες τις κατηγορίες νεφρωσικού συνδρόμου είναι η ανάπτυξη οξείας πρωτεϊνουρίας. Αν και η μοριακή βάση πίσω από αυτή την παθολογική κατάσταση δεν έχει προσδιορισθεί πλήρως, τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι το NS μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας πρωτογενούς ανωμαλίας των σπειραμάτων, της ύπαρξης κυκλοποιητικών παραγόντων, ή μιας ανοσολογικής ανωμαλίας.

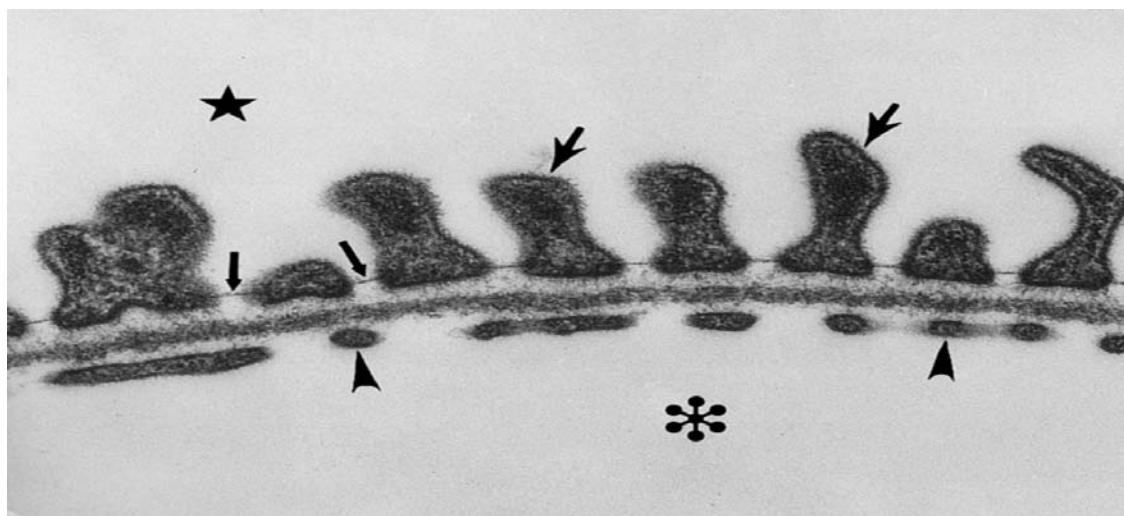
1.3.1 Πρωτογενής δυσλειτουργία του νεφρικού σπειράματος

Μία από τις βασικές λειτουργίες του νεφρού είναι η διήθηση του αίματος στα σπειράματα, η οποία επιτρέπει την απέκκριση των τοξικών ουσιών και την ταυτόχρονη συγκράτηση των πρωτεϊνών του αίματος και όλων των κυττάρων του αίματος. Η διαδικασία της διήθησης πραγματοποιείται στον σπειραματικό φραγμό, ο οποίος αποτελείται από εξειδικευμένα θυριδωτά ενδοθηλιακά κύτταρα, τη βασική σπειραματική μεμβράνη (basic glomerular membrane, GBM) και τα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος (ποδοκύτταρα), τα οποία επενδύουν τη βασική σπειραματική μεμβράνη μέσω των ποδοκυτταρικών προεκτάσεών τους που ονομάζονται ποδίσκοι (**Εικόνα 1**) (Smoyer and Mundel 1998). Γειτονικοί ποδίσκοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω δικτύων εξειδικευμένων διακυτταρικών συνδέσεων, γνωστών ως θυριδωτά διαφράγματα (slit diaphragm, SD). Επιπρόσθετα, η βασική σπειραματική μεμβράνη διαθέτει αρνητικά φορτισμένα μόρια πρωτεογλυκανών, με αποτέλεσμα όσα αρνητικά μόρια επιχειρούν να περάσουν από το φραγμό διηθήσεως του σπειράματος να περιορίζονται σε σχέση με τα θετικά φορτισμένα

μόρια (White, Glasgow et al. 1970). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μόρια μεγέθους μεγαλύτερου από 42 Å σε διάμετρο ή 200 kDa δεν μπορούν να περάσουν από το φραγμό (Brenner, Hostetter et al. 1978).

Ο περιορισμός αυτός εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την δομική ακεραιότητα των ποδοκυτταρικών προσεκβολών και κατ' επέκταση από το SD καθώς και το φορτίο της βασικής σπειραματικής μεμβράνης. Στο νεφρωσικό σύνδρομο χάνεται το αρνητικό φορτίο της μεμβράνης (Carrie, Salyer et al. 1981; van den Born, van den Heuvel et al. 1992; Kitano, Yoshikawa et al. 1993). Άλλες μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στα ποδοκύτταρα είναι η διόγκωσή τους, η επανάταξη και η απαλοιφή των ποδίσκων, ο σχηματισμός των κενοτόπιων, η απόφραξη των κυτταρικών συνδέσεων, η μετατόπιση των θυριδωτών διαφραγμάτων και η αποκόλληση των ποδοκυττάρων από τη βασική σπειραματική μεμβράνη (ISKDC 1978; Nash 1992; Srivastava, Simon et al. 1999; Hogg, Portman et al. 2000).

Εικόνα 1: Ηλεκτρονική μικρογραφία των συστατικών του σπειραματικού φραγμού διηθήσεως.



Υπό φυσιολογικές καταστάσεις το νερό του πλάσματος φιλτράρεται από το σπειραματικό τριχοειδή αυλό (αστερίσκος) μέσα από τη θυριδωτή ενδοθηλιακή κυτταρική σιβάδα (άκρο βέλος), στη συνέχεια κατά μήκος της βασικής σπειραματικής μεμβράνης και μέσα από το θυριδωτό διάφραγμα (μικρά βέλη) που γεφυρώνουν τους γειτονικούς ποδίσκους (μεγάλα βέλη) και τελικά στον ουροποιητικό χώρο (αστερίσκος) όπου εισέρχεται στη κοιλότητα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Οι ποδίσκοι έχουν συνήθως μεγάλο μήκος και με ίσες αποστάσεις κατά μήκος της βασικής σπειραματικής μεμβράνης. Στο NS, απλώνονται στη GBM, με ακραία μετατόπιση των SD. Το στρώμα των αρνητικά φορισμένων γλυκανών φαίνεται στην εικόνα ως θωλή επικάλυψη της κορυφιαίας επιφάνειας των ποδίσκων. (Smoyer WE, Mundel P: Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med* (1998) 76(3-4):172-183) (Smoyer and Mundel 1998)

Ο ρόλος της δομής των ποδοκυττάρων και του SD στη παθογένεια του NS ενισχύεται ιδιαίτερα μετά από πρόσφατες παρατηρήσεις σε ανθρώπους αλλά και πειραματικά μοντέλα ότι μεταλλάξεις γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για μερικές από τις βασικότερες πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες του SD είναι υπεύθυνες για τη πρόκληση SRNS και/ή FSGS (Lenkkeri, Mannikko et al. 1999; Shih, Li et al. 1999; Boute, Gribouval et al. 2000; Kaplan, Kim et al. 2000; Ruf, Schultheiss et al. 2004; Winn, Conlon et al. 2005; Mucha, Ozaltin et al. 2006). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών περιγράφονται παρακάτω.

1.3.2 Κυκλοποιητικοί παράγοντες

Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν την ύπαρξη διαλυτών παραγόντων που είναι δυνατό να αλλάξουν τη διαπερατότητα του

τριχοειδούς τοιχώματος στο νεφρωσικό σύνδρομο (Shalhoub 1974; Carrie, Salyer et al. 1981; Kemper, Wolf et al. 2001; Meyrier 2005). Αυτά περιλαμβάνουν: (1) Ανάπτυξη νεφρωσικού συνδρόμου σε νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες οι οποίες έπασχαν από NS οι οποίες προφανώς μετέφεραν έναν διαλυτό παράγοντα στο έμβρυο στη μήτρα, (Kemper, Wolf et al. 2001) (2) Μείωση της πρωτεΐνουρίας μετά από θεραπεία με ανοσοαπορρόφηση πρωτεΐνης A σε διάφορους τύπους πρωτογενούς NS, (Sasdelli, Cagnoli et al. 1981), 3) Επανεμφάνιση FSGS σε μόσχευμα νεφρού ασθενούς με πρωτογενές FSGS, με ύφεση της επανεμφανιζόμενης ασθένειας μετά από θεραπεία με ανοσοαπορρόφηση πρωτεΐνης A ίσως επειδή αφαιρέθηκαν οι κυκλοποιητικοί παράγοντες, (Dantal, Bigot et al. 1994), 4) Επαγωγή ενισχυμένης πειραματικής διαπερατότητας σε πειραματικά μοντέλα ζώων στα οποία έχει χορηγηθεί ορός ασθενών με επανεμφάνιση FSGS σε μεταμοσχευμένα νεφρά (Savin, Sharma et al. 1996). Επιπρόσθετα, αναστολές της πειραματικής διαπερατότητας έχουν απομονωθεί από τον ορό παιδιών με FSGS και έχουν αναγνωρισθεί ως συστατικά απολιποπρωτεϊνών, γεγονός που δείχνει πως η ύπαρξη μιας ανισορροπίας μεταξύ των παραγόντων διαπερατότητας του ορού και των αναστολέων διαπερατότητας μπορεί να παίζει ρόλο στη παθογένεια του FSGS (Candiano, Musante et al. 2001).

1.3.3 Ανοσολογικές ανωμαλίες

Η υπόθεση ότι το νεφρωσικό σύνδρομο μπορεί να οφείλεται σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έχει διατυπωθεί πριν από περίπου 30 χρόνια. Υπάρχουν πολλές αναφορές ανωμαλιών των χημικών και κυτταρικών ανοσοποιητικών αντιδράσεων κατά τη διάρκεια της υποτροπής του NS. Η θεωρία

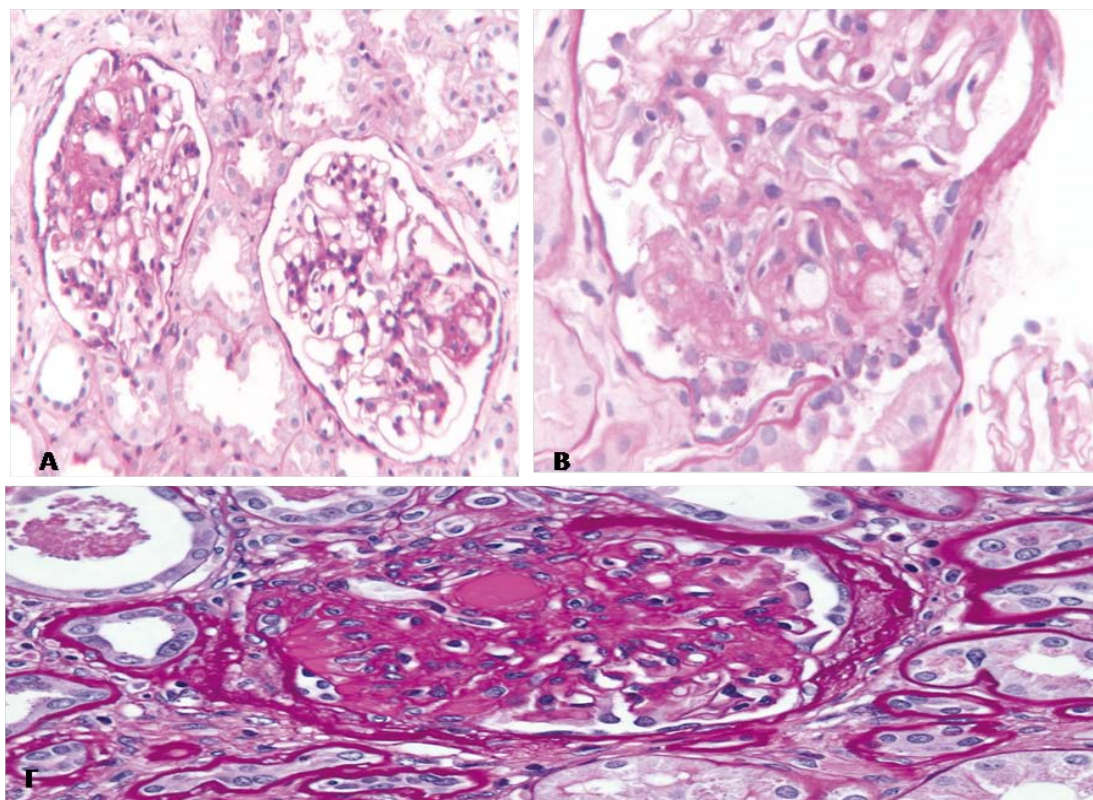
οτι το NS μπορεί να οφείλεται σε μη φυσιολογική ρύθμιση της λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τους Shalhoub και συνεργάτες (Shalhoub 1974). Στοιχεία για αυτή τη θεωρία περιλαμβάνουν: (1) Η ανταπόκριση των περισσότερων τύπων NS σε κορτικοστεροειδή, αλκαλικούς παράγοντες, αναστολείς καλσινευρίνης και του σκευάσματος «mycophenolate mofetil» που είναι γνωστοί αναστολείς της λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων, (2) Η επαγωγή της ύφεσης του NS μετά από λοίμωξη με ιλαρά, ελονοσία, και άλλες ασθένειες που είναι γνωστό οτι προκαλούν κατάπτωση του ανοσοποιητικού συστήματος, και (3) Η αναγνώριση NS με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων ως σύμπτωμα της νόσου Hodgkin's. Άλλες έρευνες προτείνουν ένα βασικό ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος στο NS κυρίως λόγω των αλλαγών των T κυττάρων σε υποτροπές NS και αυξημένα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων IL-2 των T κυττάρων (Topaloglu, Saatci et al. 1994; Yan, Nakahara et al. 1998).

1.4. Ιδιοπαθές Ανθεκτικό σε Στεροειδή Νεφρωσικό Σύνδρομο (SRNS)

1.4.1 Ιστολογία SRNS

Επειδή το νεφρωσικό σύνδρομο αποτελεί μια κλινική περιγραφή, η συχνότητα εμφάνισης διαφορετικών ιστομορφολογικών ευρημάτων στο SRNS αναμένεται να ποικίλει ανάλογα με την ηλικία, την περιοχή και τη φυλή των ασθενών. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με SRNS χαρακτηρίζεται από εστιακή και τμηματική σπειραματική σκλήρυνση στη βιοψία νεφρού (**Εικόνα 2**). Ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών παρουσιάζει νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων, ενώ υπάρχει η υπόθεση ότι αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε FSGS χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί μέχρι τις μέρες μας. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει λανθασμένη διάγνωση νόσου ελαχίστων αλλοιώσεων επειδή οι νεφροί με FSGS εμφανίζουν εμπλοκή μόνο μερικών σπειραμάτων κατά την αρχή της νόσου. Η πιθανότητα λανθασμένης διάγνωσης FSGS υπολογίζεται σε 35% όταν μόνο 10 σπειράματα εμπλέκονται και μειώνεται σε 12% όταν μελετώνται 20 σπειράματα.

Εικόνα 2: Ιστολογικά ευρήματα από βιοψίες νεφρού ασθενών με SRNS



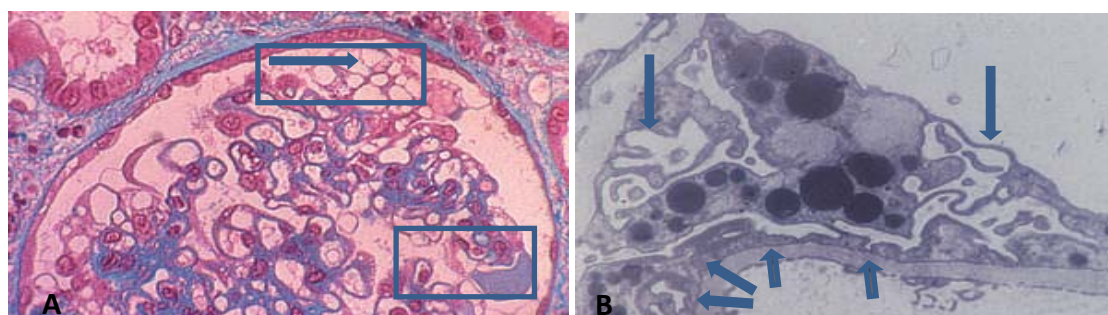
A: Ιστομορφολογία ασθενούς 9 ετών με FSGS τύπου NOS. Δύο σπειράματα με τμηματική σκλήρυνση. Το δεξιό σπείραμα εμφανίζει αφρώδη θεμέλια ουσία, ενώ το αριστερό πυκνή τμηματική σκλήρυνση (PAS, x200). **B:** Ιστομορφολογία ασθενούς 19 ετών με FSGS τύπου ακραίας αλλοίωσης (PAS, x400). **Γ:** Ιστομορφολογία αγοριού 12 ετών με σύνδρομο Denys-Drash και διάχυτη μεσαγγειακή σκλήρυνση (PAS, x400). Geary D and Schaefer F (eds). *Comprehensive Pediatric Nephrology*. Elsevier. Burlington 2008

Εστιακή και τμηματική σπειραματική σκλήρυνση ορίζεται η απώλεια της διατομής των τριχοειδών του σπειράματος λόγω της αύξησης του μεσαγγειακής θεμέλιας ουσίας (**Εικόνα 2**). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της πρωτογενούς (ιδιοπαθούς) FSGS είναι η διάχυτη απαλοιφή των ποδοκυτταρικών προσεκβολών, ποδίσκων. Σε δευτερεύουσες μορφές FSGS παρατηρείται απαλοιφή σε λιγότερο από περίπου 50% των ποδίσκων. Ιστολογικά, για να μπορεί μια νόσος να χαρακτηριστεί ως ιδιοπαθής FSGS, άλλοι παράγοντες ποδοκυτταρικής καταστροφής πρέπει να αποκλειστούν με μεθόδους ανοσοϊστολογίας και με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκόπιου.

Η ονοματολογία του ιδιοπαθούς FSGS προτάθηκε το 2003 από ομάδα νεφροπαθολόγων. Περιέχει τη περιγραφή 5 συγκεκριμένων τύπων εστιακής και τμηματικής σπειραματικής σκλήρυνσης οι οποίοι είναι: 1) καταρρέουσα, 2) κυτταρική, 3) κορυφαία, 4) περιχειλική και 5) FSGS που δεν ανήκει στις παραπάνω κατηγορίες (NOS) (Εικόνες 3, 4). Αυτή η κατηγοριοποίηση βασίστηκε στον έλεγχο ασθενών μεγαλύτερων των 21 ετών. Ο βαθμός της πρωτεϊνουρίας ήταν υψηλότερος στη καταρρέουσα μορφή, στη συνέχεια στην κορυφαία και αρκετά χαμηλότερος στους ασθενείς με περιχειλική και NOS FSGS. Δυστυχώς τέτοιες μελέτες δεν έχουν πραγματοποιηθεί σε παιδιατρικούς ασθενείς.

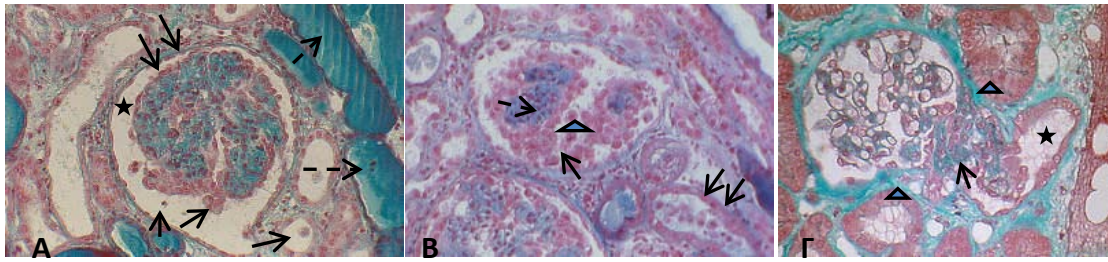
Ένα άλλο ιστολογικό εύρημα σε παιδιατρικούς ασθενείς με SRNS είναι η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα (membranous glomerulonephritis, MGN) η οποία εμφανίζεται σε εξαιρετικά μικρό ποσοστό και μπορεί να είναι ιδιοπαθής αλλά και δευτερεύουσα λόγω ηπατίτιδας Β (Εικόνα 5).

Εικόνα 3: Ιστομορφολογία βιοψίας νεφρού με κυτταρικού τύπου FSGS



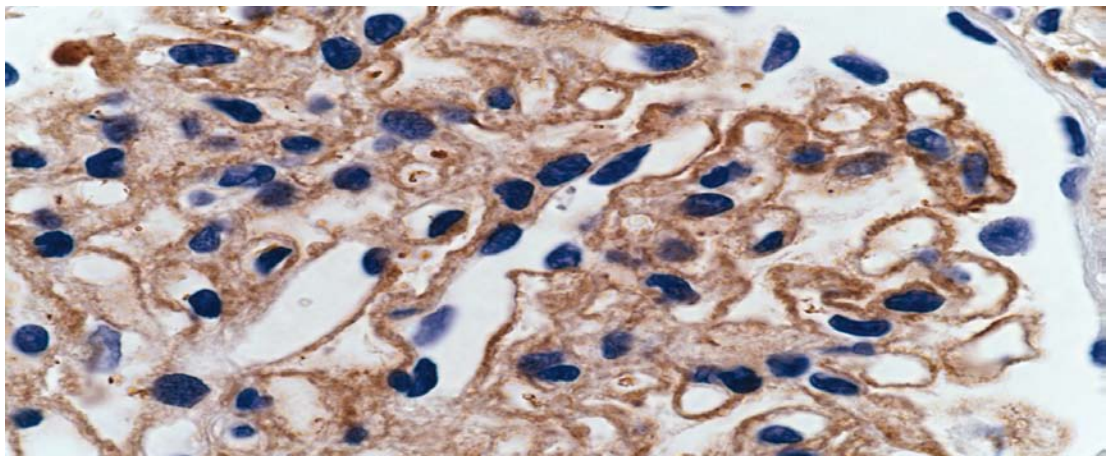
A: Οπτικό μικροσκόπιο. Τα ποδοκύτταρα μέσα στα ένθετα είναι διογκωμένα και δυσμορφικά, μερικά με μεγάλα κυτταροπλασματικά κενοτόπια (βέλος). Βαφή με Masson's trichrome (μεγέθυνση x650). **B:** Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Δυσμορφικά ποδοκύτταρα με πολλαπλά κυτταροπλασματικά κενοτόπια (βέλη). Τα βέλη κατά μήκος της βασικής σπειραματικής μεμβράνης αντιπροσωπεύουν την διαπλάτυνση των ποδοκυτταρικών προσεκβολών και την συγχώνευσή τους (μεγέθυνση περίπου x25.000). Alain Meyrier. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005 (1); 1:44-53.

Εικόνα 4: Άλλοι τύποι FSGS



A: Κυτταρικός τύπος FSGS. Πράσινη βαφή-Η σπειραματική συστάδα περιέχει περίσσεια κυτταρικής θεμέλιας ουσίας. Περικλείεται από ποδοκύτταρα σε σχήμα βότσαλου τα οποία καλύπτουν τον «βόρειο» πόλο (διπλό βέλος). Τα μικρότερα βέλη δείχνουν μεγάλα, στρογγυλεμένα κύτταρα στον νοτιότερο πόλο. Κάποια είναι ελεύθερα στη κάψα του Bowman (αστερίσκος). Τα κύτταρα αυτά τα οποία είναι συνήθως πολυπύρηνια, είναι αποκολλημένα ποδοκύτταρα που παρασύρονται στη σωληνοειδή κοιλότητα (μικρό βέλος, κάτω δεξιά). Διεσταλμένα νεφρικά σωληνάρια τα οποία περιέχουν μεγάλα πρωτεϊνικά απορρίματα (διακεκομμένα βέλη). Βαφή με Masson's trichrome (μεγέθυνση x500). **B: Καταρρέουσα σπειραματοπάθεια.** Το σπείραμα είναι πολύ μικρότερο από το φυσιολογικό του μέγεθος και ολιγοκυτταρικό (διακεκομμένα βέλη). Περιβάλλεται από δυσμορφικά ποδοκύτταρα που σχηματίζουν έναν ψευδοφλοιό (μόνο βέλος). Μερικά ποδοκύτταρα βρίσκονται ελεύθερα στη κάψα του Bowman (τρίγωνο). Το διπλό βέλος δείχνει ένα σωληνάριο με διευρυμένο επιθήλιο και περιέχει πολλά μεγάλα, στρογγυλά ποδοκύτταρα τα οποία έχουν αποσπαστεί από το σπείραμα και παρασύρονται κατά μήκος της σωληνοειδούς κοιλότητας. Βαφή με Masson's trichrome (μεγέθυνση x550). **Γ: Κορυφαίος τύπος FSGS.** Η άκρη ενός σπειραματικού λοβιδίου (βέλος) με βαφή Masson's trichrome. Η άκρη του σπειράματος εισέρχεται στον εξωτερικό χώρο της κάψας του Bowman, και προεξέχει στο σημείο έκφυσης του εγγύς εσπειραμένου σωληνάριου (αστερίσκος). Μεγέθυνση x750. Alain Meyrier. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005 (1); 1:44-53.

Εικόνα 5: Ιστομορφολογία ασθενούς 16 ετών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα. Πολλαπλά αποθέματα IgG (καφέ χρώμα) κατά μήκος της βασικής σπειραματικής μεμβράνης (ανοσοπεροξιδάση, μεγέθυνση x600).



Geary D and Schaefer F (eds). Comprehensive Pediatric Nephrology. Elsevier. Burlington 2008

1.4.2 Παθολογία SRNS

Σε κυτταρικό επίπεδο η παθολογία του SRNS οφείλεται στη δυσλειτουργία του ποδοκυττάρου, η δομή και η οργάνωση του οποίου περιγράφονται στο κεφάλαιο αυτό προκειμένου να γίνει κατανοητός ο τρόπος που οι διάφοροι γενετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την αρχιτεκτονική ακεραιότητα και δομική λειτουργία του ποδοκυττάρου.

1.4.2.1 Το ποδοκύτταρο

Όπως έχει αναφερθεί, τα ποδοκύτταρα είναι εξειδικευμένα και διαφοροποιημένα κύτταρα που εντοπίζονται προσκολλημένα στην εξωτερική επιφάνεια της βασικής σπειραματικής μεμβράνης των νεφρώνων την οποία και συνθέτουν (Kriz, Hackenthal et al. 1994). Έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν πολλαπλές ποδοκυτταρικές προσεκβολές οι οποίες ονομάζονται ποδίσκοι (Foot Processes, FPs). Παρακείμενοι ποδίσκοι αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν με τη σειρά τους το SD (Pavenstadt, Kriz et al. 2003; Marshall and Shankland 2006). Μία από τις βασικές λειτουργίες των ποδοκυττάρων είναι να προσφέρουν μηχανική υποστήριξη στη δομή της βασικής μεμβράνης και να απορροφούν τις υδροστατικές πιέσεις που δέχεται αυτή καθώς και το θυριδωτό διάφραγμα, ενώ αποτελούν το τελικό σημείο διήθησης στους νεφρώνες.

Τα ποδοκύτταρα είναι ηλεκτρικά φορτισμένα, οπότε το κορυφαίο και το βασικό τμήμα της μεμβράνης μπορούν να διαχωρισθούν. Η κορυφαία μεμβράνη καλύπτεται από αρνητικά φορτισμένες σιαλογλυκοπρωτεΐνες (sialoglycoproteins) όπως η ποδοκαλυξίνη (podocalyxin), η ποδοπλανίνη (podoplanin), η ποδοενδίνη (podoendin) και το SGP115/107 (Pavenstadt, Kriz et al. 2003).

Η ποδοκαλυξίνη είναι η βασική σιαλοπρωτεΐνη του ποδοκυττάρου και βρίσκεται στην επιφάνεια του σώματος του ποδοκυττάρου και στο κορμό του πάνω από το σημείο που δημιουργείται το θυριδωτό διάφραγμα. Πρόκειται για τύπου I διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 4 πιθανά σημεία N-γλυκοσυλήωσης και πολυάριθμα σημεία O-γλυκοσυλήωσης. Το ενδοκυτταρικό τμήμα της είναι προσκολλημένο στον κυτταρικό σκελετό ακτινίνης μέσω της εζρίνης (ezrin). Η σύνδεση εζρίνη-ποδοκαλυξίνη σταθεροποιείται με μια άλλη πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται **Na⁺/H⁺ exchanger factor 2** (NHERF 2). Ο NHERF 2 αποτελείται από δύο PDZ (postsynaptic density 95/discs large/zonula occludens-1-adaptor protein) τμήματα και μια ERM (ezrin-radixin-moesin) περιοχή σύνδεσης. Η ποδοκαλυξίνη, η εζρίνη και ο παράγοντας NHERF 2 σχηματίζουν ένα πολυμερικό σύμπλοκο που αλληλεπιδρά με το κυτταρικό σκελετό ακτινίνης (Schmieder, Nagai et al. 2004). Τα σύμπλοκα ποδοκαλυξίνης-εζρίνης δεν επηρεάζονται από τον απο-πολυμερισμό της ακτινίνης και την απενεργοποίηση της Rho κινάσης (βασικός ρυθμιστής λειτουργίας της ακτινίνης). Για αυτό το λόγο τα σύμπλοκα αυτά βοηθούν στη διατήρηση της μορφολογίας του ποδοκυττάρου (Orlando, Takeda et al. 2001).

Τα ποδοκύτταρα έχουν έναν πολύ καλά σχηματισμένο κυτταρικό σκελετό. Στο κυτταρικό τους σώμα επικρατούν μικροσωληνίσκοι και ενδιάμεσα νημάτια (βιμεντίνη, δεσμίνη- vimentin, desmin), ενώ στις ποδοκυτταρικές προσεκβολές συναντώνται κυρίως μικροσωληνίσκοι που περιέχουν ακτινίνη, μυσίνη και α-ακτινίνη (Kriz, Elger et al. 1995). Η αρχιτεκτονική δομή του ποδοκυττάρου εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη παρουσία του κυτταρικού σκελετού. Οι ποδοκυτταρικές προσεκβολές περιέχουν ένα σύστημα σύσπασης βασιζόμενο στους

μικροσωληνίσκους που περιέχει ακτινίνη, μυοσίνη, α-ακτινίνη, ταλίνη, παξιλίνη και βινκουλίνη αγκιστρωμένη στη βασική σπειραματική μεμβράνη μέσω της $\alpha 3\beta 1$ -ιντεγκρίνης.

Τόσο ο σχηματισμός των νηματιδίων ακτινίνης όσο και η οργάνωση των μικροσωληνίσκων εξαρτώνται από τις μικρές G πρωτεΐνες της οικογένειας των Rho πρωτεϊνών (Rho family small G-proteins) (Rodriguez, Schaefer et al. 2003). Οι πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια όπως είναι η Rho, Rac και Cdc42 θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού σκελετού και στην μορφολογία του ποδοκυττάρου.

1.4.2.2 Ποδοκυτταρικές προσεκβολές, ποδίσκοι

Τα νηματίδια ακτινίνης αποτελούν το βασικό συστατικό των ποδίσκων. Παρόλο που τα ποδοκύτταρα προέρχονται από τυπικά μονόστοιβα επιθήλια κατά το πρώιμο στάδιο της σπειραματογένεσης (Kreidberg 2003), τα ώριμα ποδοκύτταρα δεν διαθέτουν ενδοκυτταρικά σύμπλοκα σύνδεσης όπως ισχυρές συνδέσεις (στενοσυνδέσεις), διακλαδώσεις πρόσδεσης και δεσμοσώματα (Usui, Kurihara et al. 2003).

Η διαφοροποίηση των ποδοκυττάρων ξεκινάει από το πρώιμο στάδιο του σχηματισμού του σπειράματος, σώμα τύπου S. Οι ποδίσκοι σχηματίζονται, ενώ οι ισχυρές συνδέσεις μεταξύ των ποδοκυττάρων δίνουν τη θέση τους στο θυριδωτό διάφραγμα, το οποίο αποτελεί το τελικό στάδιο της διήθησης του σπειραματικού υγρού. Η ηλεκτροστατική απώθηση, ως αποτέλεσμα της παρουσίας σιαλυμένων πρωτεϊνών, είναι απαραίτητη για το άνοιγμα των ενδοκυτταρικών χώρων (Takeda,

Go et al. 2000). Είναι αποδεδειγμένο ότι παροχή σιαλυδάσης οδηγεί σε κατάρρευση των ποδοκυτταρικών προσεκβολών και του θυριδωτού διαφράγματος. Μεταλλάξεις κάποιων ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών όπως το WT1 και PLCE1 επίσης μπορούν να οδηγήσουν σε διαταραγμένη διαφοροποίηση των ποδοκυττάρων.

Το θυριδωτό διάφραγμα προέρχεται από ισχυρές συνδέσεις στα προ-ποδοκύτταρα (pre-podocytes). Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του σπειράματος, αυτά τα σύμπλοκα συνδέσεων μεταναστεύουν από τη κορυφαία επιφάνεια προς τη βασική. Η εμφάνιση της νεφρίνης σχετίζεται με την ανάπτυξη των ποδίσκων και την παράλληλη εμφάνιση της πρωτεΐνης CD2AP (CD2-associated protein) και άλλων πρωτεϊνών του θυριδωτού διαφράγματος. Η ωρίμανση των ποδίσκων προϋποθέτει το πολυμερισμό των μικρονηματιδίων αντινίνης και την σύνδεσή τους με τη νεφρίνη και με άλλες πρωτεΐνες του θυριδωτού διαφράγματος (Tryggvason, Patrakka et al. 2006).

Η νεφρωσική πρωτεϊνουρία συνήθως συνοδεύεται τόσο σε παθολογικές καταστάσεις όσο και στο πειραματικό νεφρωσικό σύνδρομο με τραυματισμό του θυριδωτού διαφράγματος (*vide infra*) και απαλοιφή των ποδοκυτταρικών προσεκβολών. Η καταστροφή των ποδίσκων σχετίζεται με ενισχυμένη, γενική, μη-ειδική προσκόλληση γειτονικών ποδίσκων και εξάλειψη του εξαιρετικά οργανωμένου θυριδωτού διαφράγματος με ακόλουθη απαλοιφή ειδικών μονοπατιών μεταβίβασης σήματος και μείωση της προσκόλλησης του ποδοκυττάρου με τη βασική σπειραματική μεμβράνη. Η απαλοιφή των ποδίσκων είναι μια δυναμική λειτουργία που ελέγχεται από τη σήμανση της νεφρίνης (*vide infra*) και συνοδεύεται από το πολυμερισμό της (Moeller 2007). Η αξία του

κυτταρικού σκελετού για την ακεραιότητα των ποδοκυττάρων μπορεί να γίνει αντιληπτή από την ένωση των ποδοκυττάρων μετά από χορήγηση κυτταροχαλασίνης (Andrews 1981). Η απαλοιφή των ποδίσκων συνοδεύεται από την αναδιοργάνωση των νηματιδίων ακτινίνης σε παχιά συσσωματώματα όμοια με σωληνίσκους (Shirato, Sakai et al. 1996).

Η απαλοιφή των ποδίσκων που προκαλείται από το τραυματισμό των ποδοκυττάρων εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κατεψίνης L (Reiser, Oh et al. 2004). Η πυρομυκίνη αμινονουκλεοσιδάση (pyromycin aminonucleosidase, PA) ρυθμίζει την έκφραση και λειτουργία της κατεψίνης L στα ποδοκύτταρα *in vitro*. Η ενεργοποίηση της κατεψίνης L κατά πάσα πιθανότητα πραγματοποιείται μέσω της απενεργοποίησης της ιντεγρίνης $\alpha 3$.

Μέχρι πρόσφατα ήταν κοινώς αποδεκτό ότι η απαλοιφή των ποδίσκων είναι απαραίτητο κριτήριο για την εμφάνιση οξείας πρωτεϊνουρίας και φυσικά δεν μπορεί να υπάρξει πρωτεϊνουρία χωρίς την εμπλοκή των ποδοκυτταρικών ποδίσκων και του θυριδωτού διαφράγματος (Kerjaschki 2001). Παρόλα αυτά, σε πειραματικά μοντέλα ποντικών έχουν αναπτυχθεί 3 μοντέλα πρωτεϊνουρικών σπειραματικών ασθενειών, χωρίς την εμφάνιση απαλοιφής των ποδίσκων, που επηρεάζουν και τα 3 στρώματα του σπειραματικού τοιχώματος: χορήγηση αντισωμάτων εναντίον του VEGF ή του VEGFR1 (VEGF receptor, FLT-1 endothelial cells), ποντίκια με έλλειψη της $\alpha 3$ αλυσίδας κολλαγόνου τύπου IV (βασική σπειραματική μεμβράνη) και ποντίκια με γενετική διαγραφή της νεφρίνης (ποδοκύτταρα). Τα ιστολογικά ευρήματα επιβεβαιώνουν ότι η πρωτεϊνουρία μπορεί και να μην συνοδεύεται από την απαλοιφή των ποδίσκων στην σπειραματική ενδοθηλίωση στην πριεκλαμψία καθώς

και σε ορισμένους ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων (Karumanchi, Maynard et al. 2005; Farquhar 2006). Επιπρόσθετα, η απαλοιφή των ποδίσκων δεν είναι αναλογική του βαθμού της πρωτεϊνουρίας (van den Berg, van den Bergh Weerman et al. 2004).

Αν και αυτές οι μελέτες δεν εξαιρούν μια δυσλειτουργία του θυριδωτού διαφράγματος ως τη βασική αιτία της πρωτεϊνουρίας στις πειραματικές νόσους με πρωτογενή εμπλοκή του ενδοθηλίου (ποδοκύτταρα) ή της βασικής πειραματικής μεμβράνης, ωστόσο υποδεικνύουν ότι η πρωτεϊνουρία μπορεί να εμφανιστεί χωρίς μορφολογικές αλλαγές στα ποδοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των απαλοιφών των ποδίσκων. Σημαντικός τραυματισμός σε καθένα από τα 3 βασικά συστατικά της μεμβράνης διήθησης μπορεί να οδηγήσει σε πρωτεϊνουρία χωρίς την εμφάνιση απαλοιφής των ποδίσκων.

1.4.2.3 Το θυριδωτό διάφραγμα

Η βασική πειραματική μεμβράνη περιορίζει τη διήθηση μεγάλων, ηλεκτρικά ουδέτερων, και μικρότερων αρνητικά φορτισμένων μορίων. Παρόλα αυτά το θυριδωτό διάφραγμα αποτελεί κατά πάσα πιθανότητα το τελικό και πιο σημαντικό σημείο διήθησης που εμποδίζει το πέρασμα ουσιών όπως η αλβουμίνη στο πειραματικό διήθημα. Το πλάτος του είναι περίπου 40 nm. Όταν αυξάνεται η πίεση στο εσωτερικό του σπειράματος, το πλάτος του θυριδωτού διαφράγματος μπορεί να αυξηθεί (Yu, Leng et al. 1997). Πριν από 30 περίπου χρόνια προτάθηκε για πρώτη φορά η δομή του θυριδωτού διαφράγματος ως ένας σχηματισμός που μοιάζει με ραφή και αποτελείται από πόρους μεγέθους 4x14 nm λίγο μικρότερους

δηλαδή από το μέγεθος της αλβουμίνης (Rodewald and Karnovsky 1974). Στο σχηματισμό του SD συμμετέχουν πολλές διαφορετικές και βασικές πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη γενικότερη λειτουργία του ποδοκυττάρου τόσο δομικά όσο και στη κυτταρική μεταβίβαση σημάτων.

Η πρωτεΐνη ZO-1

Στο σημείο όπου ξεκινάει το θυριδωτό διάφραγμα, στη κυτταροπλασματική επιφάνεια της βάσης των ποδίσκων, υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις μιας ειδικής ισομορφής της πρωτεΐνης **zonula occludens-1 (ZO-1)** (Kurihara, Anderson et al. 1992). Η ZO-1 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 225 kDa που σχετίζεται με τη κυτταρική μεμβράνη. Ανήκει στη πρωτεϊνική οικογένεια των σχετιζομένων με τη μεμβράνη (**membrane-associated guanylate kinase, MAGUK**) γουανυλιομένων κινάσεων πρωτεϊνών και αποτελείται από 3 PDZ τόπους που επιδρούν με μικρές πεπτιδικές αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Απαντάται σε μεγάλη συγκέντρωση στο SD και έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τμήματα των συνδέσεων μεταξύ κυττάρων όπως οι πρωτεΐνες οκλουδίνη, κατενίνη α και ZO-2, καθώς και με δίκτυα κυτταρικών σκελετών όπως οι πρωτεΐνες σπεκτρίνη και ακτίνη F (Mitic and Anderson 1998). Στον άνθρωπο, η ZO-1 εκφράζεται για πρώτη φορά στο στάδιο των σωμάτων σχήματος S ταυτόχρονα με τη πρωτεΐνη νεφρίνη.

Η πρωτεΐνη Νεφρίνη

Το 1988 περιγράφηκε η μοριακή δομή του θυριδωτού διαφράγματος. Οι Orikasa και συνεργάτες απομόνωσαν το μονόκλωνο αντίσωμα 5-1-6 το οποίο αντιδρούσε με τα σπειράματα και προκαλούσε οξεία πρωτεϊνουρία σε μοντέλα ποντικών (Orikasa, Matsui et al. 1988). Το μονόκλωνο αντίσωμα αντιδρούσε με πρωτεΐνη μοριακού βάρους 51 kDa η οποία εντοπιζόταν αποκλειστικά στο θυριδωτό διάφραγμα (Kawachi, Abrahamson et al. 1995; Torham, Kawachi et al. 1999). Ο χαρακτηρισμός αυτής της βασικής πρωτεΐνης του θυριδωτού διαφράγματος που ονομάζεται νεφρίνη ολοκληρώθηκε με τη χαρτογράφηση του κωδικοποιούντος γονιδίου NPHS1 (**MIM:** 602716, **GeneID:** 4868), μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν σε συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο Φιλανδικού τύπου (Tryggvason 1999; Tryggvason, Ruotsalainen et al. 1999).

Η νεφρίνη ανήκει στην πρωτεϊνική οικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Αποτελείται από ένα ενδοκυτταρικό τμήμα, 8 εξωκυτταρικά τμήματα που μοιάζουν με τις ανοσοσφαιρίνες, και ένα εξωκυτταρικό τμήμα όμοιο με τη ινονεκτίνη τύπου III (fibronectin type III). Το ενδοκυτταρικό τμήμα της νεφρίνης αποτελείται από 9 κλάσματα που μπορούν να φωσφορυλιωθούν. Οι περιοχές των ανοσοσφαιρινών είναι τύπου C2 που απαντάται σε ενεργείς πρωτεΐνες των διακυτταρικών προσφύσεων.

Απενεργοποίηση του γονιδίου της νεφρίνης σε πειραματικά μοντέλα ποντικών προκαλεί οξεία πρωτεϊνουρία, εξάλειψη του θυριδωτού διαφράγματος και νεογνικό θάνατο (**πίνακας 1**).

Η νεφρίνη εντοπίζεται αποκλειστικά στα ποδοκύτταρα. Δύο μόρια νεφρίνης από δύο γειτονικές ποδοκυτταρικές προσεκβολές προεξέχουν από το ποδοκύτταρο και παράλληλα με τη βασική σπειραματική μεμβράνη ενώνονται με ομοφιλικό δεσμό σχηματίζοντας μια δομή που μοιάζει με ραφή (Rodewald and Karnovsky 1974). Σε αυτή τη δομή, το κεντρικό ινίδιο σχηματίζεται από έξι αμινοτελικά τμήματα της νεφρίνης όμοια με τις ανοσοσφαιρίνες τα οποία αλληλεπιδρούν με αντίστοιχα αμινοτελικά τμήματα του μορίου της νεφρίνης της διπλανής ποδοκυτταρικής προσεκβολής. Κατ' αυτό το τρόπο η δομή των 2 μορίων νεφρίνης φαίνεται να εκτείνεται περίπου όσο και το μήκος του θυριδωτού διαφράγματος (35-45 nm). Οι προτεινόμενοι πόροι του SD θα μπορούσαν να ανταποκρίνονται στο χώρο μεταξύ δύο γειτονικών μορίων νεφρίνης. Στη συγγενή απώλεια της νεφρίνης (όπως στο συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο φιλανδικού τύπου με μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS1) το SD δεν σχηματίζεται. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε οξεία πρωτεϊνουρία (Putala, Soinen et al. 2001). Πράγματι οι κυματοειδείς αλυσίδες νεφρίνης που προεξέχουν από τις παρακείμενες ποδοκυτταρικές προσεκβολές συνδέονται μεταξύ τους στο κέντρο του SD με κενά (ανταποκρινόμενοι στους προτεινόμενους πόρους) μεταξύ τους (Wartiovaara, Ofverstedt et al. 2004). Οι αλυσίδες αυτές δεν εντοπίζονται στους ασθενείς με συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο.

Οι πρωτεΐνες Neph

Οι Neph1, Neph2 και Neph3 πρωτεΐνες είναι δομικά όμοιες με τη νεφρίνη, με τη διαφορά ότι περιέχουν μόνο 5 εξωκυτταρικές περιοχές όμοιες με τις ανοσοσφαιρίνες και απαντώνται σε αρκετούς ιστούς. Οι Neph1 και Neph2 βρίσκονται και στο θυριδωτό διάφραγμα (Donoviel, Freed et al. 2001). Τα εξωκυτταρικά τους

τμήματα σχηματίζουν ομοδιμερή και έχουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με το εξωκυτταρικό τμήμα της νεφρίνης.

Στα ποντίκια η πρωτεΐνη Neph1 βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στα έμβρυα παρά στα ενήλικα, ενώ υψηλή έκφραση της Neph2 συναντάται στα ενήλικα ποντίκια. Ανοσοενεργή Neph2 απαντάται στα ούρα υγιών ατόμων, ενώ αυξάνεται σε πρωτεϊνουρικούς ασθενείς με μεμβρανώδη νεφρίτιδα. Πειραματικά μοντέλα ποντικών χωρίς τη πρωτεΐνη Neph1 εμφανίζουν οξεία πρωτεϊνουρία και πεθαίνουν στις πρώτες 8 εβδομάδες ζωής (Donoviel, Freed et al. 2001). Ωστόσο, η λειτουργική αξία των Neph2 και Neph3 παραμένει άγνωστη.

Η πρωτεΐνη CD2AP

Τα ενδοκυτταρικά τμήματα των Neph1 και νεφρίνης αλληλεπιδρούν με τις ποδοκυτταρικές πρωτεΐνες ποδοκίνη, ZO-1 και CD2AP. Η πρωτεΐνη CD2AP βρίσκεται στο θυριδωτό διάφραγμα και πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση της νεφρίνης και στην ανακύκλωσή της, παρόμοια με τον υποδοχέα T-λεμφοκυττάρων στα T-λεμφοκύτταρα (Dustin, Olszowy et al. 1998). Η CD2AP πρωτεΐνη συνδέεται μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της με το αντίστοιχο άκρο της νεφρίνης, με αποτέλεσμα την τελική συνδεση της τελευταίας με το κυτταρικό σκελετό ακτινίνης του ποδοκυττάρου. Πειραματικά μοντέλα ποντικών τα οποία δεν παράγουν τη CD2AP εμφανίζουν πρωτεϊνουρία και πεθαίνουν μερικές εβδομάδες μετά τη γέννηση (Shih, Li et al. 1999). Τα ποντίκια αυτά εμφανίζονται υγιή κατά τη γέννηση, όμως παρουσιάζουν ταχείας εξέλιξης νεφρωσικό σύνδρομο στις 3 εβδομάδες ζωής λόγω υπολειτουργίας της διαδικασίας της μεταβίβασης σημάτων

μέσα στο ποδοκύτταρο και καταστροφή των ποδοκυττάρων. Η CD2AP πρωτεΐνη έχει υψηλή έκφραση στα ποδοκύτταρα και πιστεύεται ότι παίζει βασικό ρόλο στην δομική ακεραιότητα του SD καθώς και στην σύνδεσή του με το κυτταρικό σκελετό ακτινίνης μέσω της πρωτεΐνης WASP (Wiscott-Aldrich syndrome protein), του πρωτεϊνικού συμπλόκου ARP2/3 (actin related protein), της πρωτεΐνης CAPZ (actin carrying protein), της κορτακτίνης και όλων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην συναρμολόγηση των νηματιδίων ακτινίνης.

Η Neph1 σχηματίζει έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με τη νεφρίνη και τη ποδοκίνη (*vide infra*). Το σύμπλοκο νεφρίνη/Neph1/ποδοκίνη, είναι εξαιρετικά σημαντικό όχι μόνο για τον σχηματισμό των ενώσεων μεταξύ των παρακείμενων ποδοκυτταρικών προσεκβολών αλλά και για τη συντήρηση της δομής του SD και τη διαδικασία της σπειραματικής διηθήσεως.

Η πρωτεΐνη Ποδοκίνη

Η ποδοκίνη ανήκει στην οικογένεια των «raft-associated» πρωτεϊνών, έχει μέγεθος 42 kDa, κωδικοποιείται από το γονίδιο NPHS2 και πρόκειται για μια βασική πρωτεΐνη του ποδοκυττάρου. Μεταλλάξεις του γονιδίου της ποδοκίνης οδηγούν σε ανθεκτικό σε στεροειδή NS. Η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται στο χώρο σε σχήμα φουρκέτας, αποτελείται δηλαδή από ένα διαμεμβρανικό τμήμα έχοντας το καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο της μέσα στο κυτταρόπλασμα, μια δομή η οποία είναι χαρακτηριστική για τις στοματίνες και τις καλβεολίνες (Boute, Gribouval et al. 2000). Η ποδοκίνη εκφράζεται αποκλειστικά στα ποδοκύτταρα και μόνο στη βάση του SD στο σημείο όπου η νεφρίνη εξέρχεται από το ποδίσκο. Η ποδοκίνη έχει

διπλή λειτουργία. Από τη μία διατηρεί σταθερή τη νεφρίνη στο σημείο σχηματισμού του SD και παράλληλα συμμετέχει στη μεταβίβαση σημάτων από τον εξωκυττάριο χώρο του ποδοκυττάρου στο εσωτερικό για την ρύθμιση αρκετών βασικών λειτουργιών του. Απουσία της ποδοκίνης όπως σε περιπτώσεις ανθεκτικού σε στεροειδή νεφρωσικού συνδρόμου και εστιακής και τμηματικής σπειραματικής σκλήρυνσης οδηγεί σε απαλοιφή των ποδίσκων, καταστροφή του SD και οξεία πρωτεϊνουρία.

Η ποδοκίνη συνδέεται με εξειδικευμένα συσσωματώματα που ονομάζονται σχεδίες λιπιδίων τα οποία είναι εμπλουτισμένα με χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια. Αυτά τα εξαιρετικά ειδικά τμήματα λειτουργούν ως πλατφόρμες σύνδεσης για τα διαμεμβρανικά σύμπλοκα μεταφοράς σημάτων στο κύτταρο (Schwarz, Simons et al. 2001; Harder 2004) Οι σχεδίες λιπιδίων βοηθούν στην ομαδοποίηση των σχετικών διαμεμβρανικών και συσχετιζόμενων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και αυξάνουν τη σήμανσή τους. Η ποδοκίνη αλληλεπιδρά με το ενδοκυτταρικό τμήμα της νεφρίνης, της Neph1 και της CD2AP και στοχεύει άλλα μόρια που επικοινωνούν με τη νεφρίνη στις σχεδίες λιπιδίων. Πειραματικά μοντέλα ποντικών στα οποία δεν υπάρχει παραγωγή της ποδοκίνης εμφανίζουν ελαττωματικό σχηματισμό των ποδίσκων, πρωτεϊνουρία και πρόωρο θάνατο (Michaud and Kennedy 2007).

Οι πρωτεΐνες FAT

Δύο άλλες πρωτεΐνες του SD είναι 2 καντερίνες μεγάλου μοριακού βάρους, οι FAT1 και FAT2 (EIKONA 7, TESAR 2008]. Τα εξωκυτταρικά τμήματα των δύο αυτών

πρωτεϊνών σχηματίζουν το SD. Ποντίκια χωρίς την FAT1 πρωτεΐνη εμφανίζουν πρωτεϊνουρία και περιγεννητική θνησιμότητα με ιστολογικά ευρήματα που δείχνουν καταστροφή του SD και απαλοιφή των ποδίσκων (Michaud and Kennedy 2007).

1.4.2.4 Μεταβίβαση σημάτων στα ποδοκύτταρα

Μέχρι πρόσφατα οι πρωτεΐνες του SD θεωρούνταν ότι έπαιζαν ρόλο μόνο στη δομική ακεραιότητα του ποδοκυττάρου και στη διατήρηση του φίλτρου διηθήσεως στο SD (Benzing 2004). Ωστόσο νέες πληροφορίες φέρουν τις πρωτεΐνες του SD να συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταβίβασης σημάτων που είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία και ζωή των ποδοκυττάρων.

Αν και ακόμα δεν έχει αποδειχθεί, η ενεργοποίηση της νεφρίνης πιθανότατα ξεκινάει είτε με την ομοφυλική σύνδεση δύο μορίων νεφρίνης και/είτε με την ετεροφυλική σύνδεσή της με τις NEPH πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) της νεφρίνης και των NEPH πρωτεϊνών είναι απαραίτητα για την διατήρηση του SD και του κυτταρικού σκελετού ακτινίνης. Παρόλα αυτά, η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της νεφρίνης ενδέχεται να είναι σημαντική και για την σωστή αντίδραση των ποδοκυττάρων στο τραυματισμό (σύνθεση νέων μορίων νεφρίνης και αναδιοργάνωση της ακτινίνης).

Η μεταβίβαση σημάτων από τη νεφρίνη ξεκινάει με την ένωση των μορίων νεφρίνης μέσω της φωσφορυλίωσης αρκετών ενδοκυτταρικών μορίων τυροσίνης από την κινάση Fyn η οποία ανήκει στην οικογένεια κινάσεων Src και πιθανότατα

από τη κινάση Yes (Lahdenpera, Kilpelainen et al. 2003; Verma, Wharram et al. 2003).

Αν και η φωσφορυλίωση των μορίων τυροσίνης του ενδοκυτταρικού τμήματος της νεφρίνης φαίνεται να είναι αρκετά σημαντική, το τμήμα αυτό της νεφρίνης περιέχει και θέσεις σερίνης/θρεϊονίνης που μπορούν να φωσφορυλιωθούν από την πρωτεϊνική κινάση C και την κινάση casein II (Wang, Mene et al. 2001; Liu, Kilpelainen et al. 2005). Η γενετική διαγραφή της πρωτεΐνης κινάσης C σε μοντέλα ποντικών οδηγεί σε σπειραματική σκλήρυνση η οποία κατά πάσα πιθανότητα είναι εφικτή μέσω του παράγοντα TGFβ (transforming growth factor β) (Meier, Menne et al. 2007).

Η κινάση Fyn βρίσκεται στις σχεδίες λιπιδίων των ποδοκυττάρων, στις οποίες εντοπίζονται η νεφρίνη, η ποδοκίνη και η Neph1 πρωτεΐνη και αλληλεπιδρά με τη νεφρίνη μέσω των SH2 τμημάτων της. Στο σύνολό τους υπάρχουν 10 θέσεις τυροσινών στο μόριο της νεφρίνης, αρκετές από τις οποίες (Y1153, Y1154, Y1198, Y1208 και Y1225) φωσφορυλιώνονται από την Fyn πρωτεΐνη στα ποντίκια (Verma, Kovari et al. 2006). Η φωσφορυλίωση της νεφρίνης μπορεί να συμβεί είτε κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ποδοκυττάρων είτε ως αντίδραση στο τραυματισμό των ποδοκυττάρων και είναι πολύ πιθανό να μεσολαβεί το εξωκυτταρικό τμήμα της νεφρίνης.

Πειραματικά μοντέλα ποντικών που δεν εκφράζουν την κινάση Fyn εμφανίζουν πρωτεϊνουρία ποικίλου βαθμού καθώς και ανωμαλίες στην ανάπτυξη της κυτταρικής σύνδεσης στους ποδίσκους με απαλοιφή των ποδίσκων και μειωμένη φωσφορυλίωση της νεφρίνης (Yu, Yen et al. 2001; Verma, Wharram et al.

2003). Σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει διπλή έκφραση Fyn/Yes η πρωτεϊνουρία είναι περισσότερο έντονη [(Verma, Wharram et al. 2003). Η φωσφορυλίωση της νεφρίνης από τη Fyn κινάση (και/ή από τη Yes) επιτρέπει την σύνδεση διαφορετικών πρωτεϊνών με τη νεφρίνη με αποτέλεσμα τη μεταβίβαση του σήματος προς το εσωτερικό του κυττάρου.

Η φωσφορυλίωση του κυτταροπλασματικού τμήματος της νεφρίνης ρυθμίζει την σύνδεση της νεφρίνης με τη ποδοκίνη (Huber, Simons et al. 2003; Li, Lemay et al. 2004). Η ποδοκίνη με τη σειρά της δεν περιέχει κάποια περιοχή που να μπορεί να συνδεθεί με φωσφωτυροσίνες (περιοχή SH2, PTB). Για αυτό το λόγο μειωμένη σύνδεση της ποδοκίνης με τη νεφρίνη οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα σε αλλαγές της δομής της νεφρίνης στο χώρο ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσής της.

Μια άλλη πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της νεφρίνης είναι η β -arrestin 2 (Quack, Rump et al. 2006). Όταν η νεφρίνη δεν μπορεί να συνδεθεί ή να διατηρήσει τη σύνδεσή της με το εξωκυτταρικό τμήμα μιας γειτονικής νεφρίνης στο SD ή με μόρια Neph1/2, η ενδοκυτταρική σχέση νεφρίνης/ποδοκίνης μειώνεται ενώ αντίθετα αυξάνεται η ένωση νεφρίνης/ β -arrestin 2 με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρωση του συμπλόκου νεφρίνης/ β -arrestin 2 και μειωμένη μεταβίβαση σήματος από τη νεφρίνη. Κατά αυτό το τρόπο η νεφρίνη λειτουργεί ως αισθητήρας για την δομική ακεραιότητα του SD.

Τα φωσφορυλιωμένα μόρια νεφρίνης έχουν επιπρόσθετα την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την p85 υπομονάδα της κινάσης φωσφοϊνοσιδάση 3 (PI3K), ενεργοποιώντας την p110 υπομονάδα της PI3K. Η PI3K με τη σειρά της καταλύει τη μετατροπή της μεμβρανικής phosphatidylinositol-4,5-biphosphate σε

phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (Huber, Hartleben et al. 2003). Έτσι τα φωσφορυλιωμένα λιπίδια μπορούν να συνδεθούν από πρωτεΐνες σύνδεσης που διαθέτουν ομόλογα τμήματα πλεξίνης (pleckstrin-homology domains, PH) τα οποία ρυθμίζουν πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως η κυτταρική επιβίωση, η δυναμική του κυτταρικού σκελετού, ενδοκυττάρωση και μεταβολισμό του κυττάρου. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι και η Akt κινάση (σερίνη/θρεονίνη ειδική κινάση) η οποία ενεργοποιείται από τα φωσφολιπίδια που προκύπτουν από της αντίδραση του PI3K με αποτέλεσμα την αύξηση του ορίου ανοχής του ποδοκυτταρικού θανάτου που ελέγχεται από αποπτωτικά ερεθίσματα (Huber, Hartleben et al. 2003). Η p85 υπομονάδα του PI3K αλληλεπιδρά όχι μόνο με τη νεφρίνη αλλά και με τη πρωτεΐνη CD2AP (ενεργοποιείται και από την CD2AP).

Η CD2AP ενώνει τη νεφρίνη και τη ποδοκίνη με την PI3K ερεθίζοντας την Akt (Huber, Hartleben et al. 2003). Ένας από τους στόχους της φωσφορυλίωσης, λόγω του συμπλόκου νεφρίνη/CD2AP, είναι η πρωτεΐνη «Bad». Πρόκειται για μια προαποπτωτική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2. Η φωσφορυλίωση απενεργοποιεί τη Bad και απενεργοποιείται ο αποπτωτικός μηχανισμός. Γίνεται κατανοητό ότι μια από τις λειτουργίες του SD είναι η σωστή μεταβίβαση σήματος στα ποδοκύτταρα προκειμένου να μην επιτραπεί η απόπτωσή τους. Η δομική ακεραιότητα του SD είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ποδοκυττάρων. Δυσλειτουργία του μηχανισμού αυτού μπορεί να οδηγήσει σε ποδοκυτταροπενία και FSGS (Kim, Goyal et al. 2001).

Παράλληλα η φωσφορυλίωση της νεφρίνης από τη Fyn κινάση οδηγεί και στην επιστράτευση της προσαρμοστικής πρωτεΐνης Nck η οποία περιέχει τμήματα

SH2 και SH3. Οι Nck πρωτεΐνες συνδέουν τη φωσφορυλιωμένη νεφρίνη με το πολυμερισμό της ακτινίνης στους ποδίσκους των ποδοκυττάρων (Tryggvason, Pikkarainen et al. 2006).

Μια βασική ιδιότητα της οικογένειας των Nck πρωτεϊνών (στον άνθρωπο Nck1 και Nck2), είναι να προσδένονται στις φωσφοτυροσίνες. Σε αντίθεση με τις «Src» πρωτεΐνες, δεν έχουν καταλυτική ικανότητα. Αντί αυτού ενεργοποιούν τις κινάσες Pak και Abl και αντιδρούν με τη πρωτεΐνη N-WASP (το γονίδιο της μεταλλάσσεται στο σύνδρομο Wiscott-Aldrich), η οποία στη συνέχεια αντιδρά με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Arp2/3 (σταθερό σύμπλοκο επτά πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των Arp2/3) και ενεργοποιεί την ικανότητα του συμπλόκου να εμπλέκεται στη δημιουργία νηματιδίων ακτινίνης.

Πολλά από τα σημεία φωσφορυλίωσης της νεφρίνης (Y1176, Y1217 και Y1193) προσδένονται με την Nck, ενώ τριπλή μετάλλαξη των σημείων αυτών δεν επιτρέπει την πρόσδεση της Nck (Jones, Blasutig et al. 2006). Στον άνθρωπο οι πρωτεΐνες Nck1/2 εκφράζονται στα ποδοκύτταρα. Μειωμένη έκφρασή τους στα ποδοκύτταρα οδηγεί σε πρωτεϊνουρία και απαλοιφή των ποδίσκων. Κατά πάσα πιθανότητα οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ της νεφρίνης και του κυτταρικού σκελετού ακτινίνης. Η δημιουργία δηλαδή των νηματιδίων ακτινίνης ελέγχεται από τη νεφρίνη μέσω των Nck πρωτεϊνών (Huber, Simons et al. 2003). Ωστόσο ο μηχανισμός αυτός πρέπει να θέτεται σε λειτουργία σε περιπτώσεις ποδοκυτταρικού τραυματισμού και όχι σε φυσιολογικές καταστάσεις όπου η σύνδεση της νεφρίνης με το κυτταρικό σκελετό ακτινίνης ελέγχεται από τις πρωτεΐνες CD2AP και ποδοκίνη (Tryggvason, Pikkarainen et al. 2006).

Το σύμπλοκο νεφρίνη/Neph1/ποδοκίνη μπορεί να ρυθμίζει και την μεταβίβαση σημάτων από το εξωκυτταρικό χώρο του ποδοκυττάρου προς το εσωτερικό του μέσω της σύνδεσής τους με άλλες πρωτεΐνες. Η Neph1 αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη ZO-1 η οποία μπορεί να προσδέσει το σύμπλοκο με τον κυτταρικό σκελετό ακτινίνης (Huber, Schmidts et al. 2003). Άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν το κυτταρικό σκελετό ακτινίνης είναι η α-ακτινίνη, η IQGAP1 (IQ motif-containing GTPase-activating protein 1), η MAGI2 (membrane-associated guanylate cyclase inverted 2) και η CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) (Lehtonen, Lehtonen et al. 2004; Lehtonen, Ryan et al. 2005).

1.4.2.5 Οι μεταγραφικοί παράγοντες του ποδοκυττάρου

Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων είναι απαραίτητη διαδικασία για την ανάπτυξη των ώριμων ποδοκυττάρων καθώς και για την αντίδρασή τους στον τραυματισμό (Kreidberg 2003). Η αναγνώριση των μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν ρόλο στην ανταπόκριση των ποδοκυττάρων στον τραυματισμό θα μπορούσε να οδηγήσει στον σχεδιασμό καινούργιων αντιπρωτεϊνουρικών και αντισκληρωτικών φαρμάκων.

Η έκφραση του «Pax2» ξεκινάει πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη του σπειράματος, στο στάδιο της νεφρικής κυψελίδας, ενώ οι WT1 και Pod1 εμφανίζονται στο στάδιο σώματος τύπου S. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Kreisler, LMX1B και mf2 εκφράζονται κατά το στάδιο σχηματισμού των καμπύλων τριχοειδών (Quaggin 2002). Όλοι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται

στην ανάπτυξη του νεφρού και στη φαινοτυπική ρύθμιση των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων.

Μεταλλάξεις του μεταγραφικού παράγοντα WT1 οδηγούν στα σύνδρομα Denys Drash και Frasier (Wagner, Wagner et al. 2003). Οι μεταλλάξεις ως επί το πλείστον εντοπίζονται στις περιοχές των δαχτύλων σιδήρου της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την μειωμένη σύνδεση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στο DNA και ανεπαρκή σίγηση και ρύθμιση της λειτουργίας του Pax2 (Yang, Jeanpierre et al. 1999). Συνεχής έκφραση του Pax2 σε μοντέλα ποντικών οδηγεί σε οξεία σπειραματοπάθεια.

Στα φυσιολογικά σπειράματα, η έκφραση του WT1 είναι αυξημένη στα ποδοκύτταρα. Φυσιολογικά ποδοκύτταρα δεν εκφράζουν το Pax2. Στην ιδιοπαθή εστιακή σπειραματική σκλήρυνση, η έκφραση του WT1 είναι μειωμένη, ενώ η έκφραση του Pax2 είναι αυξημένη (Ohtaka, Ootaka et al. 2002). Το ίδιο ισχύει και για τη μεσαγγειακή σκλήρυνση του συνδρόμου Denys Drash (Yang, Jeanpierre et al. 1999).

Πρόσφατη πρωτεομική ανάλυση που συνέκρινε την έκφραση πρωτεϊνών σε φυσιολογικά ποδοκύτταρα και σε ποδοκύτταρα ενός ασθενούς με σύνδρομο Denys Drash, έδειξε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας WT1 ρυθμίζει την έκφραση 75 διαφορετικών ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών, 43% των οποίων αφορούν την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού (Viney, Morrison et al. 2007).

Ο μεταγραφικός παράγοντας LMX1B είναι απαραίτητος για την φυσιολογική διαφοροποίηση των ποδοκυττάρων. Στοχευμένη καταστροφή του LMX1B οδηγεί σε

σκελετικές ανωμαλίες όπως υποπλαστικά νύχια, απουσία επιγονατίδων και μια μοναδική μορφή νεφρικής δυσπλασίας, ενώ είναι η αιτία του συνδρόμου νυχιών-επιγονατίδας στον άνθρωπο (nail-patella syndrome) (Dreyer, Zhou et al. 1998). Πειραματικά μοντέλα ποντικών που δεν έχουν το παράγοντα LMX1B εμφανίζουν ελλειπή σπειραματική και ιδιαίτερα ποδοκυτταρική ανάπτυξη καθώς και διαχωρισμό της βασικής σπειραματικής μεμβράνης με μειωμένη έκφραση των αλυσίδων κολλαγόνου IV α3 και α4 (Rohr, Prestel et al. 2002). Τα ποδοκύτταρα έχουν μια κυβοειδή μορφή και δεν σχηματίζουν ποδίσκους ή SD. Η σύνθεση της ποδοκίνης και του CD2AP μειώνονται δραστικά, ενώ τα ποσοστά νεφρίνης είναι κοντά στο φυσιολογικό (Miner, Morello et al. 2002).

Ο μεταγραφικός παράγοντας «Pod1» εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο μεσέγχυμα αναπτυσσόμενων οργάνων όπως στον πνεύμονα, το νεφρό, το στομάχι, τη καρδιά και στα ποδοκύτταρα. Πειραματικά μοντέλα ποντικών χωρίς έκφραση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα πεθαίνουν κατά τη περιγεννητική περίοδο με υποπλαστικούς πνεύμονες και νεφρούς (Quaggin, Schwartz et al. 1999).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Kreisler (Krm11/MafB) ο οποίος είναι απαραίτητος για την διαφοροποίηση των ποδοκυττάρων, ανήκει στην οικογένεια Mac και δρα κάτωθεν του Pod1. Ποντίκια με μεταλλάξεις του Kreisler αναπτύσσουν πρωτεϊνουρία και απαλοιφή των ποδίσκων με ελάχιστα μειωμένη έκφραση της νεφρίνης και της ποδοκίνης (Sadl, Jin et al. 2002).

Επιπρόσθετα, μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας ZHX (zinc-fingers και homeoboxes) αποτελούν κύριους ρυθμιστές της ποδοκυτταρικής γονιδιακής έκφρασης στην ΕΤΣΣ και στη νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων (Liu, Clement et al. 2006).

Τέλος, αρκετά πρόσφατα αναγνωρίστηκε ο παράγοντας «upstream stimulatory factor (USF-1)» ως στοιχείο που προσδέεται στον υποκινητή της ποδοκίνης (Di Duca, Oleggini et al. 2006). Καθώς η ποδοκίνη χάνεται στο ΘΔ στις περισσότερες πρωτεϊνουργικές νόσους και πρέπει να ανασυνθεθεί, ο ρόλος του USF-1 πρέπει να ερευνηθεί.

1.4.3 Μεταλλάξεις γονιδίων που οδηγούν στο SRNS

Το ανθεκτικό σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο μπορεί να αποτελεί και σύμπτωμα άλλων συνδρόμων (πίνακας 2). Ένας διαχωρισμός μεταξύ αυτών μπορεί να γίνει με βάση την ηλικία εμφάνισης του συνδρόμου.

Πίνακας 2: Εστιακή τμηματική πειραματική σκλήρυνση όπως αναφέρεται στη βάση δεδομένων OMIN PubMed.

1: #603278 FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS 1; FSGS1 Gene map locus 19q13	13: #232220 GLYCOGEN STORAGE DISEASE Ib Gene map locus 11q23
2: #603965 FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS 2; FSGS2 Gene map locus 11q21-q22	14: *608414 PHOSPHOLIPASE C, EPSILON-1; PLCE1 Gene map locus 10q23
3: #607832 FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS 3; FSGS3 Gene map locus Chr.6	15: #600995 NEPHROTIC SYNDROME, STEROID-RESISTANT, AUTOSOMAL RECESSIVE; SRN1 Gene map locus 1q25-q31
4: %609469 NEPHROPATHY, PROGRESSIVE, WITH DEAFNESS Gene map locus 11q24	16: *590100 TRANSFER RNA, MITOCHONDRIAL, TYROSINE; MTTY
5: *603652 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL, SUBFAMILY C, MEMBER 6; TRPC6 Gene map locus 11q21-q22	17: #607426 COENZYME Q10 DEFICIENCY Gene map locus 9p13.3, 6q21, 4q21-q22
6: *604638 ACTININ, ALPHA-4; ACTN4 Gene map locus 19q13	18: *167409 PAIRED BOX GENE 2; PAX2 Gene map locus 10q24.3-q25.1
	19: *602716

7: +232200 GLYCOGEN STORAGE DISEASE I GLUCOSE-6-PHOSPHATASE, CATALYTIC, INCLUDED; G6PC, INCLUDED Gene map locus 17q21	NEPHRIN; NPHS1 Gene map locus 19q13.1
8: #242900 IMMUNOSSESIOUS DYSPLASIA, SCHIMKE TYPE Gene map locus 2q34-q36	20: %191830 UROGENITAL ADYSPLASIA, HEREDITARY
9: *604241 CD2-ASSOCIATED PROTEIN; CD2AP Gene map locus Chr.6	21: #173900 POLYCYSTIC KIDNEYS POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE, ADULT, INCLUDED; APKD, INCLUDED Gene map locus 16p13.3-p13.12
10: *607102 WILMS TUMOR 1 GENE; WT1 Gene map locus 11p13	22: *604766 PODOCIN; NPHS2 Gene map locus 1q25-q31
11: #610725 NEPHROTIC SYNDROME, TYPE 3; NPHS3 Gene map locus 10q23	23: #609049 PIERSON SYNDROME NEPHROTIC SYNDROME, CONGENITAL, WITH OR WITHOUT OCULAR ABNORMALITIES, INCLUDED Gene map locus 3p21
12: #232240 GLYCOGEN STORAGE DISEASE Ic GLYCOGEN STORAGE DISEASE Id, INCLUDED; GSD1D, INCLUDED Gene map locus 11q23	24: %104200 ALPORT SYNDROME, AUTOSOMAL DOMINANT

1.4.3.1 Μεταλλάξεις γονιδίων που οδηγούν σε SRNS στη παιδική ηλικία

Στο ιδιοπαθές SRNS μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί τουλάχιστον 6 γονίδια, μεταλλάξεις των οποίων είναι υπεύθυνες για την παθολογική εικόνα των παιδιατρικών ασθενών (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Πίνακας γονιδίων μεταλλάξεις των οποίων οδηγούν σε SRNS

SRNS παιδικής ηλικίας	Τύπος κληρονομικότητας	Θέση στο χρωμόσωμα	Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Κωδικός OMIM
Απομονωμένο DMS	αυτοσωματικός υπολειπόμενος	11p13	WT1	WT1	256370
Σύνδρομο Denys Drash	αυτοσωματικός επικρατητικός	11p13	WT1	WT1	194080
Σύνδρομο Frasier	αυτοσωματικός επικρατητικός	11p13	WT1	WT1	136680
Συγγενές NS φίλανδικού τύπου	αυτοσωματικός υπολειπόμενος	19q13	NPHS1	νεφρίνη	602716
Υπολειπόμενο οικογενές SRNS	αυτοσωματικός υπολειπόμενος	1q25	NPHS2	ποδοκίνη	600995
Υπολειπόμενο NS	αυτοσωματικός υπολειπόμενος	10q23-q24	PLCE1/NPHS3	PLC31 λαμινίνη	608414
Σύνδρομο Pierson	αυτοσωματικός υπολειπόμενος	3p21	LAMB2	B2	609049
Σύνδρομο Nail-Patella	αυτοσωματικός επικρατητικός	9q34.1	LMX1B	Lmx1b	161200
Υπολειπόμενο SRNS με απώλεια ακοής	αυτοσωματικός υπολειπόμενος	14q24.2

Μεταλλάξεις του γονιδίου Wilm's tumor 1 (WT1)

Το γονίδιο WT1 χαρτογραφήθηκε το 1990 (Rose, Glaser et al. 1990). Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p13 και κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα WT1 ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων κατά τη διάρκεια της νεφρικής και ουρογεννητικής ανάπτυξης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο WT1 αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς με όγκους Wilms, ουροποιογεννητικές δυσπλασίες και νοητική στέρωση (σύνδρομο WAGR) (Gessler, Roustka et al. 1990). Πρόκειται για μεγάλα ελλείμματα του γονιδίου που οδηγούν σε υπολειπургικό ή και καθόλου λειτουργικό πρωτεϊνικό προϊόν. Μεταλλάξεις του WT1 έχουν βρεθεί και σε μεμονωμένα περιστατικά με όγκους Wilms, όπου παρατηρούνται τόσο σε σωματικές όσο και σε γαμετικές σειρές (Haber, Buckler et al. 1990). Σε οικογενή περιστατικά οι μεταλλάξεις ακολουθούν τον επικρατητικό τύπο κληρονομικότητας, με μεταλλάξεις στις γαμετικές σειρές. Παρόλα αυτά, έχουν περιγραφεί και αρκετά περιστατικά όπου η ανάπτυξη του όγκου οφείλεται σε απώλεια της ετεροζυγωτίας λόγω μιας δεύτερης σωματικής μετάλλαξης (Schumacher, Schneider et al. 1997; Niaudet and Gubler 2006).

Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις του γονιδίου WT1 βρέθηκαν σε ασθενείς με σύνδρομο Denys-Drash (DDS) και Frasier (FS) που είχαν διάχυτη μεσαγγειακή σκλήρυνση και ανθεκτικό σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο (Pelletier, Bruening et al. 1991; Barbaux, Niaudet et al. 1997; Jeanpierre, Denamur et al. 1998). Το σύνδρομο Denys-Drash χαρακτηρίζεται από αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο κληρονομικότητας, ψευδοερμαφροδιτισμό αρρένων, δυσγενεσία των γονάδων και ανάπτυξη όγκων Wilms (σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%). Οι όγκοι Wilms μπορεί να εμφανιστούν πριν την εμφάνιση του NS αλλά και μετά από αυτό. Το νεφρωσικό

σύνδρομο συνήθως εμφανίζεται στους πρώτους μήνες ζωής (Habib, Gubler et al. 1993). Ιστολογικά, συνοδεύεται από DMS και απαλοιφή των ποδοκυτταρικών προσεκβολών. Οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με στεροειδή (SRNS) και εμφανίζουν ταχεία επιδείνωση με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια κατά τη βρεφική (νηπιακή) ηλικία. Γενικά συνιστάται αμφίπλευρη νεφρεκτομή προκειμένου να εμποδιστεί η ανάπτυξη των όγκων (Hu, Zhang et al. 2004). Επανεμφάνιση του NS μετά από μεταμόσχευση νεφρού δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι στιγμής (Niaudet and Gubler 2006).

Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην εμφάνιση του συνδρόμου DDS είναι σημειακές επικρατητικές και λαμβάνουν χώρα στα εξώνια 8 και 9 του γονιδίου. Οι περισσότερες από αυτές είναι de novo, δεν έχουν κληρονομηθεί δηλαδή από τους γονείς. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που προκαλούν DDS είναι παρερμηνεύσιμες και αφορούν συντηρημένα αμινοξέα στις περιοχές των δαχτύλων ψευδαργύρου της πρωτεΐνης. Η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η p.R394W στο εξώνιο 9 του γονιδίου WT1. Οι νουκλεοτιδικές αυτές αλλαγές επηρεάζουν τη δυνατότητα σύνδεσης του WT1 μεταγραφικού παράγοντα σε αλληλουχίες DNA (Little and Wells 1997).

Μερικοί ασθενείς με μεταλλάξεις στα εξώνια 8 και 9 του WT1 γονιδίου δεν παρουσιάζουν την ιστολογική εικόνα ασθενών με DDS αλλά διάχυτη μεσαγγειακή σκλήρυνση. Για αυτό το λόγο πρέπει να πραγματοποιείται μοριακός έλεγχος σε όλους τους παιδιατρικούς ασθενείς με DMS και NS με έναρξη σε πρώιμη ηλικία καθώς υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης όγκου τύπου Wilms. Επιπρόσθετα χρωμοσωμικός έλεγχος συνιστάται σε όλους τους ασθενείς γένους θήλεος προκειμένου να διαγνωσθεί πιθανός ψευδεμφροδιτισμός άρρενος. Μερικοί

ασθενείς με DMS εμφανίζουν υπολειπόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου που έχουν κληρονομηθεί και από τους δύο γονείς (Jeanpierre, Denamur et al. 1998).

Το σύνδρομο Frasier (FS) χαρακτηρίζεται από προοδευτική σπειραματοπάθεια και ψευδερμαφροδιτισμό άρρενος (Frasier, Bashore et al. 1964) αν και παρατηρούνται αρκετές διαφορές σε σχέση με το DDS. Αυτές περιλαμβάνουν έναρξη της πρωτεϊνουρίας σε μεγαλύτερη παιδική ηλικία και πιο αργή πρόοδο της ρινικής δυσλειτουργίας. Η τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια εμφανίζεται στη δεύτερη με τρίτη δεκαετία. Όπως και στο DDS η πρωτεϊνουρία και το NS είναι ανθεκτικά σε στεροειδή. Τα ιστολογικά ευρήματα τυπικά δείχνουν FSGS (Gubler, Yang et al. 1999) αλλά ένα μικρό ποσοστό ασθενών εμφανίζει μόνο μικρές αλλοιώσεις του νεφρικού σπειράματος. Σε θήλεα άτομα η ουρογεννητική οδός σχηματίζεται φυσιολογικά σε αντίθεση με 46,XY ασθενείς όπου παρατηρείται ολική αναστροφή του φύλου με γοναδική δυσγεννησία. Πρώιμη έμμηνος ρύση μαζί με NS είναι τυπικό χαρακτηριστικό αυτών των ασθενών και πρέπει να παραπέμπονται για μοριακό έλεγχο του γονιδίου WT1. Αν και η πιθανότητα εμφάνισης όγκου Wilms είναι μικρή, ωστόσο παρατηρούνται σε μεγάλο ποσοστό γοναδοβλαστώματα. Μετά τη διάγνωση με FS συστήνεται τυπικά γοναδεκτομή στους 46,XY ασθενείς.

Το 1997 παρατηρήθηκε ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου WT1 παίζουν ρόλο στη παθογένεια του FSGS (Barboux, Niaudet et al. 1997). Ωστόσο το είδος των μεταλλάξεων διαφέρει από αυτές που προκαλούν DDS. Οι μεταλλάξεις FS οφείλονται σε νουκλεοτιδικές αλλαγές του ιντρονίου 9, οι οποίες αλλάζουν το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA. Οι μεταλλάξεις αυτές ακολουθούν τον επικρατητικό τύπο κληρονομικότητας και είναι de novo. Η αρχή του ιντρονίου 9

παίζει καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία της ισομορφής KTS της WT1 πρωτεΐνης. Η ισομορφή αυτή περιέχει τρία επιπρόσθετα αμινοξέα (λυσίνη, θρειονίνη και σερίνη). Η αναλογία KTS(+)/KTS(-) πρωτεΐνης παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην ουρογεννητική και νεφρική ανάπτυξη. Στου FS ασθενείς η αναλογία αυτή μειώνεται λόγω του νουκλεοτιδικών αυτών αλλαγών (Barbaux, Niaudet et al. 1997). Δεν χωρά αμφιβολία ότι η παθογένεια των μεταλλάξεων του γονιδίου WT1 παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Ασθενείς με τυπικές μεταλλάξεις DDS εμφανίζουν FSGS ή όγκο Wilms χωρίς NS, ενώ ασθενείς με μεταλλάξεις FS εμφανίζουν τυπικά συμπτώματα DDS ή DMS (Kaplinsky, Ghahremani et al. 1996; Denamur, Bocquet et al. 2000).

Μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS2 (ποδοκίνη)

Το γονίδιο NPHS2 χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 1q25-q31 μετά από μελέτη σύνδεσης 8 οικογενειών με αυτοσωματικό υπολειπόμενο SRNS, όπου και εντοπίστηκαν οι πρώτες μεταλλάξεις του γονιδίου (Boute, Gribouval et al. 2000). Το νεφρωσικό σύνδρομο σε αυτές τις οικογένειες χαρακτηριζόταν από ανθεκτικότητα σε στεροειδή, ηλικία έναρξης 3-5 χρόνια και έλλειψη επανεμφάνισης της πρωτεϊνουρίας μετά από μεταμόσχευση νεφρού. Οι μεταλλάξεις του NPHS2 δεν έχουν παρατηρηθεί ποτέ σε ασθενείς με τον ευαίσθητο τύπο NS. Η ιστολογία τυπικά δείχνει FSGS αν και σε πολύ μικρό ποσοστό ασθενών μπορεί να εμφανιστούν ελάχιστες αλλοιώσεις του σπειράματος. Σε μερικές από αυτές τις περιπτώσεις μετά από διαδοχικές βιοψίες παρατηρήθηκε η αλλαγή από ελάχιστες αλλοιώσεις σε FSGS.

Το γονίδιο NPHS2 κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη ποδοκίνη. Η ποδοκίνη έχει μοριακό βάρος 42kD και εκφράζεται και στα εμβρυικά αλλά και στα ώριμα σπειράματα (Boute, Gribouval et al. 2000) ενώ παίζει πρωταρχικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργίας της διήθησης του πλάσματος. Το σημείο έκφρασής της είναι τα ποδοκύτταρα και συγκεκριμένα το θυριδωτό διάφραγμα. Μερικές μεταλλάξεις του NPHS2, και ειδικότερα η συχνότερη στον ευρωπαϊκό πληθυσμό p.R138Q, δρουν έτσι ώστε να εμποδίζουν την σύνδεση ποδοκίνης-νεφρίνης με αποτέλεσμα την αδυναμία της νεφρίνης να τοποθετηθεί στις σχεδίες λιπιδίων (Schwarz, Simons et al. 2001).

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότερες από 40 παθολογικές μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS2. Οι περισσότερες από αυτές επηρεάζουν το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Ruf, Lichtenberger et al. 2004; Weber, Gribouval et al. 2004). Οι μεταλλάξεις της ποδοκίνης βρέθηκαν αρχικά σε νεογνά με SRNS και ταχεία ανάπτυξη τελικού σταδίου νεφρικής ανεπάρκειας. Στη συνέχεια, μεταλλάξεις της ποδοκίνης χαρακτήριζαν την παθογένεια περιστατικών SRNS κάθε ηλικίας από την παιδική μέχρι και την ενήλικη (Caridi, Bertelli et al. 2003; Caridi, Bertelli et al. 2003; Schultheiss, Ruf et al. 2004). Για παράδειγμα η μετάλλαξη p.R138Q βρίσκεται σε παιδιά με πρώιμη έναρξη SRNS ενώ οι μεταλλάξεις p.V180M και p.R238S εμφανίζονται σε ασθενείς με ηλικία έναρξης πρωτεϊνουρίας στη δεύτερη με τρίτη δεκαετία ζωής (Weber, Gribouval et al. 2004).

Ένας πολύ συχνός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός του γονιδίου NPHS2, ο p.R229Q, παρατηρείται σε ετερόζυγη κατάσταση σε περίπου 3% του φυσιολογικού πληθυσμού (0.5%-7% ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο) (Franceschini, North et al.

2006). Η ύπαρξη ενός συγκεκριμένου απλότυπου εκατέρωθεν του πολυμορφισμού σε άτομα με διαφορετική καταγωγή δείχνει ότι η αλλαγή αυτή προήλθε από έναν κοινό πρόγονο (Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002). Σε μερικά περιστατικά SRNS ο πολυμορφισμός εμφανίζεται σε διπλή ετεροζυγωτία με μια δεύτερη παθολογική αλλαγή του γονιδίου. Σε αυτά τα περιστατικά το NS εμφανίζεται προς το τέλος της παιδικής ηλικίας δείχνοντας μειωμένη παθογένεια σε σχέση με ομοζυγωτικές παθολογικές αλλαγές. Για αυτό το λόγο ο p.R229Q θεωρείται ότι ενισχύει την ανέχεια σε FSGS σε συνδυασμό με μια δεύτερη παθολογική μετάλλαξη (Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002). Επιπρόσθετα, σε μια μεγάλη μελέτη (περίπου 1500 άτομα από τον γενικό πληθυσμό) βρέθηκε ότι η ύπαρξη του πολυμορφισμού συνοδεύεται από αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μικροαλβουμιναιμίας (Pereira, Pereira et al. 2004). In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του πολυμορφισμού εμφανίζει μειωμένη σύνδεση της ποδοκίνης με τη νεφρίνη (Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002).

Ο ρόλος του p.R229Q σε ομοζυγωτία είναι ακόμη διφορούμενος. Μερικοί συγγραφείς έχουν αναγνωρίσει την αλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση σε ασθενείς με SRNS και καμία άλλη παθολογική μετάλλαξη (Weber, Gribouval et al. 2004). Η μέση συχνότητα εύρεσης της νουκλεοτιδικής αλλαγής στο ένα αλληλόμορφο είναι μόλις 3% (ετερόζυγωτία). Η συχνότητα να υπάρχει και στα 2 αλληλόμορφα ανέρχεται στο 0.1% στον γενικό πληθυσμό, ενώ ταυτόχρονα η συχνότητα εμφάνισης SRNS είναι ακόμα μικρότερη. Για αυτό το λόγο ο παραπάνω γονότυπος δεν μπορεί να θεωρηθεί από μόνος του παθολογικός. Πρέπει να υπάρχουν επιπρόσθετοι γενετικοί

ή περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι προκαλούν την εμφάνιση της νόσου σε ομοζυγώτες φορείς.

Μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS1 (νεφρίνη)

Το συγγενές NS Φιλανδικού τύπου (CNF) χαρακτηρίζεται από αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας και ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας *in utero* (Rapola 1987). Το υπεύθυνο γονίδιο ονομάζεται NPHS1 και βρίσκεται στη θέση 19q13. Χαρτογραφήθηκε το 1994 σε ασθενείς με CNS (Kestila, Lenkkeri et al. 1998). Το γονίδιο NPHS1 κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη νεφρίνη που εντοπίζεται στο θυριδωτό διάφραγμα των νεφρώνων. Τυπικά, τα οξέα περιστατικά NS εμφανίζονται πριν τους πρώτους 3 μήνες ζωής. Ιστολογικά παρατηρούνται ανώριμα σπειράματα, μεσαγγειακή υπερκυττάρωση, διαπλάτυνση των ποδοκυτταρικών προσεκβολών και αποχωρισμός τους από τη βασική σπειραματική μεμβράνη. Είναι ανθεκτικό σε στεροειδή (SRNS) και συνήθως καταλήγει σε απαραίτητη νεφρεκτομή.

Το γονίδιο NPHS1 εκφράζεται στα ποδοκύτταρα στο σημείο του θυριδωτού διαφράγματος μετά την ολική διαφοροποίηση του ποδοκυττάρου (Ruotsalainen, Ljungberg et al. 1999). Η νεφρίνη όπως περιγράφηκε και προηγουμένως είναι βασική πρωτεΐνη του ποδοκυττάρου και συμμετέχει όχι μόνο στη δομική ακεραιότητα του SD αλλά και στη μεταβίβαση σημάτων από και προς το ποδοκύτταρο.

Μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS1 αρχικά αναφέρθηκαν στον Φιλανδικό πληθυσμό οδηγώντας στην ονομασία του συνδρόμου. Αρχικά δύο μεταλλάξεις (p.L41fsX90=Fin major, p.R1109X=Fin minor) που οδηγούν σε πρωτεΐνη μειωμένου

μοριακού βάρους βρέθηκαν σε πολύ μεγάλο ποσοστό στους Φιλανδούς παιδιατρικούς ασθενείς. Σε ακόλουθες μελέτες μεταλλάξεις του NPHS1 βρέθηκαν και σε άλλους ασθενείς ανά το κόσμο, ενώ μέχρι σήμερα πάνω από 50 μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί.

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι το CNS είναι γενετικά μια ετερογενής διαταραχή. Σε μερικούς CNS ασθενείς ενώ δεν έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο NPHS1 έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο NPHS2. Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν τα τυπικά ιστολογικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου. Παρόλα αυτά μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών πρέπει να πραγματοποιηθούν.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών με έναν διαφορετικό τύπο κληρονομικότητας. Αυτοί οι ασθενείς έχουν κληρονομήσει μεταλλάξεις στα 3 αλληλόμορφα (δύο NPHS1 μεταλλάξεις και μία NPHS2 ή το αντίθετο). Θεωρείται ότι η μονή μετάλλαξη στο δεύτερο γονίδιο λειτουργεί ως γενετικός τροποποιητής, αλλάζοντας το κλινικό αποτέλεσμα. Το παραπάνω γεγονός αποδεικνύει ότι το ποδοκύτταρο βρίσκεται σε μια δυναμική κατάσταση η οποία ξεκινάει από μοριακό επίπεδο και καταλήγει σε πρωτεϊνικό.

Μεταλλάξεις του γονιδίου LAMB2

Πρόσφατα, υπολειπόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου LAMB2 στο χρωμόσωμα 3p21 αναγνωρίστηκαν ως υπεύθυνες για το σύνδρομο Pierson (Zenker, Aigner et al. 2004) που χαρακτηρίζεται από CNS, DMS και οπτικές ανωμαλίες όπως μικροκορία (Pierson, Cordier et al. 1963). Το γονίδιο LAMB2 κωδικοποιεί την β2 αλυσίδα της λαμίνης, ένα τμήμα του τριμερούς λαμινών στο νεφρό οι οποίες αλληλοσυνδέουν

την βασική μεμβράνη του ποδοκυττάρου με τη βασική σπειραματική μεμβράνη. Οι περισσότερες μεταλλάξεις προκαλούν μειωμένου μεγέθους ελλατωματική πρωτεΐνη οδηγώντας σε χάσιμο της έκφρασής της στο ποδοκύτταρο (Zenker, Aigner et al. 2004). Μερικές μεταλλάξεις του LAMB2 οι οποίες προκαλούν λιγότερο δυσλειτουργική πρωτεΐνη είναι υπεύθυνες για έναν πιο ήπιο κλινικό φαινότυπο που περιλαμβάνει το CNS (Hasselbacher, Wiggins et al. 2006). Για αυτό το λόγο ο μοριακός έλεγχος του γονιδίου LAMB2 θα πρέπει να πραγματοποιείται εάν δεν έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα γονίδια NPHS1, NPHS2 ή στο WT1.

Μεταλλάξεις του γονιδίου LMX1B

Επικρατητικές μεταλλάξεις του γονιδίου LMX1B είναι υπεύθυνες για το σύνδρομο Nail-Patella (NLS). Το γονίδιο LMX1B εκφράζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στα ποδοκύτταρα και κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη Lmx1b, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος, ενώ μεταλλάξεις του προκαλούν εκτός από σκελετικές ανωμαλίες και ένα μεγάλο εύρος νεφρικής δυσπλασίας. Οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν πρωτεϊνουρία, νεφρωσικό σύνδρομο ή νεφρική ανεπάρκεια. Συνολικά, η νεφροπάθεια εμφανίζεται στο 40% των περιστατικών όμως τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια παρουσιάζει το 10% (Looij, te Slaa et al. 1988). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι νεφρική δυσλειτουργία εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες καθώς και σε ασθενείς με ιστορικό νεφροπάθειας NPS (Bongers, Huysmans et al. 2005). Σε πειραματικά μοντέλα με μηδενική έκφραση του LMX1B παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης για το CD2AP και το NPHS2 (Miner, Morello et al. 2002).

Μεταλλάξεις του γονιδίου PLCE1

Ένα νέο γονίδιο υπεύθυνο για το SRNS (NPHS3) χαρτογραφήθηκε πρόσφατα στο χρωμόσωμα 10q23-q24. Το γονίδιο ονομάζεται PLCE1 και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς περιλαμβανομένου και του νεφρού (Hinkes, Wiggins et al. 2006). Το γονίδιο κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφολυπάση C-ε1 το οποίο παίζει ρόλο στη διατήρηση του διηθητικού φραγμού. Παρόλα αυτά ο παθογενετικός μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πολύ μικρό ποσοστό ασθενών με παθολογικές μεταλλάξεις του γονιδίου PLCE1 παρουσίασαν ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη ή στεροειδή. Ωστόσο, αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών.

1.4.3.2 Μεταλλάξεις γονιδίων που οδηγούν σε SRNS σε ενήλικες

Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί τρεις διαφορετικές γενετικές θέσεις υπεύθυνες για την πρόκληση SRNS στην ενήλικη ζωή (πίνακας 4).

Πίνακας 4: Γονίδια υπεύθυνα για SRNS σε ενήλικες

ΝΣ ενηλίκων	Τύπος κληρονομικότητας	Θέση στο χρωμόσωμα	Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Κωδικός OMIM
FSGS 1	αυτοσωματικός επικρατητικός	19q13	ACTN4	A-actinin 4	603278
FSGS 2	αυτοσωματικός επικρατητικός	11p21-22	TRPC6	TRPC6	603965
FSGS 3	αυτοσωματικός επικρατητικός	6	CD2AP	CD2AP	607832

Μεταλλάξεις του γονιδίου ACTN4

Το 1998 αναγνωρίστηκε η γενετική θέση για το αυτοσωματικό επικρατητικό FSGS (FSGS1) στο χρωμόσωμα 19q13 (Mathis, Kim et al. 1998). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου ACTN4 είναι υπεύθυνες για την παθογένεια αυτού του τύπου SRNS (Kaplan, Kim et al. 2000). Το γονίδιο κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη α-ακτινίνη, 4 μια βασική πρωτεΐνη του κυτταρικού σκελετού που εκφράζεται ιδιαιτέρως στα

ποδοκύτταρα. Έχουν σχεδιασθεί πειραματικά μοντέλα ποντικών τόσο για την απουσία αλλά και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Στα μοντέλα αυτά παρατηρείται πρωτεϊνουρία και αλλαγές στη μορφολογία των ποδοκυττάρων. Για αυτό το λόγο θεωρείται ότι η α-ακτινίνη 4 παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταροσκελετική λειτουργία του ποδοκυττάρου. Μεταλλάξεις του γονιδίου ACTN4 έχουν χαρακτηρισθεί σε 3 διαφορετικές οικογένειες με FSGS (Karlan, Kim et al. 2000). Η κλινική πορεία των ασθενών περιλαμβάνει προοδευτική αύξηση της πρωτεϊνουρίας, FSGS, καθώς και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια αργότερα κατά την ενήλικη ζωή. Τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια έχει παρατηρηθεί σε αρκετά περιστατικά. Όλες οι μεταλλάξεις του γονιδίου ACTN4 μέχρι στιγμής αφορούν περιοχές όπου κωδικοποιούν μη συντηρημένα αμινοξέα στην περιοχή όπου η πρωτεΐνη προσδέεται με την ακτινίνη. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε αυξημένη σύνδεση. Παρόλα αυτά στην μελέτη του Karlan και συνεργατών βρέθηκε ότι κάποιοι φορείς μεταλλάξεων δεν εμφάνιζαν παθολογικό φαινότυπο. Αυτή η μη ολοκληρωτική διεύθυνση δείχνει ότι μάλλον υπάρχουν άλλοι παράγοντες (γενετικοί ή μη) που εμπλέκονται στην παθογένεια σε συνδυασμό με τις μεταλλάξεις του γονιδίου ACTN4. Οι μεταλλάξεις του ACTN4 αποτελούν μια σπάνια αιτία SRNS, και η συχνότητά τους βρίσκεται στο 4% των οικογενών FSGS (Weins, Kenlan et al. 2005).

Μεταλλάξεις του γονιδίου TRPC6

Το 1999 βρέθηκε ότι μεταλλάξεις του γονιδίου TRPC6 (χρωμόσωμα 11q21-q22) προκαλούν αυτοσωματικό επικρατητικό FSGS (Winn, Conlon et al. 1999; Reiser, Polu et al. 2005; Winn, Conlon et al. 2005). Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη/υποδοχέας

θεωρείται ότι μεσολαβεί την είσοδο ιόντων Ca στα κύτταρα. Παράλληλα επειδή η πρωτεΐνη TRPC6 συνδέεται με την ποδοκίνη και νεφρίνη στο SD πιστεύεται ότι η ποδοκίνη μπορεί και συμμετέχει μαζί με την TRPC6 στον μηχανισμό εντόπισης μηχανικών αλλαγών ή πιέσεων στο περιβάλλον του ποδοκυττάρου. Το γονίδιο εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα ποδοκύτταρα στο σημείο του SD. Αν και έχει περιγραφεί μικρός αριθμός μεταλλάξεων, οι περισσότερες οδηγούν σε αυξημένη είσοδο ιόντων στο ποδοκύτταρο. Παρόλα αυτά έχουν περιγραφεί περιστατικά με μεταλλάξεις χωρίς όμως να συνοδεύονται από νεφρικές δυσλειτουργίες και αποτελούν ένδειξη για μη ολοκληρωμένη διείσδυση.

Μεταλλάξεις του γονιδίου CD2AP

Το 1999, η χρωμοσωμική θέση FSGS3 εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 6 και χαρτογραφήθηκε το γονίδιο CD2AP (Kim, Wu et al. 2003). Κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη CD2AP, μια πρωτεΐνη που προσδέεται με την ακτινίνη. CD2AP(-/-) μοντέλα ποντικών χαρακτηρίζονται από ανοσολογικές δυσλειτουργίες αλλά και από NS και FSGS. Μέχρι στιγμής έχει βρεθεί μόνο μια μετάλλαξη του γονιδίου που προκαλεί απαλοιφή των ποδοκυτταρικών προσεκβολών και καταστροφή της δομής του SD. Το CD2AP αλληλεπιδρά με την νεφρίνη και μαζί τοποθετούνται στις σχεδίες λιπιδίων στην ποδοκυτταρική μεμβράνη. Για αυτό το λόγο πιστεύεται ότι το CD2AP χρειάζεται για την πρόσδεση και σταθεροποίηση της νεφρίνης (και του SD) στον κυτταρικό σκελετό του ποδοκυττάρου. Παρόλα αυτά η έλλειψη περιστατικών δεν βοηθά την περαιτέρω διερεύνηση του παθογενετικού μηχανισμού.

1.4.4 Αντιμετώπιση του SRNS

Η θεραπεία του SRNS είναι αρκετά απαιτητική επειδή οι γενετικές μορφές του είναι ανθεκτικές σε παράγοντες ανοσοκαταστολής (κυκλοφωσφαμίδη, αζαθειοπρίνη, κυκλοσπορίνη) σε συνδυασμό με γλυκοκορτικοειδή. Αυτό αποδίδεται στην εκτενή δομική, αρχιτεκτονική και λειτουργική καταστροφή των ποδοκυττάρων. Για αυτό το λόγο προτείνεται στα παιδιά με τους κληρονομικούς τύπους SRNS, και ιδιαίτερα σε όσους οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της ποδοκίνης, η αποφυγή θεραπείας ανοσοκαταστολής.

Η μεταμόσχευση νεφρού θεωρείται γενικά η μέθοδος που ακολουθείται σε ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια. Παρόλα αυτά σε περιστατικά με μεταλλάξεις των γονιδίων των ποδοκυττάρων, αρκετοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν. Για παράδειγμα, μέχρι στιγμής είναι ακόμα άγνωστος ο τρόπος που τα μόσχευμα από ετερόζυγους δότες συμπεριφέρονται και αναπτύσσονται στον ασθενή με υπολειπόμενο SRNS. Οι γονείς των παιδιών με υπολειπόμενο SRNS φέρουν ο καθένας ένα παθολογικό αλληλόμορφο το οποίο βρίσκεται στο μόσχευμα. Θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι το συγκεκριμένο μόσχευμα θα ήταν πιθανότερο να αναπτύξει πρωτεϊνουρία. Μέχρι στιγμής τα πειραματικά μοντέλα δείχνουν ότι κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει, ενώ υπάρχουν ελλιπή στοιχεία σε πραγματικά περιστατικά ασθενών. Ωστόσο πρέπει να λαμβάνετε υπ' όψιν και η πρόγνωση του νεφρού του γονέος το οποίο παραμένει μετά τη μεταμόσχευση. Θα μπορούσε ο ανέπαφος νεφρός που φέρει την ετεροζυγωτία της μετάλλαξης να είναι περισσότερο ευαίσθητος στην ασθένεια από ότι το νεφρό ατόμων που δεν φέρουν καμία απολύτως μετάλλαξη. Για άλλη μια φορά οι γνώσεις πάνω σε αυτό το θέμα

είναι ελλιπείς. Μέχρι στιγμής, συνιστάται η στενή παρακολούθηση τόσο του δότη όσο και του λήπτη του μοσχεύματος.

Σε οικογένειες με τον αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο SRNS και μεγάλη ηλικία έναρξης της πρωτεϊνουρίας, μόνο ο ένας από τους γονείς είναι φορέας της παθολογικής μετάλλαξης. Ο γενετικός έλεγχος της οικογένειας μπορεί να ξεχωρίσει τα φυσιολογικά μοσχεύματα τα οποία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Αν η μετάλλαξη του ασθενούς είναι *de novo*, τότε οι γονείς δεν είναι φορείς και είναι ικανοί δότες τουλάχιστον από γενετική όψη.

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την παθογένεια της διαπερατότητας του σπειράματος και την επανεμφάνιση της πρωτεϊνουρίας στο μόσχευμα νεφρού σε περιπτώσεις με FSGS. Γενικά, η επανεμφάνιση της πρωτεϊνουρίας παρατηρείται σε ποσοστό περίπου 30% των ασθενών με FSGS, (Artero, Biava et al. 1992) ενώ ο κίνδυνος επανεμφάνισης αυξάνεται σε παιδιατρικούς ασθενείς (Senggutuvan, Cameron et al. 1990). Συνηθέστερα η πρωτεϊνουρία παρατηρείται μέσα σε μερικές μέρες μετά τη μεταμόσχευση. Στα παιδιά, ο μέσος χρόνος εμφάνισης πρωτεϊνουρίας στο μόσχευμα υπολογίζεται στις 14 ημέρες (Tejani and Stablein 1992). Στις μη κληρονομήσιμες μορφές FSGS/SRNS η επανεμφάνιση της πρωτεϊνουρίας ακολουθεί μια δυσλειτουργία των T λεμφοκυττάρων και παραγωγή πρωτεϊνουρικών κυκλοποιητικών παραγόντων (Savin, Sharma et al. 1996).

Στα περιστατικά με FSGS/SRNS λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου NPHS2, η επανεμφάνιση της πρωτεϊνουρίας αποτελεί ένα σπάνιο φαινόμενο και παρατηρείται σε ποσοστό μικρότερο του 10% των μεταμοσχευμένων ασθενών (Ruf, Lichtenberger et al. 2004; Weber, Gribouval et al. 2004). Στα περιστατικά με

συγγενές NS η πιθανότητα επανεμφάνισης πρωτεϊνουρίας στο μόσχευμα φαίνεται να είναι σημαντική. Ειδικότερα σε ασθενείς με μεταλλάξεις Fin major του γονιδίου NPHS1 η πιθανότητα ανέρχεται σε 25%. Η παθογένεια αυτής της πρωτεϊνουρίας σχετίζεται με την ανάπτυξη αντισωμάτων κατά της νεφρίνης (Patrakka, Ruotsalainen et al. 2002).

Κεφάλαιο 2: Μεθοδολογία

2.1 Κλινικό δείγμα και ομάδα ελέγχου

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν πενήντα ένας ασθενείς (πίνακας 5) με ανθεκτικό σε στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο. Η ομάδα αυτή χωρίστηκε σε 4 κατηγορίες με βάση τα κλινικά στοιχεία των ασθενών και το ιστορικό τους (πίνακας 6). Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί ότι πάσχουν από SRNS και FSGS ή DMS με βάση τα κριτήρια: (1) πρωτεϊνουρία $>40\text{mg}/\text{m}^2/\text{h}$, (2) αλβουμιναιμία $<2,5\text{ g}/\text{dl}$, (3) οίδημα και (4) ανθεκτικότητα σε στεροειδή (δηλαδή η έλλειψη ανταπόκρισης σε θεραπεία πρεδνιζόνης $2\text{ mg}/\text{kg}$ ανά μία μέρα για έναν μήνα ακολουθούμενη από τρεις ώσεις μεθυλ-πρεδνιζολόνης $1\text{g}/1,73\text{ m}^2$). Ύφεση του SRNS ορίζεται ως η μείωση της πρωτεϊνουρίας σε $<4\text{ mg}/\text{m}^2/\text{h}$.

Τύπος νεφρωσικού συνδρόμου	ασθενείς/ομάδα	φύλο	
		άρρεν	θήλυ
Infantile Recessive Nephrotic Syndrome (IR-SRNS)	7	3	5
Familial Recessive Nephrotic Syndrome (FR-SRNS)	8	4	4
Familial Dominant Nephrotic Syndrome (FD-SRNS)	14	6	8
Sporadic Recessive Nephrotic Syndrome (SR-SRNS)	22	11	11
Σύνολο ασθενών	51	24	27

Πίνακας 5: Κατηγορίες ασθενών που πήραν μέρος στην έρευνα με βάση τα κλινικά ευρήματα και το ιστορικό τους.

Από τους 7 ασθενείς με συγγενές υπολειπόμενο SRNS (μέση ηλικία 1 έτους), 4 (57%) παρουσίασαν DMS στην βιοψία νεφρού και 3 (43%) FSGS. Κανένας δεν

ανταποκρίθηκε σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη Α ή/και μυκοφαινολάτη. Τέσσερις (57%) παρουσίασαν τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια.

Από τους 8 ασθενείς (μέση ηλικία 5 ετών, δείγματα από 3 οικογένειες) με οικογενές υπολειπόμενο SRNS οι 6 (75%) παρουσίασαν FSGS, ένας (12%) MCD και σε έναν δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα βιοψία. Από τους 5 που δέχθηκαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη Α ή κυκλοφωσφαμίδη οι 2 (40%) δεν ανταποκρίθηκαν, ένας (20%) παρουσίασε μερική ανταπόκριση και 2 (40%) ανταποκρίθηκαν. Πέντε (62.5%) περιστατικά εξελίχθηκαν σε τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια και από αυτούς 4 (80%) μεταμοσχεύθηκαν, με τον έναν να επανεμφανίζει τη νόσο στο μόσχευμα.

Οι 14 ασθενείς με οικογενές επικρατητικό SRNS ανήκουν σε 6 οικογένειες με επικρατητικό τύπο κληρονομικότητας. Περιλαμβάνουν 6 άρρενα και 8 θήλεα άτομα. Το έτος έναρξης της νόσου κυμαίνεται από το 10^ο μέχρι το 29^ο έτος.

Από τους 22 ασθενείς με σποραδικά υπολειπόμενο SRNS (μέση ηλικία 4 ετών) όλοι παρουσίασαν FSGS στα ιστολογικά ευρήματα (100%). Δεκαπέντε (68%) δεν ανταποκρίθηκαν σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη Α και κυκλοφωσφαμίδη, 6 ανταποκρίθηκαν μερικώς, και ένας ανταποκρίθηκε πλήρως. Οχτώ (36.3%) ασθενείς παρουσίασαν τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια.

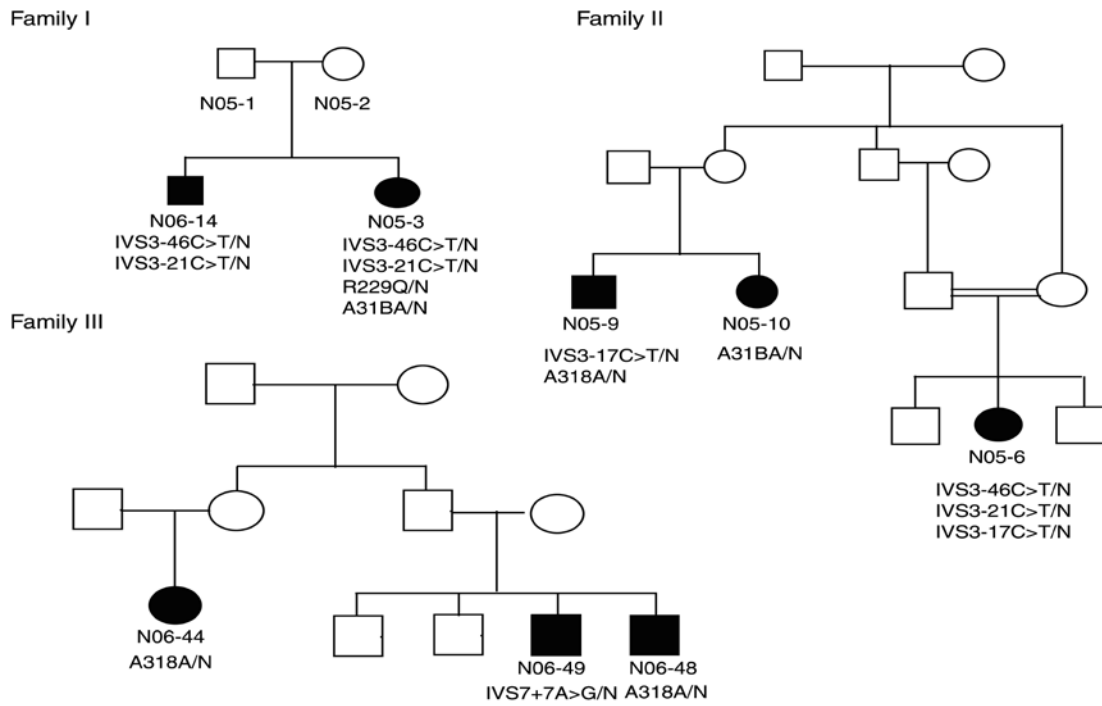
Κωδικός μελέτης	Φύλο	έτος έναρξης νόσου	βιοψία νεφρού	θεραπεία CP/CSA/MMF	τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια (έτη από έναρξη νόσου)	Μεταμόσχευση νεφρού (έτη από έναρξη νόσου)	Υποτροπή στο μόσχευμα (έτη από μεταμόσχευση)	άρθρο αναφοράς
Συγγενές υπολειπόμενο SRNS								
IR-SRNS-01	A	2 εβδομάδες	DMS	NR	NAI	-	-	
IR-SRNS-02	Θ	2 εβδομάδες	DMS	CsA (NR)	1	OXI	-	B
IR-SRNS-03	Θ	2	FSGS	CsA, MMF (NR)	OXI	-	-	A
IR-SRNS-04	Θ	2 εβδομάδες	DMS	NR	9 μηνών			
IR-SRNS-05	A	1	DMS	NR	NAI			
IR-SRNS-06	Θ	2 μηνών	FSGS	NR				
IR-SRNS-07	A	1,5	FSGS	NR	OXI	-		
ΣΥΝΟΛΟ 7								
Οικογενές υπολειπόμενο SRNS								
FR-SRNS-01a	Θ	5	FSGS	CP(NR)	4	7	1	A
FR-SRNS-02a	A	18	FSGS	0	2	NAI	OXI	A
FR-SRNS-03b	Θ	2	FSGS	0	3	OXI	-	A
FR-SRNS-04b	A	3	FSGS	0	1	1	OXI	A
FR-SRNS-05b	Θ	5	FSGS	CP(NR)	1	2	OXI	A
FR-SRNS-06c	A	4	MCD	CsA (R)	OXI	-	-	A
FR-SRNS-07c	A	5	N	CsA (R)	OXI	-	-	A
FR-SRNS-08c	Θ	2 ^{1/2}	FSGS	CsA (PR)	OXI	-	-	A
ΣΥΝΟΛΟ 8								
Οικογενές επικρατητικό SRNS								
FD-SRNS-01a	A		FSGS					
FD-SRNS-02a	A	29	FSGS		NAI	NAI	NAI	
FD-SRNS-03b	Θ		FSGS					
FD-SRNS-04b	Θ		FSGS					
FD-SRNS-05b	Θ		FSGS					
FD-SRNS-06c	Θ	16	FSGS					
FD-SRNS-07c	A		FSGS					
FD-SRNS-08d	Θ		FSGS					
FD-SRNS-09d	A		FSGS					
FD-SRNS-10d	Θ		FSGS					
FD-SRNS-11e	Θ	10	FSGS		OXI			
FD-SRNS-12e	Θ	20	FSGS		NAI			
FD-SRNS-14f	A	50	FSGS					
FD-SRNS-15f	A	10	FSGS	R				
ΣΥΝΟΛΟ 14								

Σποραδικό υπολειπόμενο SRNS	Φύλο	έτος έναρξης νόσου	βιοψία νεφρού	θεραπεία CP/CSA/MMF	τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια (έτη από έναρξη νόσου)	Μεταμόσχευση νεφρού (έτη από έναρξη νόσου)	Υποτροπή στο μόσχευμα (έτη από μεταμόσχευση)	άρθρο αναφοράς
SR-SRNS-01	Θ	4	FSGS	CsA, MMF (PR)	OXI	–	–	A
SR-SRNS-02	Θ	3 ^{1/2}	FSGS	CsA, MMF (NR)	OXI	–	–	A
SR-SRNS-03	Θ	6	FSGS	CP(NR), CsA (P)	10	16	–	A, B
SR-SRNS-04	Θ	4	FSGS	CsA (NR)	2	3	OXI	A
SR-SRNS-05	Θ	2	FSGS	CsA (P)	OXI	–	–	A, B
SR-SRNS-06	Θ	8	FSGS	CsA, CP (NR)	2	3, 4	NAI (2 φορές)	A
SR-SRNS-07	Θ	3	FSGS	CP(NR)	5	7	OXI	A
SR-SRNS-08	A	8	FSGS	CsA, CP (NR)	6	9	OXI	A
SR-SRNS-09	A	4	FSGS	CsA, CP (NR)	11	1	OXI	
SR-SRNS-10	Θ	3	FSGS	CP (NR)	2	10, 14, 16	NAI (3 φορές)	A
SR-SRNS-11	A	7	FSGS	CsA, MMF (PR)	5	OXI	–	A
SR-SRNS-12	A	4	FSGS	CsA, CP (PR)	OXI	–	–	A
SR-SRNS-13	Θ	5	FSGS	CsA (PR)	OXI	–	–	A, B
SR-SRNS-14	A	2 ^{1/2}	FSGS	CsA (R)	OXI	–	–	A
SR-SRNS-15	A	4	FSGS	CsA (NR)	OXI	–	–	
SR-SRNS-16	Θ	2	FSGS	CsA, MMF (NR)	OXI	–	–	A
SR-SRNS-17	A	4	FSGS	CsA (NR)	OXI	–	–	
SR-SRNS-18	Θ	8	FSGS	CsA (NR)	OXI	–	–	
SR-SRNS-19	A	2	FSGS	CsA (NR)	OXI	–	–	
SR-SRNS-20	A	1	FSGS	CsA (NR)	OXI	–	–	
SR-SRNS-21	A	7	FSGS	CsA (NR)	OXI	–	–	
SR-SRNS-22	A	3 ^{1/2}	FSGS	CsA, CP (NR)	OXI	–	–	

ΣΥΝΟΛΟ 22

Πίνακας 6: συγκεντρωτικός πίνακας με τα κλινικά στοιχεία όλων των ασθενών. CsA (κυκλοσπορίνη A), CP (κυκλοφωσφαμίδη), MMF (μυκοφαινολάτη), NR (καμία ανταπόκριση), PR (μερική ανταπόκριση), R (ανταπόκριση), A (Megremis et al., 2009), B (Megremis et al., 2011)

Δείγματα αίματος λήφθηκαν και από τους γονείς όλων των ασθενών προκειμένου να διευκρινιστεί ο τύπος κληρονομικότητας των νουκλεοτιδικών αλλαγών. Στην περίπτωση των οικογενών περιστατικών με υπολειπόμενη κληρονομικότητα, δείγματα λήφθηκαν από όσο το δυνατό περισσότερα μέλη της οικογένειας. Στην έρευνα συμμετείχαν ως ομάδα ελέγχου για την αξιολόγηση των μοριακών ευρημάτων 100 υγιή άτομα ηλικίας 18-30 ετών χωρίς ιστορικό NS.



Εικόνα 6: Οικογενή περιστατικά με υπολειπόμενο SRNS (FR-SRNS) και οι νουκλεοτιδικές αλλαγές που ανιχνεύθηκαν σε αυτά. Δείγματα DNA απομονώθηκαν από όλα τα μέλη των οικογενειών που παρουσιάζονται στα γενεαλογικά δέντρα. (Megremiset al., 2009)

2.2 Σχεδιασμός Μοριακής Ανάλυσης των γονιδίων NPHS2, WT1, ACTN4

Η μοριακή ανάλυση των τριών γονιδίων περιλαμβάνει την λήψη περιφερικού αίματος, την απομόνωση DNA από τους ασθενείς και την ομάδα ελέγχου και την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τις επιλεγμένες περιοχές-στόχους. Η διερεύνηση των νουκλεοτιδικών αλλαγών πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου «resequencing» κατά Sanger. Για το γονίδιο της ποδοκίνης, προηγήθηκε μια πρώτη ανάλυση με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού. Οι ασθενείς στους οποίους αναγνωρίστηκαν παθολογικές μεταλλάξεις του γονιδίου WT1 υποβλήθηκαν σε χρωμοσωμικό έλεγχο σε συνεργασία με το τμήμα κυτταρογενετικής του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Σαν πρώτο στάδιο η εξέταση του γονιδιώματος περιλαμβάνει την απομόνωση του γενωμικού υλικού (DNA) από περιφερικό αίμα σε σωληνάρια EDTA υπό αυστηρά ασηπτικές συνθήκες χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο πακέτο αντιδραστηρίων «QIAmpDNABloodMiniKit (Qiagen, Hilden, Germany) το οποίο συνδυάζει τη χρήση σωληναρίων με μεμβράνη διαχωρισμού σιλκόνης και την κλασική μέθοδο απομόνωσης DNA από ολικό αίμα με χρήση πρωτεΐνάσης και αλκοόλης. Το εγχειρίδιο μπορεί να βρεθεί στην ηλεκτρονική διεύθυνση [«http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsyst](http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsyst)

[em/qiaampdnaminikit.aspx#Tabs=t1»](#). Από 200 μl περιφερικού αίματος απομονώθηκαν περίπου 4-12 μg DNA.

2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια ενζυμική μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (Mullis and Faloona 1987; Mullis 1990). Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή μεγάλου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας (Bej 1994; Abramson 1995). Η αντίδραση απαιτεί την παρουσία του ενζύμου DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιεί το μονόκλωνο τμήμα DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου και ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών μορίου (εκκινητή, primers) για την έναρξη της σύνθεσης του DNA . Οι εκκινητές υβριδίζονται σε συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και η σύνθεση συμπληρωματικών ακολουθιών, πραγματοποιείται με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase). Η αντίδραση που πραγματοποιείται περιλαμβάνει τρία επαναλαμβανόμενα στάδια:

Στάδια της PCR:

- Αποδιάταξη της έλικας του DNA (**denaturation**) ~ 94 °C
- Υβριδισμός των εκκινητών (primer) στα επιθυμητά σημεία του DNA (**annealing**) ~ 54 °C
- Επιμήκυνση του επιλεγμένου τμήματος του DNA (**extension**) ~ 72 °C

Το αποτέλεσμα της PCR είναι ορατό σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου μεταφέρεται το προϊόν της PCR, ηλεκτροφορείται και βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο.

2.2.3 Σχεδιασμός PCR για περιοχές του γονιδίου NPHS2

Σχεδιάσθηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό όλων των εσωνίων (8 εσώνια) του γονιδίου της ποδοκίνης (NPHS2) περιλαμβάνοντας 100 νουκλεοτίδια εκατέρωθεν των εσωνίων στην μη κωδικοποιούσα περιοχή (εξώνια) με βάση την αλληλουχία του γονιδίου η οποία είναι διαθέσιμη στις βάσεις δεδομένων «NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>» και «ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>». Οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών, οι θερμοκρασίες επικόλλησης των εκκινητών και τα μεγέθη των πολλαπλασιαζόμενων τμημάτων του γονιδίου περιγράφονται από τους Megremis *et al.*, 2009. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 25 μl, αποτελούμενη από 12,5 μl διαλύματος A (dNTPs/MgCl₂/Taq polymerase), 1 μM ζεύγους εκκινητών και 30-50 ngDNA. Όλες οι PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή «Techne Flexigene Thermocycler (Krackeler Scientific, Albany, NY)».

2.2.4 Σχεδιασμός PCR για περιοχές του γονιδίου WT1

Σχεδιάσθηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των εσωνίων 8 και 9 του γονιδίου WT1 περιλαμβάνοντας 100 νουκλεοτίδια εκατέρωθεν των εσωνίων στην μη κωδικοποιούσα περιοχή (εξώνια) με βάση την αλληλουχία του γονιδίου η οποία είναι διαθέσιμη στις βάσεις δεδομένων «NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>» και «ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>». Οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες των

εκκινητών και οι συνθήκες των PCR περιγράφονται στο άρθρο των Megremisetal.,2011. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 25 μl, αποτελούμενη από 12,5 μl διαλύματος A (dNTPs/MgCl₂/Taq polymerase), 1 μM ζεύγους εκκινητών και 30-50 ng DNA. Όλες οι PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή «Techne Flexigene Thermocycler (Krackeler Scientific, Albany, NY)».

2.2.5 Σχεδιασμός PCR για περιοχές του γονιδίου ACTN4

Σχεδιάστηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό όλων των εσωνίων του γονιδίου WT1 περιλαμβάνοντας 100 νουκλεοτίδια εκατέρωθεν των εσωνίων στην μη κωδικοποιούσα περιοχή (εξώνια) με βάση την αλληλουχία του γονιδίου η οποία είναι διαθέσιμη στις βάσεις δεδομένων «NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>» και «ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>». Οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και οι συνθήκες των PCR φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

ACTN4 εσώνιο	εκκινητής 1 (5'-3')	εκκινητής 2 (5'-3')	T _m (°C)
1	TGAAGCAGCTGAAGCGGCGGT	CGATTCTCCTCAGGACTCCAATCCCT	60
2/3	CGACTCTGCGCACTGTCCTTTGTT	CTAAAGGTCAGAAACCGAGCAGGA	58
4	TGGAGCCTTCTCTAGATGG	ACTGAGATGAGGCTGTGAGAGCAA	58
5	CGACTTGGGCTGAGTTCTGAGGGTTT	AAACTGCCTCCTTTCCTCAGAGA	57
6	GCCAGACTGCAGTGAATGGGAATTAG	AATAAGGGAGGTGAGAGTCAGCCA	57
7	TCACACATCACACGTGGCTGAGAA	CGAATCATTAGCCCTTCTTGCTGGC	59
8	CGCTCGGGCAGTTTAACCTTGTGT	AAGAGAAATGAGGTGAGCACGGGA	57
9	ATGGACCAGCTGCTTCAAGGGA	CGAACACTGTCCCTGAGCATCTCTGTA	57
10	CGTCAAAGATCCAGATCCCATGTGCC	CCATGTCCCACAGGACATCAACAA	58
11	CGAGCAAAGCATGACACAGACATGACC	CACATGCTCCCAAGCAGCAAGAAA	58
12	CGTGTCAATTGGCATGGAAGGATGTGG	TGTGGTGAGAGCCAGGTGATGATA	58
13/14	TGGGTCCAATCCATCTAGCCACTT	ACAGAGGCTCTTGGGAAGATGGG	58
15/16	CGCCCCATCTTCCCAAGAGCCT	AGAATTGGGACCTGCTCTGCCA	60
17	GCTCCTCCAGGTGGTCAGT	CGCTCCCAAAGTGCTGGTCTCTCAA	60

18	TGAACCACGGTGAGGACAGTTCA	ACGCTCAGCAACTGTGATGGGAAT	59
19	CGCATCTCCTTGTCCATGTTGCCTCT	AGAGAGCAGTTAATGCCATGGTCC	57
20/21	CGCCCACTAAATGTCGGGTGTCCC	GGGTGTTGGGTCAGGTCTCT	57

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών που σχεδιάσθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των περιοχών στόχων του γονιδίου ACTN4

Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 25 μ l, αποτελούμενη από 12,5 μ l διαλύματος A (dNTPs/MgCl₂/Taq polymerase), 1 μ M ζεύγους εκκινητών και 30-50 ng DNA. Όλες οι PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή «Techne Flexigene Thermocycler (Krackeler Scientific, Albany, NY)».

2.2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Η μέθοδος DGGE είναι ικανή να διαχωρίσει μικρές διαφορές στην θερμική συμπεριφορά μικρών τμημάτων αλληλουχίας DNA (200-700 bp) οι οποίες διαφέρουν μέχρι και κατά ένα νουκλεοτίδιο. Όταν ένα τμήμα DNA υπόκειται σε αυξανόμενο περιβάλλον αποδιάταξης, λιώνει κατά ένα ποσοστό. Όσο οι συνθήκες αποδιάταξης αυξάνονται το δίκλωνο μόριο DNA αποδιατάσσεται ολοκληρωτικά. Ο ρυθμός κίνησης των θραυσμάτων DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης αλλάζει ως αποτέλεσμα του φυσικού σχήματος των θραυσμάτων. Τα θραύσματα τα οποία δεν έχουν αποδιαταχθεί πλήρως μετακινούνται πιο αργά κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα από ότι τα αντίστοιχα θραύσματα που παρουσιάζουν πλήρη αποδιάταξη. Όταν ένα θραύσμα DNA με διπλή έλικα ηλεκροφορηθεί σε πήκτωμα με αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικών παραγόντων, λιώνει κατά ένα ποσοστό με αποτέλεσμα να μειώνεται η κινητικότητα του λόγω αλλαγών στο σχήμα του. Πρακτικά, οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι η θερμοκρασία (συνεχής θερμοκρασία στους 60°C) και η αναλογία φορμαμίδου (0-

40%) και ουρίας (0-7 M). Η θέση στο πήκτωμα όπου μια περιοχή ενός θραύσματος DNA λιώνει και για αυτό το λόγο σταματάει η κίνησή του στο πήκτωμα εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του θραύσματος. Έτσι πολύ μικρές διαφορές στην αλληλουχία σχεδόν ίδιων τμημάτων DNA σταματούν την κίνησή τους σε διαφορετικές θέσεις στο πήκτωμα. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να πραγματοποιηθεί ανίχνευση νουκλεοτιδικών αλλαγών σε DNA-στόχους (Fischer and Lerman 1983) .

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DGGE σαν μια πρώτη μέθοδος ανίχνευσης νουκλεοτιδικών αλλαγών στις περιοχές στόχους του γονιδίου της ποδοκίνης (NPHS2) όπως έχουν οριστεί και σχεδιασθεί στην PCR. Οι συνθήκες της ανάλυσης είναι:

Εσώνιο	χρόνος ηλεκροφόρησης (h)	τάση ρεύματος (V)	κλίση αποδιατακτικού(%)	συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%)
2	22	68	35_75	6
3	20	68	0_60	6_12
4	20	68	0_60	6_12
5	22	68	5_65	6_12
8	22	68	20_80	6

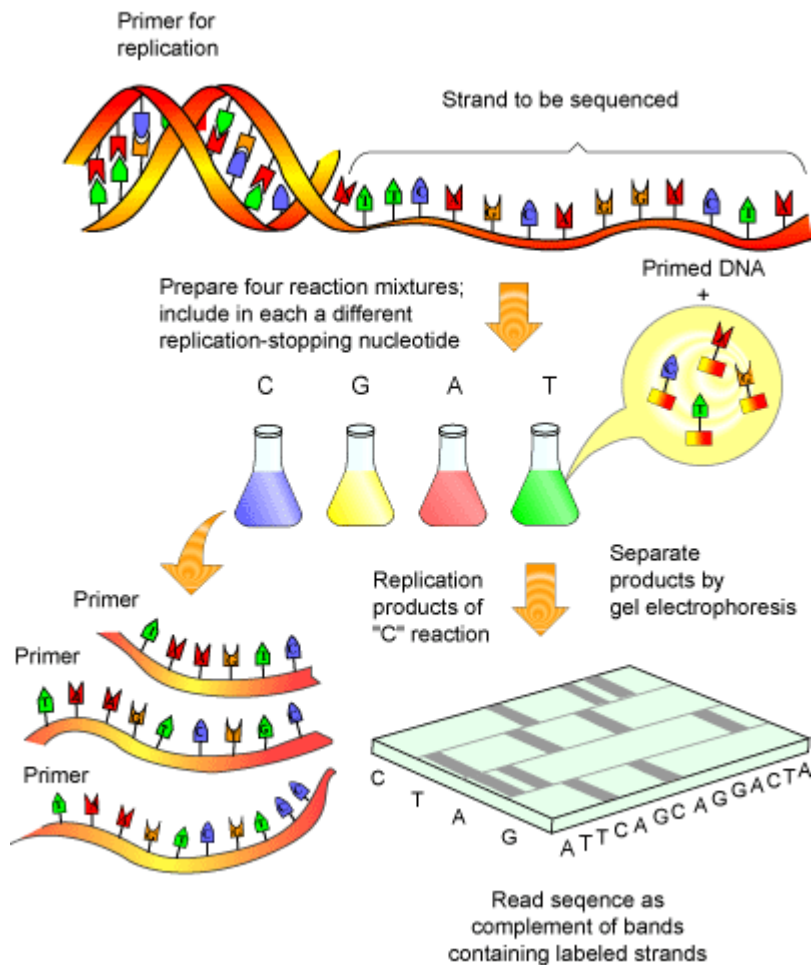
Πίνακας 8: Συνθήκες DGGE για έλεγχο μεταλλάξεων στο γονίδιο NPHS2 (ποδοκίνη) Όλες οι PCR έτρεξαν στους 60°C σε διάλυμα 1xTAE (40mMTrisacetate, 1 mMEDTA, pH 8,2-8,5) (Megremis, Mitsioni et al. 2009).

2.2.7 Ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με τη μέθοδο «resequencing»

Τα δείγματα της παρούσης μελέτης αναλύθηκαν με τη μέθοδο resequencing. Η αντίδραση της resequencing PCR πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο πακέτο αντιδραστηρίων «7-Deaza-DGTPCy5/Cy5.5 Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany)» στον αναλυτή «Open Gene Visgen

automated sequencer (Visgen, Ontario, Canada)». Τα αποτελέσματα διαβάστηκαν με το λογισμικό «Unix Based Gene Objects 3.1».

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρησιμοποίηση τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοσιδίων, δηλαδή παραγώγων των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων χωρίς την 3' –υδροξυλομάδα. Καθαρό DNA συντίθεται in vitro σε ένα μείγμα που περιέχει μονόκλιωνα μόρια του DNA προς ανάλυση, το ένζυμο πολυμεράση, έναν μικρό DNA εκκινητή, που βοηθά την πολυμεράση να αρχίσει την αντιγραφή, και τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Αν ένα ανάλογο διδεοξυριβονουκλεοσίδιο ενός από τα νουκλεοτίδια προστεθεί στο μείγμα των νουκλεοτιδίων, θα ενσωματωθεί σε μία αυξανόμενη αλυσίδα DNA. Η αλυσίδα δεν διαθέτει πλέον ένα 3' –OH, οπότε αναστέλλεται η προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου και η αλυσίδα του DNA σταματά σε αυτό το σημείο (**εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Για τον καθορισμό της πλήρους αλληλουχίας ενός κλάσματος DNA, το δίκλωνο DNA αρχικά διαχωρίζεται στους επιμέρους κλώνους του και ένας από τους κλώνους χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τις περισσότερες αντιδράσεις. Τέσσερα διαφορετικά τριφωσφωρικά διδεοξυριβονουκλεοσίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) χρησιμοποιούνται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις σύνθεσης αντιγράφων του ίδιου μονόκλωνου DNA εκμαγείου. Κάθε αντίδραση παράγει μια ομάδα μορίων DNA που σταματούν σε διαφορετικά σημεία της αλληλουχίας. Τα προϊόντα των τεσσάρων αυτών αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε τέσσερις παράλληλες στήλες μιας πηκτής πολυακρυλαμίδης. Τα νεοσυντεθειμένα κλάσματα ανιχνεύονται από ένα δείκτη (ραδιενεργό ή φθορίζοντα) που έχει ενσωματωθεί είτε στον εκκινητή είτε σε ένα από τα τριφωσφωρικά δεοξυριβονουκλεοσίδια που χρησιμοποιούνται για την επέκταση του DNA. Σε κάθε στήλη, οι ζώνες αναπαριστούν κλάσματα που έχουν τερματισθεί σε ένα ορισμένο νουκλεοτίδιο αλλά σε διαφορετικές θέσεις του DNA. Η αλληλουχία του νεοσυντεθειμένου κλώνου μπορεί να καθοριστεί με ανάγνωση των ζωνών, αρχίζοντας από το κάτω άκρο της πηκτής. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε ειδικά προγράμματα υπολογιστών και παρουσιάζονται με τη μορφή γραφικής παράστασης (Maxam and Gilbert 1977; Sanger, Nicklen et al. 1977; Zimmermann, Voss et al. 1988).

2.2.8 *In Silico* ανάλυση αποτελεσμάτων

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη παρούσα μελέτη δόθηκε στις βάσεις δεδομένων οι οποίες χρησιμοποιώντας φυσικοχημικές ιδιότητες αμινοξέων και πρωτεϊνών μπορούν να «προβλέψουν» το πιθανό αποτέλεσμα μιας νουκλεοτιδικής αλλαγής στην κωδικοποιούσα περιοχή ενός γονιδίου στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Η χρήση της βιοπληροφορικής στην μοριακή έρευνα κερδίζει συνεχώς μεγάλο έδαφος και χρησιμοποιείται καθημερινά προκειμένου να αναλυθούν και να ερμηνευθούν πολλά και διαφορετικά αποτελέσματα. Για την αξιολόγηση των νουκλεοτιδικών αλλαγών που ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές βάσεις δεδομένων οι οποίες μπορούν να βρεθούν στον κυβερνοχώρο:

1. PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen>). Με βάση τις φυσικές ιδιότητες των πρωτεϊνών μπορεί να προσομοιώσει το πιθανό αποτέλεσμα μιας μη-συνώνυμης νουκλεοτιδικής αλλαγής στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης (Ramensky, Bork et al. 2002).
2. Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT, <http://blocks.fhrc.org/SIFT.html>) Με βάση τις φυσικές ιδιότητες των πρωτεϊνών μπορεί να προσομοιώσει το πιθανό αποτέλεσμα μιας μη-συνώνυμης νουκλεοτιδικής αλλαγής στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης (Henikoff, Greene et al. 2002).
3. ESE-finder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder>), προσομοιώνει το αποτέλεσμα νουκλεοτιδικών αλλαγών στην δυνατότητα πρόσδεσης πρωτεϊνών πλούσιων σε αργινίνη/σερίνη στο DNA-στόχο και πώς αυτή η πρόσδεση μπορεί να επηρεάσει τη σωστή λειτουργία του ματίσματος (Cartegni, Wang et al. 2003).

4. Automated Splice Site Analyses (<http://splice.cmh.edu/index.html>) η οποία προσομοιώνει το αποτέλεσμα νουκλεοτιδικών αλλαγών στο μηχανισμό του ματίσματος(Nalla and Rogan 2005) .

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

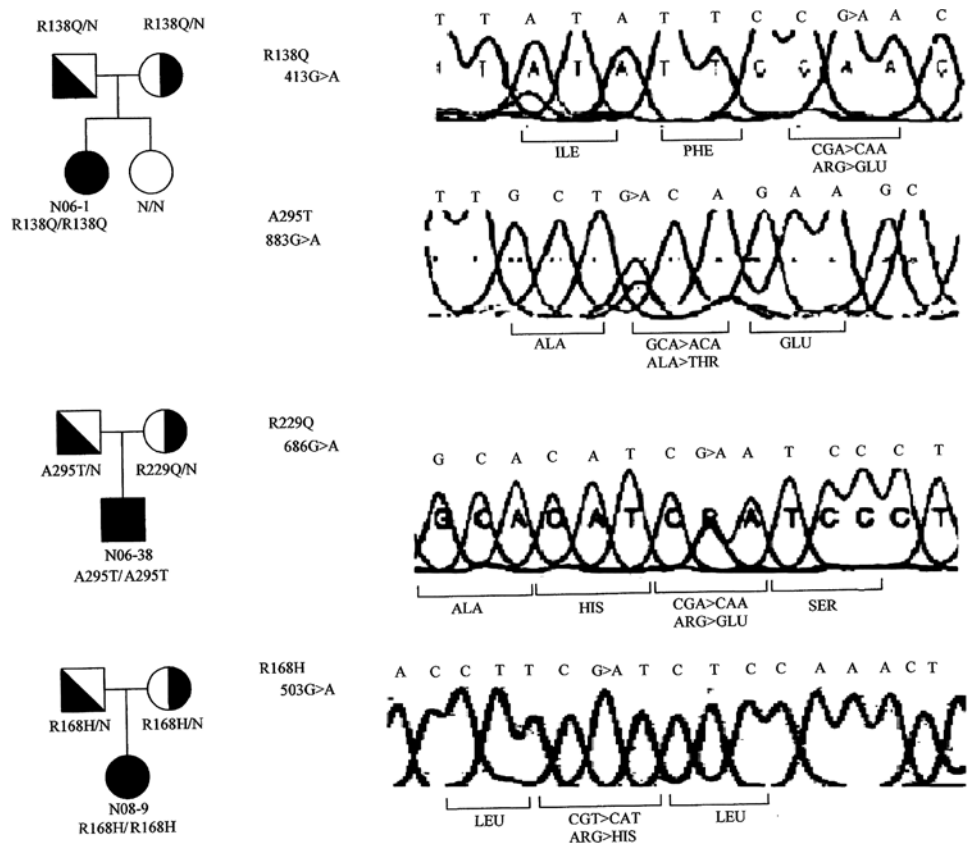
3.1 Ανάλυση νουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου της ποδοκίνης (NPHS2)

Όλες οι νουκλεοτιδικές αλλαγές που ανιχνεύτηκαν κατά τον έλεγχο του γονιδίου NPHS2 αναφέρονται στον πίνακα 9.

	Νουκλεοτιδικές αλλαγές σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου NPHS2						
αλλαγή νουκλεοτιδίου	IVS3-46C>T	IVS3-21C>T	IVS3-17C>T	IVS7+7A>G			
Συγγενές υπολειπόμενο SRNS (7)	2 (h)	2 (h)		1 (h)			
Οικογενές υπολειπόμενο SRNS (8)	3 (h)	3 (h)	2 (h)	1 (h)			
Οικογενές επικρατητικό SRNS (14)	7 (h), 1 (H)	7 (h), 1 (H)		1 (h)			
Σποραδικό υπολειπόμενο SRNS (22)	7 (h)	7 (h)		2 (h)			
% συχνότητα σύνολο αλληλόμορφων (102 αλ.)	20,5	20,5	1,9	4,9			
ομάδα ελέγχου: % συχνότητα αλληλόμορφων (200 αλ.)	16	16	0	3			
	Νουκλεοτιδικές αλλαγές σε κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου NPHS2						
αλλαγή αμινοξέος	p.S96S (Ser>Ser)	p.R138Q (Arg>Gln)	p.R168H (Arg>His)	p.R229Q (Arg>Gln)	p.A295T (Ala>Thr)	p.A318A (Ala>Ala)	p.L346L (Leu>Leu)
αλλαγή νουκλεοτιδίου	c.288C>T	c.413G>A	c.503G>A	c.686G>A	c.883G>A	c.954T>C	c.1038A>G
Συγγενές υπολειπόμενο SRNS (7)				1 (h)		1 (H)	
Οικογενές υπολειπόμενο SRNS (8)				1 (h)		4 (h)	
Οικογενές επικρατητικό SRNS (14)	3 (h)					5 (h)	3 (h)
Σποραδικό υπολειπόμενο SRNS (22)	1 (h)	1 (H)	1 (H)	2 (h)	1(h)	8 (h), 2 (H)	1 (h)
% συχνότητα σύνολο αλληλόμορφων (102 αλ.)	3,9	1,9	1,9	3,9	0,9	22,5	3,9
ομάδα ελέγχου: % συχνότητα αλληλόμορφων (200 αλ.)	1	0	0	1,5	0	20	0,5

Πίνακας 9: νουκλεοτιδικές αλλαγές σε εσώνια και εξώνια των περιοχών στόχων του γονιδίου NPHS2 ανά κλινική ομάδα και την ομάδα ελέγχου. (h:ετεροζυγώτης, H: ομοζυγώτης)

Παθολογικοί γονότυποι αναγνωρίστηκαν σε 3 από τους 22 ασθενείς με σποραδικό υπολειπόμενο SRNS (15%) (εικόνα 8) και σε κανένα από τις υπόλοιπες κλινικές ομάδες.



Εικόνα 8: αποτελέσματα από την ανίχνευση παθολογικών μεταλλάξεων ασθενών με SRNS με τη μέθοδο re-sequencing. Στα γενεασολογικά δέντρα φαίνεται ο τρόπος κληρονομής των μεταλλάξεων. (Megremis et al., 2009)

Από τους 3 σποραδικούς ασθενείς με παθολογικό γονότυπο, ο ασθενής SRNS-04 ήταν ομοζυγώτης για την γνωστή από την βιβλιογραφία μετάλλαξη p.R138Q (Boute, Gribouval et al. 2000; Karle, Uetz et al. 2002; Franceschini, North et al. 2006). Η μετάλλαξη αυτή βρίσκεται στο εσώνιο 3 του γονιδίου της ποδοκίνης (c.413G>A) και οφείλεται στην αντικατάσταση της αργινίνης στην θέση 138 της πρωτεΐνης από την γλουταμίνη.

Στον ασθενή SR-SRNS-16 βρέθηκε σε ομοζυγωτία η μετάλλαξη p.R168H η οποία έχει επίσης περιγραφεί στην βιβλιογραφία (Yu, Ding et al. 2004). Πρόκειται για την νουκλεοτιδική αλλαγή c.503G>A στο εσώνιο 4 του γονιδίου NPHS2 η οποία προκαλεί την αντικατάσταση του αμινοξέος αργινίνης σε ιστιδίνη.

Στον ασθενή SR-SRNS-12 ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις p.A295T (c.883G>A) στο εσώνιο 8 και p.R229Q (c.686G>A) στο εσώνιο 5 του γονιδίου NPHS2 σε ετεροζυγωτία. Η μετάλλαξη p.A295T αναφέρεται για πρώτη φορά στη παρούσα μελέτη, ενώ η p.R229Q είναι χαρακτηρισμένη στη διεθνή βιβλιογραφία (Boute, Gribouval et al. 2000). Η μετάλλαξη p.A295T προσομοιώθηκε στις βάσεις δεδομένων SIFT και PolyPhen και θεωρείται παθολογική καθώς καταστρέφει τη φυσιολογική δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα άτομα της ομάδας ελέγχου (200 αλλήλια).

Η μετάλλαξη p.R229Q βρέθηκε ακόμα σε 3 ασθενείς από τις κλινικές ομάδες FR-SRNS-01, IR-SRNS-06 και SR-SRNS-20 στο 1 από τα 2 αλληλόμορφα. Ανιχνεύθηκε επίσης στον υγιή πατέρα του ασθενούς FR-SRNS-01 καθώς και σε 3 από τα 200 αλλήλια της ομάδας ελέγχου.

Οι 2 «*in cis*» νουκλεοτιδικές αλλαγές IVS3-46C>T και IVS3-21C>T στο εξώνιο 3 βρέθηκαν σε ομόζυγη κατάσταση σε 1 ασθενή και σε ετεροζυγωτία σε 19 ασθενείς από τους 51 (σύνολο 20,5% αλληλόμορφων), ενώ εντοπίστηκαν σε 32 από τα 100 άτομα ελέγχου (16% αλληλόμορφων). Η νουκλεοτιδική αλλαγή IVS7+7A>G στο εξώνιο 7 εντοπίστηκε σε 5 ασθενείς (4,9% αλληλόμορφων) και σε 3% αλληλόμορφων στην ομάδα ελέγχου. Οι αλλαγές αυτές έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία και θεωρούνται πολυμορφισμοί. Η νουκλεοτιδική αλλαγή IVS3-17C>T

στο εξώνιο 3 αναφέρεται στη παρούσα μελέτη για πρώτη φορά. Ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία σε 2 ασθενείς και σε κανένα άτομο της ομάδας ελέγχου. Η αλλαγή αυτή βρίσκεται στην πολυπυριμιδική οδό του εξωνίου 3. Νουκλεοτιδικές αλλαγές στη περιοχή αυτή έχει βρεθεί ότι μπορούν να αλλάξουν το μάτισμα ενός γονιδίου. Επειδή δεν ήταν δυνατή η χρήση ιστού από τη βιοψία νεφρού, για την πειραματική απόδειξη αυτής της υπόθεσης έγινε χρήση *in silico* εργαλείων. Η ανάλυση έδειξε ότι η αλλαγή αυτή δεν μπορεί να αλλάξει το φυσιολογικό μάτισμα του γονιδίου.

Οι συνώνυμες νουκλεοτιδικές αλλαγές c.288C>T (p.S96S εσώνιο 2), c.954T>C (p.A318A εσώνιο 8) και g.1038A>G (p.L346L εσώνιο 8) βρέθηκαν τόσο σε ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου και είναι πολυμορφικές με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Franceschini, North et al. 2006).

3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου WT1

Η ανίχνευση των νουκλεοτιδικών αλλαγών στα εσώνια 8 και 9 του γονιδίου WT1 αποκάλυψε 3 γνωστές σημειακές μεταλλάξεις σε 4 ασθενείς: IR-SRNS-02, SR-SRNS-03, SR-SRNS-05 και SR-SRNS-13 (πίνακας 6).

Στον ασθενή IR-SRNS-02 εντοπίστηκε η *de novo* σημειακή μετάλλαξη p.R366H (c.1097G>A) στο εσώνιο 8 όπου οδηγεί στην αντικατάσταση της αργινίνης 366 σε ιστιδίνη και έχει περιγραφεί στην διεθνή βιβλιογραφία (Borel, Barilla et al. 1996). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη αλλάζει την αργινίνη 366 η οποία βρίσκεται στην περιοχή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στους υποκινητές γονιδίων (Haber, Buckler et al. 1990; Hamilton, Barilla et al. 1995) (Mitchell, Simon et al. 1989). Οι ασθενείς SR-SRNS-03 και SR-SRNS-13 είναι ετερόζυγοι για την *de novo* σημειακή μετάλλαξη p.R394W. Το αμινοξύ αργινίνη στη θέση 394 της πρωτεΐνης βρίσκεται στην περιοχή πρόσδεσής της με αλληλουχίες DNA πλούσιες σε γουανίνη. Η αντικατάστασή του από τρυπτοφάνη εμποδίζει τη δημιουργία της σύνδεσης αυτής όπως έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία (Mitchell, Simon et al. 1989; Haber, Buckler et al. 1990; Hamilton, Barilla et al. 1995). Στον ασθενή SR-SRNS-05 εντόπιστηκε η *de novo* σημειακή νουκλεοτιδική αλλαγή στο εξώνιο 9 1228+5G>A. Πρόκειται για αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη, 5 βάσεις μετά το τέλος του εσωνίου 9 (5' άκρο εξωνίου 9) η οποία αλλάζει το φυσιολογικό μάτισμα του γονιδίου και προκαλεί αλλαγή στον λόγο των πρωτεϊνικών ισομορφών της πρωτεΐνης +KTS/-KTS. Η ισομορφή (+)KTS περιέχει τρία επιπρόσθετα αμινοξέα

(λυσίνη, θρεονίνη και σερίνη). Η αναλογία KTS(+)/(-) παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην ουρογεννητική και νεφρική ανάπτυξη.

3.3 Ανάλυση νουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου ACTN4

Ο μοριακός έλεγχος του γονιδίου της ακτινίνης 4 πραγματοποιήθηκε σε 6 παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοσωμικό επικρατές SRNS/FSGS (**πίνακας 10**). Η μοναδική μετάλλαξη η οποία ανιχνεύθηκε σε 2 άτομα (πάσχοντες) της ίδιας οικογένειας είναι η p.H205D. Η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε στον πατέρα και στον γιο οι οποίοι πάσχουν από SRNS. Η αλλαγή, η οποία δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής, εντοπίζεται σε συντηρημένη θέση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του γονιδίου ACTN4 (αμινοξύ 205) και θεωρείται παθολογική με βάση την in silico ανάλυση.

Παράλληλα εντοπίστηκαν οι συνώνυμες νουκλεοτιδικές αλλαγές p.N182N και p.P179P κατά τις οποίες δεν μεταβάλλεται το αμινοξύ που κωδικοποιείται στις θέσεις 182 και 179 της πρωτεϊνικής αλληλουχίας.

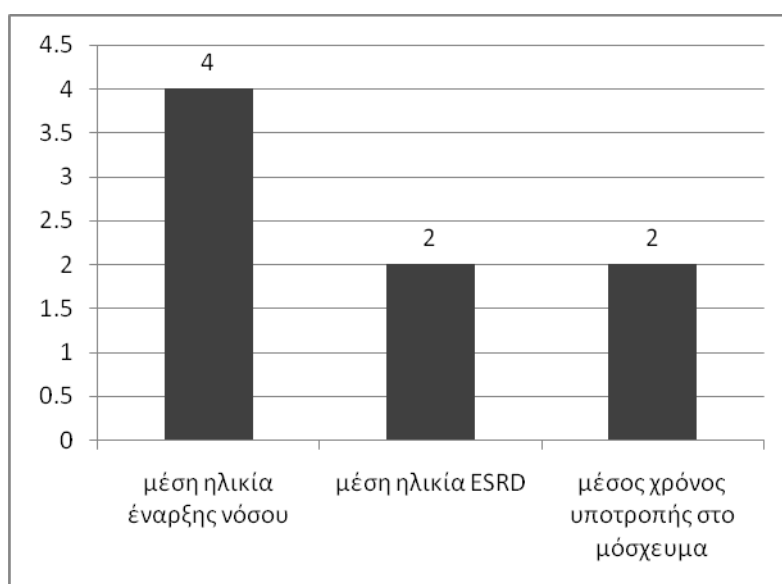
Κωδικός δειγμάτων	συγγένεια νοσούντων	p.H205D	p.N182N	p.P179P
FD-SRNS-01 ^a	<u>ΑΣΘΕΝΗΣ</u>	1 (h)	1 (h)	
FD-SRNS-02 ^a	πατέρας	1 (h)	1 (h)	
FD-SRNS-03 ^b	<u>ΑΣΘΕΝΗΣ</u>		1 (H)	
FD-SRNS-04 ^b	μητέρα		1 (H)	
FD-SRNS-05 ^b	μητρική μητέρα		1 (H)	
FD-SRNS-06 ^c	<u>ΑΣΘΕΝΗΣ</u>		1 (H)	
FD-SRNS-07 ^c	πατέρας		1 (h)	
FD-SRNS-08 ^d	<u>ΑΣΘΕΝΗΣ</u>			1 (h)
FD-SRNS-09 ^d	πατερας			1 (h)
FD-SRNS-10 ^d	πατρική μητέρα		1 (h)	
FD-SRNS-11 ^e	<u>ΑΣΘΕΝΗΣ</u>			
FD-SRNS-12 ^e	μητρικη μητερα			
FD-SRNS-14 ^f	πατερας			
FD-SRNS-15 ^f	<u>ΑΣΘΕΝΗΣ</u>			
ΣΥΝΟΛΟ 14				

Πίνακας 10: νουκλεοτιδικές αλλαγές που εντοπίστηκαν στο γονίδιο ACTN4 (h:ετεροζυγωτία, H:ομοζυγωτία). Από τις 6 οικογένειες μόνο στην πρώτη βρέθηκε παθολογική μετάλλαξη.

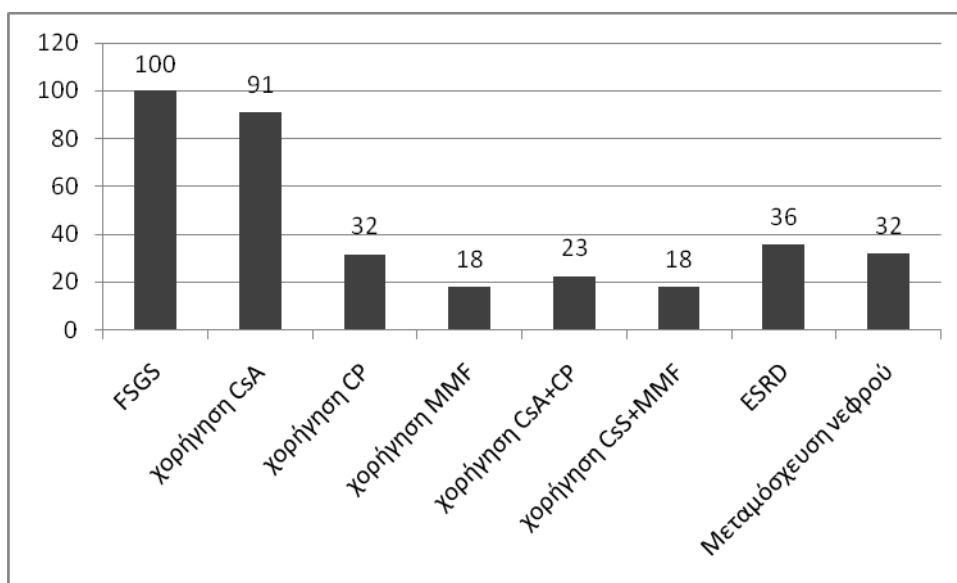
Κεφάλαιο 4: Σχολιασμός αποτελεσμάτων / σχέση γονότυπου-φαινότυπου

4.1 Συσχέτιση γονότυπου NPHS2 και κλινικού φαινότυπου

Η ομάδα ασθενών με σποραδικό SRNS (22 δείγματα SR-SRNS) (πίνακες 5, 6) είχε μέση ηλικία έναρξης της πρωτεϊνουρίας τα 4 έτη (Γράφημα 1) και ιστολογικά ευρήματα FSGS (100%). Στο 91% χορηγήθηκε CsA, στο 32% CP, στο 18% MMF, στο 23% CsA και CP και στο 18% CsA και MMF (Γράφημα 2). Το 36% παρουσίασε ESRD με μέσο χρόνο εμφάνισης μετά την αρχική εκδήλωση του συνδρόμου τα 2 έτη (Γράφημα 1, 2). Στο 32% του συνολικού αριθμού δειγμάτων (88% των ασθενών με ESRD) πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση νεφρού με μέσο χρόνο μετά την έναρξη της νόσου τα 2 έτη (Γράφημα 1). Το 22% αυτών που δέχθηκαν μόσχευμα νεφρού έχουν παρουσιάσει υποτροπή της πρωτεϊνουρίας μέχρι σήμερα.



Γράφημα 1: κλινικά δεδομένα ασθενών με σποραδικό SRNS



Γράφημα 2: Ποσοστά ασθενών επί του συνολικού αριθμού ασθενών με SR-SRNS. Παρουσιάζονται πληροφορίες για ιστολογικά ευρήματα, θεραπευτική αγωγή, ESRD και μεταμόσχευση νεφρών.

Παθολογικοί γονότυποι βρέθηκαν σε 3 ασθενείς (15%) (που περιλαμβάνουν 4 διαφορετικές μεταλλάξεις (p.R138Q, p.R166H, p.R229Q και p.A295T) (**εικόνα 8**). Η μετάλλαξη p.R229Q ανιχνεύθηκε επίσης σε ένα συγγενές περιστατικό (ασθενής IR-SRNS-06, **πίνακας 6**) σε ετερόζυγη κατάσταση και σε ένα μόνο οικογενές περιστατικό (ασθενής FR-SRNS-01^a, **πίνακας 6**) επίσης σε ετεροζυγωτία και δεν μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνη για την κλινική εικόνα των ασθενών αυτών.

Μεταξύ των σποραδικών ασθενών, 2 ασθενείς ήταν ομόζυγοι για τις χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις p.R138Q/p.R138Q (ασθενής SR-SRNS-04, **πίνακας 6**) και p.R168H/p.R168H (ασθενής SR-SRNS-16, **πίνακας 6**). Ένας ασθενής ήταν διπλός ετεροζυγώτης p.R229Q/p.A295T (ασθενής SR-SRNS-12, **πίνακας 6**).

Η μετάλλαξη p.R138Q αποτελεί μια από τις συχνότερες μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS2 που εντοπίζεται σε παιδιατρικούς ασθενείς με υπολειπόμενο SRNS (Boute, Gribouval et al. 2000; Franceschini, North et al. 2006; Obeidova, Merta et al. 2006; Hinkes, Vlangos et al. 2008). Το αμινοξύ αργινίνη 138 είναι ισχυρά

συντηρημένο στην οικογένεια των πρωτεϊνών παρόμοιων με την πρωτεΐνη στοματίνη και είναι βασικό για την λειτουργία της ποδοκίνης (Boute, Gribouval et al. 2000). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη καταστρέφει την σύνδεση της ποδοκίνης με την νεφρίνη στις ποδοκυτταρικές προσεκβολές. Η ασθενής SR-SRNS-04 (πίνακας 6) εμφάνισε πρωτεϊνουρία σε ηλικία 4 ετών με εστιακή και σπειραματική σκλήρυνση και ανθεκτικότητα σε θεραπεία στεροειδών και ανοσοκατασταλτικών. Σε ηλικία 6 ετών εμφάνισε τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια και δέχτηκε μόσχευμα νεφρού σε ηλικία 7 ετών χωρίς επανεμφάνιση της νόσου (9 έτη μετά). Η ασθενής αυτή αντιπροσωπεύει μια «τυπική» κλινική περίπτωση σποραδικού υπολειπόμενου SRNS το οποίο οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της ποδοκίνης.

Ο ασθενής SR-SRNS-16 (πίνακας 6) είναι ομοζυγώτης για την μετάλλαξη p.R168H. Εμφάνισε υψηλές τιμές πρωτεϊνουρίας σε ηλικία 2 ετών με ανθεκτικότητα σε στεροειδή και σε κυκλοσπορίνη. Η μετάλλαξη αυτή αναφέρθηκε πρώτη φορά σε κινέζικη οικογένεια όπου ο ασθενής ήταν διπλός ετεροζυγώτης για την συγκεκριμένη μετάλλαξη και την p.V165X (Yu, Ding et al. 2004). Οι συγγραφείς του άρθρου κατέληξαν στο γεγονός ότι η p.R168H είναι παθολογική μετά από συγκριτική ανάλυση τόσο του γονιδίου όσο και της πρωτεΐνης στον άνθρωπο, στα ποντίκια και τους αρουραίους. Ο γονότυπος της μελέτης συσχετίστηκε με φαινότυπο πρωτίνουρίας σε ηλικία 25 ημερών. Πιθανότατα ο βαρύς αυτός φαινότυπος οφείλεται και στην δεύτερη μετάλλαξη (p.V165X) η οποία εισάγει κωδικώνιο λήξης στην πρωτεΐνη.

Ο ασθενής SR-SRNS-12 (πίνακας 6) είναι διπλός ετεροζυγώτης για τις μεταλλάξεις p.R229Q/p.A295T. Η μετάλλαξη p.R229Q έχει περιγραφεί σε σποραδικά

και οικογενή περιστατικά με SRNS/FSGS (Franceschini, North et al. 2006). Έχει δειχθεί ότι μπορεί να συσχετίζεται με τριπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης μικροαλβουμινουρίας στον γενικό πληθυσμό (Pereira, Pereira et al. 2004). Ο ασθενής SR-SRNS-12 είχε και μία δεύτερη μετάλλαξη (p.A295T). Η μετάλλαξη p.A295T (c.883G>A) στο εσώνιο 8 αναφέρεται για πρώτη φορά στη παρούσα μελέτη. *In silico* ανάλυση έδειξε ότι η μετάλλαξη προκαλεί δυσλειτουργική πρωτεΐνη. Το γεγονός ότι η αλλαγή αυτή είναι απύσα από την ομάδα ελέγχου ενδυναμώνει την πιθανότητα η μετάλλαξη να είναι παθολογική. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω μελέτη της επίδρασής της στην δομή και τη λειτουργία της ποδοκίνης. Ο ασθενής διαγνώσθηκε με SRNS σε ηλικία 4 ετών με FSGS. Παρουσίασε ανθεκτικότητα σε στεροειδή και σε κυκλοφωσφαμίδη αλλά η θεραπεία διακόπηκε μετά από 10 ημέρες λόγω παρενεργειών. Με την χορήγηση κυκλοσπορίνης Α επιτεύχθηκε μείωση της πρωτεϊνουρίας. Η ανταπόκριση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στον πιθανώς ήπιο γονότυπο (p.R229Q/p.A295T) ή/και στην αντιπρωτεϊνουρική δράση της κυκλοσπορίνης (Meyrier 1992; Faul, Donnelly et al. 2008).

Στη παρούσα μελέτη αναγνωρίστηκαν επιπλέον 3 ασθενείς με ετερόζυγη p.R229Q. (FR-SRNS-01, IR-SRNS-06 και SR-SRNS-20, πίνακας 6). Ενδεχομένως η μετάλλαξη αυτή, σε συνδυασμό με μεταλλάξεις άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του ποδοκυττάρου, να προκαλεί την εμφάνιση της νόσου. Η αργινίνη 229 είναι υψηλά συντηρημένη σε ορθόλογες αλληλουχίες του γονιδίου και εμφανίζεται να αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης FSGS σε συνδυασμό με ένα δεύτερο μεταλλαγμένο αλληλίο του γονιδίου NPHS2 (Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002).

Ο οικογενής ασθενής FR-SRNS-01a παρουσίασε πρωτεϊνουρία με FSGS σε ηλικία 5 ετών. Σε ηλικία 9 ετών ανέπτυξε ESRD και FSGS μετά από μεταμόσχευση νεφρού. Αν και έχει αναφερθεί από τους Franceschini και συνεργάτες (2006), ότι η μετάλλαξη αυτή μπορεί να προκαλέσει SRNS ακόμα και σε ετεροζυγωτία θεωρούμε ότι κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στο συγκεκριμένο περιστατικό. Η παρατήρηση ότι ο αδερφός του ασθενούς (FR-SRNS-02^a, **εικόνα 6**) πάσχει με ηπιότερο SRNS με απουσία της συγκεκριμένης μετάλλαξης είναι ενδεικτικό ότι ο φαινότυπος της οικογένειας δεν οφείλεται ή τουλάχιστον όχι αποκλειστικά στην μετάλλαξη p.R229Q. Στα 2 αδέρφια της μελέτης ο λειτουργικός «πολυμορφισμός» p.R229Q ενδέχεται να μετατρέπει τον παθολογικό φαινότυπο σε SRNS παιδικής ηλικίας ενώ το ενδεχόμενο η p.R229Q αλλαγή να λειτουργεί ως παράγοντας αύξησης της πιθανότητας ενός παθολογικού φαινότυπου ενισχύεται από την παρουσία της στην ομάδα ελέγχου (**πίνακας 9**).

Μπορεί επίσης, επιγενετικές τροποποιήσεις άλλων γονιδίων να είναι υπεύθυνες για τον παθολογικό φαινότυπο των αδερφών, και το φαινόμενο αυτό της επίστασης (μη αλληλόμορφη συγκάλυψη ενός γονιδίου από ένα άλλο) έχει περιγραφεί σε περιστατικά NS (Koziell, Grech et al. 2002) .

Στον ασθενή IR-SRNS-06 ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη p.R229Q σε ετεροζυγωτία. Ο ασθενής εμφάνισε πρωτεϊνουρία σε ηλικία 2 μηνών με FSGS στη βιοψία νεφρού και καμία ανταπόκριση σε στεροειδή ενώ ο ασθενής SR-SRNS-20 (ετεροζυγώτης για την p.R229Q) παρουσίασε SRNS/FSGS σε ηλικία ενός έτους.

Η ποικιλότητα των παθολογικών φαινοτύπων όπου εμπλέκεται η αλλαγή p.R229Q λειτουργεί υπέρ της παραπάνω συζήτησης σχετικά με την εμπλοκή της

μετάλλαξης στην πρόκληση SRNS. Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής η παθογένεια της μετάλλαξης p.R229Q στον φαινότυπο SRNS παραμένει αδιευκρίνιστη (Henikoff, Greene et al. 2002; Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002; Caridi, Bertelli et al. 2003; Pereira, Pereira et al. 2004; Ruf, Lichtenberger et al. 2004; Weber, Gribouval et al. 2004; Aucella, De Bonis et al. 2005).

Οι σιωπηλές αλλαγές p.L346L, p.A318A και p.S96S μαζί με τις *in cis* πολυμορφικές αλλαγές IVS3-46C>T, IVS3-21C>T και IVS7+7A>G βρέθηκαν και στην ομάδα ασθενών αλλά και στην ομάδα ελέγχου (**πίνακας 9**). Η νουκλεοτιδική αλλαγή IVS3-17C>T στο εξώνιο 3 αναφέρεται στη παρούσα μελέτη για πρώτη φορά. Ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία σε 2 ασθενείς και σε κανένα άτομο της ομάδας ελέγχου. Η αλλαγή αυτή βρίσκεται στην πολυπυριμιδική οδό του εξωνίου 3, 17 βάσεις πριν το εσώνιο 4. Νουκλεοτιδικές αλλαγές στην περιοχή αυτή έχει βρεθεί ότι μπορούν να αλλάξουν το μάτισμα ενός γονιδίου. Με την χρήση *in silico* εργαλείων, η ανάλυση έδειξε ότι η αλλαγή αυτή δεν μπορεί να αλλάξει το φυσιολογικό μάτισμα του γονιδίου.

4.2 Συσχέτιση γονότυπου WT1 και κλινικού φαινότυπου

Η ανίχνευση των νουκλεοτιδικών αλλαγών στα εσώνια 8 και 9 του γονιδίου WT1 αποκάλυψε 3 γνωστές σημειακές μεταλλάξεις σε 4 ασθενείς (IR-SRNS-02, SR-SRNS-03, SR-SRNS-05 και SR-SRNS-13) (πίνακας 6, 11).

Κωδικός μελέτης	φύλο	Καρυό-τυπος	Νουκλεοτιδικές αλλαγές WT1	έτος έναρξης νόσου	βιοψία νεφρού	Θεραπεία CP/CSA/MMF	τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια (έτη από έναρξη νόσου)	Μεταμόσχευση νεφρού (έτη από έναρξη νόσου)	Υποτροπή στο μόσχευμα (έτη από μεταμόσχευση)	άρθρο αναφοράς
IR-SRNS-02	Θ	XX	p.R366H c.1097G>A de novo	0,75	DMS	CsA (NR)	1	OXI	–	B
SR-SRNS-03	Θ	XY	p.R394W c.1180C>T, de novo	6	FSGS	CP(NR), CsA (P)	10	16	–	A, B
SR-SRNS-05	Θ	XX	IVS9+5G>A de novo	2	FSGS	CsA (PR)	OXI	–	–	A, B
SR-SRNS-13	Θ	XX	p.R394W c.1180C>T de novo	5	FSGS	CsA (PR)	OXI	–	–	A, B

Πίνακας 11: Κλινικά δεδομένα και παθολογικοί γονότυποι ασθενών με μεταλλάξεις του μεταγραφικού παράγοντα WT1. (NR: καμία ανταπόκριση, PR: μερική ανταπόκριση, A: Megremis et al., 2009, B: Megremis et al., 2011)

Ο ασθενής IR-SRNS-02 γεννήθηκε με φυσιολογικό τοκετό μετά από 36 εβδομάδες κύησης χωρίς την εμφάνιση πολυδράμιου. Σε ηλικία 9 μηνών παρουσίασε υποτονία, αδυναμία πρόσληψης τροφής, οίδημα και αναπνευστική δυσχέρεια. Ο βιοχημικός έλεγχος έδειξε κρεατινίνη ορού 4,7mg/dl, αιματοουρία 280 mg/dl, πρωτεΐνη ορού 4 g/dl, αλβουμίνη ορού 2,4 g/dl και πρωτεϊνουρία 580 mg/m²/ώρα. Ο ασθενής δεν ανταποκρίθηκε σε θεραπεία 60mg/m²/ημέρα πρεδνιζολόνης. Ο υπερηχογραφικός έλεγχος νεφρών έδειξε αυξημένη ηχογένεια και θόλωση στο νεφρικό μυελό αλλά χωρίς να παραπέμπει σε εικόνα καρκίνου των νεφρών. Η βιοψία νεφρού έδειξε DMS. Ο καρυότυπος ήταν 46,XX. Ο ασθενής εμφάνισε ESRD και δέχθηκε αιμοκάθαρση. Πραγματοποιήθηκε διπλή νεφρεκτομή

μετά από 6 μήνες από την εμφάνιση της νόσου με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου τύπου Wilms. Η μοριακή ανάλυση στο γονίδιο WT1 ανίχνευσε την *de novo* σημειακή μετάλλαξη p.R366H (c.1097G>A) στο εσώνιο 8.

Κατά την έναρξη της μελέτης ο ασθενής SR-SRNS-03 ήταν 15 ετών. Διαγνώσθηκε με SRNS σε ηλικία 6 ετών. Η διάγνωση περιελάμβανε οίδημα, φυσιολογικά εξωτερικά γεννητικά όργανα, φυσιολογικό βάρος και ύψος. Οι εργαστηριακές μετρήσεις ανίχνευσαν πρωτεϊνουρία 5,2 g/m²/ώρα, αλβουμίνη ορού 2,2 g/dl και ρυθμό σπειραματικής διήθησης 160 ml/λεπτό/1,73m². Στη βιοψία νεφρού βρέθηκε εστιακή και σπειραματική σκλήρυνση στο 30% των σπειραμάτων. Ο ασθενής δεν ανταποκρίθηκε σε χορήγηση πρεδνιζολόνης (60mg/m²/ημέρα) και 3 ώσεις μεθυλπρεδνιζολόνης (1 g/1,73m²). Ο υπερηχογραφικός έλεγχος νεφρών έδειξε αυξημένο μέγεθος και υπερ-ηχογένεια χωρίς να παραπέμπει σε εικόνα καρκίνου των νεφρών. Χορηγήθηκε κυκλοφωσφαμίδη, αλλά χωρίς ανταπόκριση της πρωτεϊνουρίας, και στη συνέχεια κυκλοσπορίνη (216mg/m²/ώρα). Παρατηρήθηκε μείωση της πρωτεϊνουρίας (0,5-1 g/24 h) και βελτίωση της αλβουμίνης ορού σε 3g/dl αλλά για τα 2 πρώτα χρόνια. Σε ηλικία 10 ετών ο ασθενής παρουσίασε ESRD. Σε ηλικία 11 ετών πραγματοποιήθηκε διπλή νεφρεκτομή. Η βιοψία έδειξε FSGS και όχι νεφροβλάστωμα ή καρκίνο τύπου Wilms. Σε ηλικία 15 ετών διαγνώσθηκε στάδιο 1 Tanner.

Η μοριακή ανάλυση του γονιδίου WT1 ανίχνευσε την σημειακή *de novo* μετάλλαξη p.R394W (c.1180C>T) στο εσώνιο 9. Ο καρυότυπος της φαινοτυπικά θήλεος ασθενούς ήταν 46,XY. Κατόπιν επιβεβαιώθηκε η ανώμαλη διαμόρφωση των γονάδων και οι γονάδες αφαιρέθηκαν. Η ιστολογική εξέταση των γονάδων δεν

έδειξε ευρήματα γοναδοβλαστώματος. Σε ηλικία 16 ετών διενεργήθηκε μεταμόσχευση νεφρού χωρίς όμως επιτυχία.

Ο ασθενής SR-SRNS-05 εμφάνισε πρωτεϊνουρία σε ηλικία 5 ετών. Στις εργαστηριακές αναλύσεις παρουσιάστηκαν κρεατινίνη ορού 2,4 g/dl και πρωτεϊνουρία 241 mg/m²/ώρα. Στη βιοψία νεφρού εμφανίστηκε FSGS στο 35% των σπειραμάτων. Το υπερηχογράφημα νεφρών έδειξε ήπια υπερηχογένεια. Τα υπερηχογραφήματα στη μήτρα, στους ωαγωγούς και στις ωοθήκες ήταν φυσιολογικά. Ο καρυότυπος ήταν 46,XX. Δεν ανταποκρίθηκε σε 60 mg/m²/ημέρα πρεδνιζολόνης. Χορηγήθηκαν 6 ώσεις μεθυλπρεδνιζολόνης 1,0 g/1,73m² και κυκλοσπορίνης 150 mg/m²/ημέρα για 2 εβδομάδες και η πρωτεϊνουρία μειώθηκε προοδευτικά (0,15 g/ημέρα). Μετά από 3 έτη δεν έχει επανεμφανιστεί η νόσος. Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο WT1 εντόπισε την σημειακή νουκλεοτιδική αλλαγή στο εξώνιο 9 1228+5G>A, η οποία αλλάζει το φυσιολογικό μάτισμα του γονιδίου.

Ο ασθενής SR-SRNS-13 ήταν 18 ετών κατά την διάρκεια της μοριακής ανάλυσης με φυσιολογικό καρυότυπο (46,XX) και φυσιολογικά εξωτερικά γεννητικά όργανα άρρενος. Διαγνώσθηκε με SRNS σε ηλικία 7 ετών με πρωτεϊνουρία 195 mg/m²/ώρα, φυσιολογική νεφρική λειτουργία, αρτηριακή πίεση, βάρος και ύψος. Βρέθηκε FSGS στο 20% των σπειραμάτων. Δεν ανταποκρίθηκε σε θεραπεία πρεδνιζόνης. Η πρωτεϊνουρία υποχώρησε μερικώς σε δόσεις 25-35 m²/ημέρα κυκλοσπορίνης. Οι τελευταίες εξετάσεις του ασθενούς έδειξαν κρεατινίνη ορού 1,8 mg/dl, αλβουμιναιμία 3,2 g/dl και πρωτεϊνουρία 4-6 g/ημέρα. Η μοριακή ανάλυση

του γονιδίου WT1 ανίχνευσε την σημειακή *de novo* μετάλλαξη p.R394W (c.1180C>T) στο εσώνιο 9.

Ο ασθενής IR-SRNS-02 με την p.R366H (c.1097G>A) στο εσώνιο 8 διαγνώσθη με συγγενές SRNS και γρήγορα παρουσίασε ESRD. Η κλινική πορεία του ασθενούς συμφωνεί με την «αναμενόμενη» εικόνα ασθενών με μετάλλαξη σε περιοχή η οποία βρίσκεται στην περιοχή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα σε αλληλουχίες DNA, που συχνά παρουσιάζουν DDS και γρήγορη ανάπτυξη ESRD (Devriendt, Deloof et al. 1995).

Οι ασθενείς SR-SRNS-03 και SR-SRNS-13 είναι ετερόζυγοι για την *de novo* σημειακή μετάλλαξη p.R394W αλλά με εντελώς διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά. Ο ασθενής SR-SRNS-03 παρουσίασε ESRD σε ηλικία 11 ετών, ενώ ο ασθενής SR-SRNS-13 παρουσιάζει ολική ύφεση με ανταπόκριση στην κατάλληλη θεραπεία. Ο ασθενής αυτός έχει περιγραφεί και σε προηγούμενη μελέτη (Gellermann, Stefanidis et al. 2010). Συνήθως, παιδιά με μεταλλάξεις του γονιδίου WT1 και SRNS δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία και συνήθως χαρακτηρίζονται από οξεία εμφάνιση της νόσου (Jeanpierre, Denamur et al. 1998; Ehrich, El Gendi et al. 2005; Hinkes, Wiggins et al. 2006). Πρόσφατα, σε μερικές κλινικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε ύφεση της νόσου λόγω της ανταπόκρισης στην θεραπευτική αγωγή με συνδυασμό κυκλοσπορίνης A και κορτικοστεροειδών (Gellermann, Stefanidis et al. 2010). Ίσως η αντι-πρωτεϊνουρική δράση της κυκλοσπορίνης A μπορεί να εξηγηθεί από μια άμεση δράση στα ποδοκύτταρα και όχι από καταστολή των T λεμφοκυττάρων (Stefanidis and Querfeld 2011).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της ασθενούς SR-SRNS-13 είναι μη αναμενόμενα, καθώς ο ασθενής έχει την p.R394W μετάλλαξη η οποία θεωρείται DDS «hot spot» αλλαγή και συνδέεται με πρώιμη εμφάνιση καρκίνου Wilms (Jeanpierre, Denamur et al. 1998; Royer-Pokora, Beier et al. 2004), ενώ συμφωνούν περισσότερο με το σύνδρομο Frasier, περιλαμβάνοντας ψευδοερμαφροδιτισμό (46,XY) και δυσγενεσία των γονάδων. Στην διεθνή βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί 2 ασθενείς με αυτή την μετάλλαξη και ιστολογικά ευρήματα FSGS, σε ένα αγόρι ηλικίας 5 ετών με ιστορικό μικροπενίας, υποσπαδία, κρυφορχία και καρκίνο Wilms και σε ένα αγόρι 4,2 ετών (46,XY) με φαινότυπο θήλεος (Schumacher, Schneider et al. 1997; Buscher, Kranz et al. 2010).

Στον ασθενή SR-SRNS-05 εντόπιστηκε η *de novo* σημειακή νουκλεοτιδική αλλαγή στο εξώνιο 9 1228+5G>A (IVS9+5G>A) που συνήθως συσχετίζεται με FS (Haber, Buckler et al. 1990; Barbaux, Niaudet et al. 1997; Klamt, Koziell et al. 1998; Laity, Chung et al. 2000). Ο ασθενής έχει καρυότυπο 46,XX, φαινότυπο θήλεος, δεν παρουσιάζει ανωμαλίες των γονάδων και αποτελεί ένα σπάνιο περιστατικό FS με 46,XX που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα.

4.3 Συσχέτιση γονότυπου ACTN4 και κλινικού φαινότυπου

Η μετάλλαξη p.H205D ανιχνεύθηκε πρώτα στον ασθενή FD-SRNS-01 (**πίνακας 10**) και στη συνέχεια στον πατέρα (FD-SRNS-02) του παιδιού ο οποίος πάσχει επίσης από SRNS/FSGS. Δυστυχώς, τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με επικρατητικό SRNS δεν ήταν δυνατό να συλλεχθούν κατά την διάρκεια της μελέτης. Ωστόσο, για τον πάσχοντα πατέρα γνωρίζουμε ότι παρουσίασε τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια σε ηλικία 29 ετών, πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση νεφρού και υποροπή της νόσου στο μόσχευμα (**πίνακας 6**).

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Προηγούμενες μελέτες με παιδιατρικούς ασθενείς SRNS έχουν δείξει ότι 6.0-30% των σποραδικών και 20-40% των οικογενών περιστατικών οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS2 που κωδικοποιεί την ποδοκυτταρική πρωτεΐνη ποδοκίνη (Boute, Gribouval et al. 2000; Frishberg, Rinat et al. 2002; Karle, Uetz et al. 2002; Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002; Caridi, Bertelli et al. 2003; Billing, Muller et al. 2004; Ruf, Lichtenberger et al. 2004; Yu, Ding et al. 2004; Ardiles, Carrasco et al. 2005; Franceschini, North et al. 2006; Obeidova, Merta et al. 2006; Oleggini, Bertelli et al. 2006; Ozcakar, Cengiz et al. 2006; Chernin, Heeringa et al. 2008).

Αν και το ποσοστό ανίχνευσης παθολογικών μεταλλάξεων του γονιδίου NPHS2 στο πληθυσμό της παρούσας μελέτης είναι 15%, στην βιβλιογραφία εντοπίζονται επίσης χαμηλά ποσοστά NPHS2 μεταλλάξεων και σε άλλους πληθυσμούς (Yu, Ding et al. 2005; Chernin, Heeringa et al. 2008). Επιπρόσθετα, το χαμηλό αυτό ποσοστό μπορεί ίσως να οφείλεται και στον μικρό αριθμό δειγμάτων που ελέγχθηκαν. Επίσης, η πιθανότητα ύπαρξης παθολογικών νουκλεοτιδικών αλλαγών σε περιοχές του γονιδίου που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα όπως τα εξώνια και ο υποκινητής δεν μπορεί να παραβλεφθεί, ενώ ενδέχεται μεταλλάξεις άλλων γονιδίων NPHS1, PLCE1 και TRPC6 που εκφράζονται στο ποδοκύτταρο να συνεισφέρουν ή/και να είναι υπαίτιες για τον παθολογικό φαινότυπο SR/FR-SRNS των ασθενών της μελέτης. Προς αυτή την κατεύθυνση κινείται ήδη το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών συμπεριλαμβάνοντας τον έλεγχο των προαναφερθέντων γονιδίων στην μελέτη του SRNS στον ελληνικό πληθυσμό.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου NRHS2 δεν αποτελούν βασικό γενετικό παράγοντα πρόκλησης ανθεκτικού σε στεροειδή νεφρωσικού συνδρόμου στον Ελληνικό παιδιατρικό πληθυσμό που συμπεριλήφθηκε στην έρευνα. Παρόμοια αποτελέσματα βρίσκουμε και στον Κυπριακό πληθυσμό από παρόμοιες έρευνες που έχουν δημοσιευτεί (Voskarides, Makariou et al. 2008). Η παρούσα έρευνα προσφέρει στον κλινικό μια πολύ καλή κατηγοριοποίηση της ετερογενούς κλινικής ομάδας SRNS με βάση τα κλινικά στοιχεία, το ιστορικό, τον μοριακό έλεγχο συγκεκριμένων γονιδίων και τον τρόπο κληρονομικότητας των παθολογικών γονοτύπων. Επιπρόσθετα, ακολουθώντας τα κλινικά στοιχεία των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη είναι δυνατόν να προσδιοριστεί καλύτερα ένα πιθανό θεραπευτικό σχήμα που σε ορισμένες περιπτώσεις να οδηγεί σε ύφεση της πρωτεϊνουρίας ακόμα και σε άτομα με μεταλλάξεις του γονιδίου NRHS2. Σίγουρα η μοριακή ανάλυση του γονιδίου της ποδοκίνης πρέπει να πραγματοποιείται ως μέρος της κλινικής διάγνωσης τόσο για τον ίδιο τον ασθενή όσο και στα πλαίσια γενετικής συμβουλευτικής για την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου στις επόμενες γενιές.

Προηγούμενες μελέτες παιδιατρικών πληθυσμών με σποραδικό SRNS έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις των «hot spot» εσωνίων 8 και 9 του γονιδίου WT1, το οποίο κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Wilms tumor 1, αποτελούν συχνό αίτιο εμφάνισης SRNS (Ruf, Schultheiss et al. 2004). Με βάση τη παρατήρηση αυτή πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση των εσωνίων 8 και 9 του γονιδίου WT1 σε 27

ασθενείς με σποραδικό SRNS. Όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν φυσιολογικά εξωτερικά γεννητικά όργανα κατά τη διάρκεια της κλινικής εξέτασης.

Παρόλο που οι ασθενείς στη παρούσα μελέτη είχαν διαγνωσθεί με SRNS παρατηρήθηκε μεγάλη ετερογένεια στον παθολογικό γονότυπό τους με ανακολουθία αυτού με τον κλινικό φαινότυπο. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που προκαλούν DDS είναι παρερμηνεύσιμες, οι οποίες αφορούν συντηρημένα αμινοξέα στις περιοχές των δαχτύλων ψευδαργύρου της πρωτεΐνης (η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η p.R394W στο εξόνιο 9 του γονιδίου WT1) ενώ οι μεταλλάξεις στις περιοχές των εξονίων που επηρεάζουν την αναλογία των ισομορφών KTS(+)/KTS(-) οδηγούν σε FS καθώς ο λόγος τους μειώνεται (Mitchell, Simon et al. 1989; Haber, Buckler et al. 1990; Hamilton, Barilla et al. 1995; Borel, Barilla et al. 1996; Klamt, Koziell et al. 1998) . Παρόλα αυτά δεν συμβαίνει πάντα κάτι τέτοιο καθιστώντας πολύ δύσκολη τη συσχέτιση κλινικού φαινότυπου με παθολογικό γονότυπο του γονιδίου WT1 (Barbosa, Hadjiathanasiou et al. 1999; Demmer, Primack et al. 1999; Tsuda, Owada et al. 1999; McTaggart, Algar et al. 2001).

Κανένας από του ασθενείς δεν είχε παρουσιάσει μη φυσιολογικά εξωτερικά γεννητικά όργανα κατά τη διάρκεια της κλινικής εξέτασης. Οι μεταλλάξεις που αναγνωρίστηκαν δεν κληρονομήθηκαν από τους γονείς δείχνοντας ότι πρόκειται για *de novo* μεταλλάξεις. Ένας από τους 4 θηλυκούς ασθενείς βρέθηκε κατόπιν της μοριακής ανάλυσης και με βάση τη μοριακή ένδειξη ότι είχε 46,XY καρυότυπο (ασθενής SR-SRNS-03).

Τρεις μεγάλες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την συχνότητα των WT1 μεταλλάξεων σε παιδιατρικούς ασθενείς με SRNS. Συνολικά σε 300

ασθενείς η συχνότητα εμφάνισης WT1 μεταλλάξεων είναι 6-7% (Ruf, Schultheiss et al. 2004; Aucella, Bisceglia et al. 2006; Mucha, Ozaltin et al. 2006). Στην παρούσα μελέτη σε 27 ασθενείς βρέθηκαν 3 μεταλλάξεις σε 4 ασθενείς (15%). Πρόκειται για ένα υψηλό ποσοστό το οποίο μπορεί να οφείλεται είτε στον μικρό αριθμό δείγματος είτε σε γενετική διαφοροποίηση του ελληνικού πληθυσμού σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρώπη, όπως έχει αναφερθεί και στο γονίδιο της ποδοκίνης. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε διπλή μετάλλαξη των γονιδίων NPHS2 και WT1. Η πλειοψηφία των ασθενών με SRNS λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου WT1 είναι φαινοτυπικά θήλεα άτομα. Οι άρρενες 46,XY συνήθως παρουσιάζουν επιπρόσθετες δυσπλασίες του ουροποιογεννητικού (Aucella, Bisceglia et al. 2006). Για αυτό το λόγο τα παιδιά με SRNS και φαινότυπο θήλεος ή οι ασθενείς με δυσπλασίες του ουροποιογεννητικού πρέπει να διερευνώνται για μεταλλάξεις του γονιδίου WT1.

Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου Wilms πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψιν. Σε ένα πρόσφατο άρθρο μελετήθηκε η πιθανότητα αυτή με βάση τον συσχετισμό κλινικού φαινότυπου/παθολογικού γονότυπου σε περίπου 50 άτομα με NS και μεταλλάξεις του γονιδίου WT1 (Chemin, Pean et al. 2010). Οι ασθενείς με συνώνυμες ή μη συνώνυμες μεταλλάξεις παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου Wilms, ενώ οι ασθενείς με μεταλλάξεις σε μη κωδικοποιούσα περιοχή παρουσιάζουν χαμηλό κίνδυνο. Για αυτό το λόγο οι νεφροί των παιδιών με μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου πρέπει να εξετάζονται με υπερηχογράφημα κάθε 3-4 μήνες μέχρι και το 5^ο έτος της ηλικίας τους (Scott, Walker et al. 2006). Από την άλλη μεριά άρρενες ασθενείς με μεταλλάξεις στα

εξώνια του γονιδίου ανήκουν σε ομάδα κινδύνου για την εμφάνιση γοναδοβλαστώματος και προτείνεται η αφαίρεσή τους (Sinha, Sharma et al. 2010) .

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη τονίζει το γεγονός ότι οι κλινικοί φαινότυποι που σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου WT1 ποικίλλουν και πολλές φορές είναι μη αναμενόμενοι. Δεν είναι εύκολο συγκεκριμένοι φαινότυποι να συσχετισθούν με παθολογικού γονότυπους, όπως φάνηκε στο παράδειγμα των ασθενών με την p.R134W μετάλλαξη. Το σημαντικότερο συμπέρασμα είναι ότι σε περιστατικά με SRNS είναι απαραίτητη η μοριακή ανάλυση του γονιδίου WT1 που μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερο σχεδιασμό της θεραπευτικής αγωγής. Σε 2 από τα παιδιά της μελέτης μας πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των νεφρών στο σωστό χρονικό σημείο ώστε να εμποδιστεί η ανάπτυξη καρκίνου Wilms. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με καρυότυπο 46,XY μπορεί να δεχθούν γενετική συμβουλευτική καθώς και μακροχρόνια βοήθεια από ενδοκρινολόγους και ψυχολόγους παράλληλα με την νεφρολογική παρακολούθηση με τον κίνδυνο εμφάνισης γοναδοβλαστώματος. Συνολικά η παρούσα διατριβή υπογραμμίζει την αναγκαιότητα της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου WT1 προκειμένου να πραγματοποιηθεί ολοκληρωμένη κλινική διάγνωση. Επιπρόσθετα, η χρωμοσωμική ανάλυση είναι απαραίτητη σε φαινοτυπικά θήλα άτομα με μεταλλάξεις του γονιδίου WT1.

Οι ασθενείς με επικρατητικό τύπο SRNS εμφανίζουν FSGS σε ηλικία μεγαλύτερη των 8-10 ετών, παρουσιάζουν ηπιότερη μορφή NS ενώ έχει κληρονομηθεί η υπαίτια μετάλλαξη του γονιδίου από πάσχοντα γονέα. Οι 6 οικογένειες αποτελούνται συνολικά από 14 πάσχοντα άτομα. Δυστυχώς, τα κλινικά

χαρακτηριστικά των πασχόντων συγγενών δεν ήταν δυνατό να εντοπιστούν γεγονόσ που θέτει αδύνατη την συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η πρώτη προσπάθεια που πραγματοποιείται στην χώρα μας προκειμένου να εντοπιστούν και να περιγραφούν μεταλλάξεις οι οποίες είναι παθολογικές και μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση των διαφορετικών μορφών του ανθεκτικού σε στεροειδή νεφρωσικού συνδρόμου. Τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητη η μοριακή ανάλυση τουλάχιστον των γονιδίων NPHS2 και WT1 σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία με στεροειδή για την καλύτερη διαχείριση των περιστατικών και την αποφυγή χρήσεως θεραπευτικών σχημάτων τα οποία δεν θα επιφέρουν τα επιθυμητά αποτελέσματα και φυσικά θα οδηγήσουν σε αύξηση του κόστους νοσηλείας των ασθενών. Παράλληλα, η προσθήκη της μοριακής διάγνωσης στην καθημερινή κλινική πρακτική θα οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των χαρακτηρισμένων μεταλλάξεων και θα επιτρέψει τον συσχετισμό γονότυπου-φαινότυπου των ασθενών.

Δημοσιεύσεις

1. **S. Megremis**, A. Pampanos (2008). Basic techniques of molecular biology and their applications in the diagnosis of childhood diseases. *Paediatrici, Journal of the Greek Pediatric Society*, 71(2):105-115.
2. Mitsioni A. G., **Megremis S.**, Traeger-Synodinos J., Mitsioni A., Komianou F., Kanavakis E., Stefanidis C. "Mutations of the NPHS2 and WT1 genes are causative in Greek childhood patients with steroid resistant nephrotic syndrome". ([Pediatric Nephrology, Volume 23, Number 9 / September, 2008](#) DOI 10.1007/s00467-008-0920-0 ISSN 0931-041X (Print) 1432-198X (Online))
3. **Spyridon Megremis**, Artemis Mitsioni, Andromachi Mitsioni, Constantinos Stefanidis, Sofia Kitsiou-Tzelli, Emmanuel Kanavakis, Joanne Synodinos-Traeger. SCREENING OF MUTATIONS IN THE NPHS2 GENE IN GREEK PATIENTS WITH AUTOSOMAL-RECESSIVE STEROID-RESISTANT NEPHROTIC SYNDROME. Published online January 2, 2008, *PEDIATRICS* Vol. 121 Supplement January 2008, pp. S117, doi:10.1542/peds.2007-2022NNN)
4. **Spyridon Megremis**, Andromachi Mitsioni, Artemis Mitsioni, Sofia Kitsiou-Tzeli, Constantinos Stefanidis, Emmanuel Kanavakis, Joanne Traeger Synodinos (2009). "Nucleotide variations in the NPHS2 gene in Greek children with steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS)". *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(2):1-8.
5. **Megremis S**, Mitsioni A, Fylaktou I, Tzeli SK, Komianou F, Stefanidis CJ, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. (2011) Broad and unexpected phenotypic expression in Greek children with steroid-resistant nephrotic syndrome due to mutations in the Wilms' tumor 1 (WT1) gene. *Eur J Pediatr*. 2011 Dec;170(12):1529-34. Epub 2011 Apr 16.
6. Sophia Kitsiou-Tzeli, Maria Deligiorgi, Sophia Malaktari-Skarantavou, Charalampos Vlachopoulos, **Spyridon Megremis**, Irene Fylaktou, Joanne Traeger-Synodinos, Christina Kanaka-Gantenbein, Christodoulos Stefanadis, Emmanuel Kanavakis (2012) Sertoli cell tumor and gonadoblastoma in an untreated 29-year-old 46,XY phenotypic male with Frasier syndrome carrying a WT1 IVS9+4C>T mutation. *Hormones (Athens, Greece)* 07/2012; 11(3):361-

Ανακοινώσεις

1. **Spyridon Megremis**, Artemis G. Mitsioni, Andromachi Mitsioni, Constantinos Stefanidis, Sofia Kitsiou Tzeli, Emmanuel Kanavakis, Joanne Traeger Synodinos. "Screening of mutations in the NPHS2 gene in Greek patients with autosomal recessive steroid resistant nephrotic syndrome". Poster Sessions-Forefronts in Nephrology, Nephrogenetics Nature Symposium, Boston, USA, 2007
2. **Spyridon Megremis**, Artemis Mitsioni, Andromachi Mitsioni, Constantinos Stefanidis, Sofia Kitsiou-Tzelli, Emmanuel Kanavakis and Joanne Synodinos-Traeger. " Screening of mutations in the nphs2 gene in greek patients with autosomal-recessive steroid-resistant nephrotic syndrome". Oral presentation- 25th International Congress of pediatrics, Athens, 25-30 August, 2007 (Published online January 2, 2008, PEDIATRICS Vol. 121 Supplement January 2008, pp. S117, doi:10.1542/peds.2007-2022NNN)
3. Fylaktou E., **Megremis S.**, Mitsioni A., Stefanidis C., Kitsiou-Tzeli S., Kanavakis E., Traeger- Synodinos J. "Congenital Nephrotic Syndrome (CNS) caused by a complex genotype in the Nephtrin gene (NPHS1) revealing 2 novel mutations". ESGH (European Society of Human Genetics)- Poster Sessions European Human Genetics Conference, Barcelona, 2008.
4. Mitsioni A. G., **Megremis S.**, Traeger-Synodinos J., Mitsioni A., Komianou F., Kanavakis E., Stefanidis C. "Mutations of the NPHS2 and WT1 genes are causative in Greek childhood patients with steroid resistant nephrotic syndrome". Poster Sessions- 42nd Annual ESPN (European Society of Pediatric Nephrology) meeting September 11–14, 2008,([Pediatric Nephrology, Volume 23, Number 9](#) DOI 10.1007/s00467-008-0920-0
5. E. Fylaktou, **S. Megremis**, A. G. Mitsioni, A. Mitsioni, C. J. Stefanidis, S. Kitsiou-Tzeli, E. Georgaki, E. Kanavakis, J. Traeger-Synodinos; "NPHS2 and WT1 gene mutations in Greek children with steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS)". Poster Sessions- European Human Genetics Conference, 2009.

Βιβλιογραφία

- Abdurrahman, M. B., H. A. Aikhionbare, et al. (1990). "Clinicopathological features of childhood nephrotic syndrome in northern Nigeria." Q J Med **75**(278): 563-576.
- Abramson, R. (1995). Thermostable DNA polymerases. In PCR strategies Academic Press, San Diego.
- Andrews, P. M. (1977). "The effect of vinblastine-induced microtubule loss on kidney podocyte morphology." Am J Anat **150**(1): 53-61.
- Andrews, P. M. (1981). "Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus." Kidney Int **20**(5): 549-562.
- Appay, M. D., M. D. Kazatchkine, et al. (1990). "Expression of CR1 (CD35) mRNA in podocytes from adult and fetal human kidneys." Kidney Int **38**(2): 289-293.
- Ardiles, L. G., A. E. Carrasco, et al. (2005). "Late onset of familial nephrotic syndrome associated with a compound heterozygous mutation of the podocin-encoding gene." Nephrology (Carlton) **10**(6): 553-556.
- Artero, M., C. Biava, et al. (1992). "Recurrent focal glomerulosclerosis: natural history and response to therapy." Am J Med **92**(4): 375-383.
- Aucella, F., L. Bisceglia, et al. (2006). "WT1 mutations in nephrotic syndrome revisited. High prevalence in young girls, associations and renal phenotypes." Pediatr Nephrol **21**(10): 1393-1398.
- Aucella, F., P. De Bonis, et al. (2005). "Molecular analysis of NPHS2 and ACTN4 genes in a series of 33 Italian patients affected by adult-onset nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis." Nephron Clin Pract **99**(2): c31-36.
- Bachmann, S., W. Kriz, et al. (1983). "Differentiation of cell types in the mammalian kidney by immunofluorescence microscopy using antibodies to intermediate filament proteins and desmoplakins." Histochemistry **77**(3): 365-394.
- Barboux, S., P. Niaudet, et al. (1997). "Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome." Nat Genet **17**(4): 467-470.
- Barbosa, A. S., C. G. Hadjiathanasiou, et al. (1999). "The same mutation affecting the splicing of WT1 gene is present on Frasier syndrome patients with or without Wilms' tumor." Hum Mutat **13**(2): 146-153.
- Barisoni, L. and P. Mundel (2003). "Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases." Am J Nephrol **23**(5): 353-360.
- Bej, A. L. M. M. H. (1994). Thermostable DNA polymerases for in vitro DNA amplifications. In PCR technology: Current innovations Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Benzing, T. (2004). "Signaling at the slit diaphragm." J Am Soc Nephrol **15**(6): 1382-1391.
- Bhimma, R., H. M. Coovadia, et al. (1997). "Nephrotic syndrome in South African children: changing perspectives over 20 years." Pediatr Nephrol **11**(4): 429-434.
- Billing, H., D. Muller, et al. (2004). "NPHS2 mutation associated with recurrence of proteinuria after transplantation." Pediatr Nephrol **19**(5): 561-564.
- Birren, B. G., E.D.; Klapholz, S.; Myers, R.M.; Roskams, J. (1997). Genome Analysis- A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Bongers, E. M., F. T. Huysmans, et al. (2005). "Genotype-phenotype studies in nail-patella syndrome show that LMX1B mutation location is involved in the risk of developing nephropathy." Eur J Hum Genet **13**(8): 935-946.
- Bonilla-Felix, M., C. Parra, et al. (1999). "Changing patterns in the histopathology of idiopathic nephrotic syndrome in children." Kidney Int **55**(5): 1885-1890.
- Borel, F., K. C. Barilla, et al. (1996). "Effects of Denys-Drash syndrome point mutations on the DNA binding activity of the Wilms' tumor suppressor protein WT1." Biochemistry **35**(37): 12070-12076.
- Boute, N., O. Gribouval, et al. (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." Nat Genet **24**(4): 349-354.
- Boyum, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." Scand J Clin Lab Invest Suppl **97**: 77-89.
- Brenner, B. M., T. H. Hostetter, et al. (1978). "Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge." Am J Physiol **234**(6): F455-460.
- Buscher, A. K., B. Kranz, et al. (2010). "Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome." Clin J Am Soc Nephrol **5**(11): 2075-2084.
- Candiano, G., L. Musante, et al. (2001). "Inhibition of renal permeability towards albumin: a new function of apolipoproteins with possible pathogenetic relevance in focal glomerulosclerosis." Electrophoresis **22**(9): 1819-1825.
- Caridi, G., R. Bertelli, et al. (2003). "Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations." J Am Soc Nephrol **14**(5): 1278-1286.
- Caridi, G., R. Bertelli, et al. (2003). "Podocin mutations in sporadic focal-segmental glomerulosclerosis occurring in adulthood." Kidney Int **64**(1): 365.
- Carrie, B. J., W. R. Salyer, et al. (1981). "Minimal change nephropathy: an electrochemical disorder of the glomerular membrane." Am J Med **70**(2): 262-268.
- Cartegni, L., J. Wang, et al. (2003). "ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers." Nucleic Acids Res **31**(13): 3568-3571.
- Chemin, C., J. M. Pean, et al. (2010). "Biodistribution and anticancer activity of a new Vinca alkaloid encapsulated into long-circulating liposomes." J Liposome Res **20**(1): 62-72.
- Chernin, G., S. F. Heeringa, et al. (2008). "Low prevalence of NPHS2 mutations in African American children with steroid-resistant nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **23**(9): 1455-1460.
- Coovadia, H. M., M. Adhikari, et al. (1979). "Clinico-pathological features of the nephrotic syndrome in South African children." Q J Med **48**(189): 77-91.
- Cortes, P., M. Mendez, et al. (2000). "F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications." Kidney Int **58**(6): 2452-2461.
- Critchley, D. R. (2004). "Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion." Biochem Soc Trans **32**(Pt 5): 831-836.

- Cybulsky, A. V., S. Carbonetto, et al. (1992). "Adhesion of rat glomerular epithelial cells to extracellular matrices: role of beta 1 integrins." Kidney Int **42**(5): 1099-1106.
- Dantal, J., E. Bigot, et al. (1994). "Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome." N Engl J Med **330**(1): 7-14.
- Datta, K., J. Li, et al. (2004). "Regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF-A) expression in podocytes." Kidney Int **66**(4): 1471-1478.
- Demmer, L., W. Primack, et al. (1999). "Frasier syndrome: a cause of focal segmental glomerulosclerosis in a 46,XX female." J Am Soc Nephrol **10**(10): 2215-2218.
- Denamur, E., N. Bocquet, et al. (2000). "WT1 splice-site mutations are rarely associated with primary steroid-resistant focal and segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **57**(5): 1868-1872.
- Devriendt, K., E. Deloof, et al. (1995). "Diaphragmatic hernia in Denys-Drash syndrome." Am J Med Genet **57**(1): 97-101.
- Di Duca, M., R. Oleggini, et al. (2006). "Cis and trans regulatory elements in NPHS2 promoter: implications in proteinuria and progression of renal diseases." Kidney Int **70**(7): 1332-1341.
- Doe, J. Y., M. Funk, et al. (2006). "Nephrotic syndrome in African children: lack of evidence for 'tropical nephrotic syndrome'?" Nephrol Dial Transplant **21**(3): 672-676.
- Donoviel, D. B., D. D. Freed, et al. (2001). "Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN." Mol Cell Biol **21**(14): 4829-4836.
- Drenckhahn, D. and R. P. Franke (1988). "Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man." Lab Invest **59**(5): 673-682.
- Dreyer, S. D., G. Zhou, et al. (1998). "Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome." Nat Genet **19**(1): 47-50.
- Dustin, M. L., M. W. Olszowy, et al. (1998). "A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts." Cell **94**(5): 667-677.
- Eddy, A. A. and J. M. Symons (2003). "Nephrotic syndrome in childhood." Lancet **362**(9384): 629-639.
- Ehrich, J. H., A. A. El Gendi, et al. (2005). "Demography of paediatric renal care in Europe: organization and delivery." Nephrol Dial Transplant **20**(2): 297-305.
- Endlich, N. and K. Endlich (2006). "Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes." Eur J Cell Biol **85**(3-4): 229-234.
- Endlich, N., K. R. Kress, et al. (2001). "Podocytes respond to mechanical stress in vitro." J Am Soc Nephrol **12**(3): 413-422.
- Eremina, V., S. Cui, et al. (2006). "Vascular endothelial growth factor signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival." J Am Soc Nephrol **17**(3): 724-735.

- Eremina, V. and S. E. Quaggin (2004). "The role of VEGF-A in glomerular development and function." Curr Opin Nephrol Hypertens **13**(1): 9-15.
- Eremina, V., M. Sood, et al. (2003). "Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases." J Clin Invest **111**(5): 707-716.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.
- Farquhar, M. G. (2006). "The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten." J Clin Invest **116**(8): 2090-2093.
- Farquhar, M. G., R. L. Vernier, et al. (1957). "An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus." J Exp Med **106**(5): 649-660.
- Faul, C., M. Donnelly, et al. (2008). "The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A." Nat Med **14**(9): 931-938.
- Filler, G., E. Young, et al. (2003). "Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children?" Am J Kidney Dis **42**(6): 1107-1113.
- Fischer, S. G. and L. S. Lerman (1983). "DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(6): 1579-1583.
- Franceschini, N., K. E. North, et al. (2006). "NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review." Genet Med **8**(2): 63-75.
- Frasier, S. D., R. A. Bashore, et al. (1964). "Gonadoblastoma Associated with Pure Gonadal Dysgenesis in Monozygous Twins." J Pediatr **64**: 740-745.
- Freeburg, P. B., B. Robert, et al. (2003). "Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 during glomerular development." J Am Soc Nephrol **14**(4): 927-938.
- Frishberg, Y., C. Rinat, et al. (2002). "Mutations in NPHS2 encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children." J Am Soc Nephrol **13**(2): 400-405.
- Gellermann, J., C. J. Stefanidis, et al. (2010). "Successful treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with WT1 mutations." Pediatr Nephrol **25**(7): 1285-1289.
- Gessler, M., A. Poustka, et al. (1990). "Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping." Nature **343**(6260): 774-778.
- Gordon, A. M., E. Homsher, et al. (2000). "Regulation of contraction in striated muscle." Physiol Rev **80**(2): 853-924.
- Group, T. S. P. N. S. (1985). "Focal segmental glomerulosclerosis in children with idiopathic nephrotic syndrome. A report of the Southwest Pediatric Nephrology Study Group." Kidney Int **27**(2): 442-449.
- Gubler, M. C., Y. Yang, et al. (1999). "WT1, renal development, and glomerulopathies." Adv Nephrol Necker Hosp **29**: 299-315.
- Haber, D. A., A. J. Buckler, et al. (1990). "An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor." Cell **61**(7): 1257-1269.

- Habib, R., M. C. Gubler, et al. (1993). "Diffuse mesangial sclerosis: a congenital glomerulopathy with nephrotic syndrome." Adv Nephrol Necker Hosp **22**: 43-57.
- Hamilton, T. B., K. C. Barilla, et al. (1995). "High affinity binding sites for the Wilms' tumour suppressor protein WT1." Nucleic Acids Res **23**(2): 277-284.
- Harder, T. (2004). "Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction." Curr Opin Immunol **16**(3): 353-359.
- Hasselbacher, K., R. C. Wiggins, et al. (2006). "Recessive missense mutations in LAMB2 expand the clinical spectrum of LAMB2-associated disorders." Kidney Int **70**(6): 1008-1012.
- Hendrickse, R. G., A. Adeniyi, et al. (1972). "Quartan malarial nephrotic syndrome. Collaborative clinicopathological study in Nigerian children." Lancet **1**(7761): 1143-1149.
- Henikoff, J. G., E. A. Greene, et al. (2002). "Using the blocks database to recognize functional domains." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 2**: Unit 2.2.
- Hinkes, B., C. Vlangos, et al. (2008). "Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **19**(2): 365-371.
- Hinkes, B., R. C. Wiggins, et al. (2006). "Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible." Nat Genet **38**(12): 1397-1405.
- Hirabayashi, S., H. Mori, et al. (2005). "MAGI-1 is a component of the glomerular slit diaphragm that is tightly associated with nephrin." Lab Invest **85**(12): 1528-1543.
- Ho, Y. D., J. L. Joyal, et al. (1999). "IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and Cdc42 signaling." J Biol Chem **274**(1): 464-470.
- Hogg, R. J., R. J. Portman, et al. (2000). "Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference on proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, and elimination (PARADE)." Pediatrics **105**(6): 1242-1249.
- Holthofer, H., A. Miettinen, et al. (1984). "Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys." Lab Invest **50**(5): 552-559.
- Hoopes, B. C. and W. R. McClure (1981). "Studies on the selectivity of DNA precipitation by spermine." Nucleic Acids Res **9**(20): 5493-5504.
- Hu, M., G. Y. Zhang, et al. (2004). "Prophylactic bilateral nephrectomies in two paediatric patients with missense mutations in the WT1 gene." Nephrol Dial Transplant **19**(1): 223-226.
- Huber, T. B., J. Gloy, et al. (1998). "Catecholamines modulate podocyte function." J Am Soc Nephrol **9**(3): 335-345.
- Huber, T. B., B. Hartleben, et al. (2003). "Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling." Mol Cell Biol **23**(14): 4917-4928.
- Huber, T. B., M. Schmidts, et al. (2003). "The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1." J Biol Chem **278**(15): 13417-13421.

- Huber, T. B., M. Simons, et al. (2003). "Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains." Hum Mol Genet **12**(24): 3397-3405.
- ISKDC (1978). "Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children." Kidney Int **13**(2): 159-165.
- ISKDC (1981). "The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. A report of the International Study of Kidney Disease in Children." J Pediatr **98**(4): 561-564.
- ISKDC (1981). "Primary nephrotic syndrome in children: clinical significance of histopathologic variants of minimal change and of diffuse mesangial hypercellularity. A Report of the International Study of Kidney Disease in Children." Kidney Int **20**(6): 765-771.
- Jeanpierre, C., E. Denamur, et al. (1998). "Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database." Am J Hum Genet **62**(4): 824-833.
- Jones, N., I. M. Blasutig, et al. (2006). "Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes." Nature **440**(7085): 818-823.
- Kang, D. H. and R. J. Johnson (2003). "Vascular endothelial growth factor: a new player in the pathogenesis of renal fibrosis." Curr Opin Nephrol Hypertens **12**(1): 43-49.
- Kaplan, J. M., S. H. Kim, et al. (2000). "Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis." Nat Genet **24**(3): 251-256.
- Kaplinsky, C., M. Ghahremani, et al. (1996). "Familial Wilms' tumor associated with a WT1 zinc finger mutation." Genomics **38**(3): 451-453.
- Kari, J. A. (2002). "Changing trends of histopathology in childhood nephrotic syndrome in western Saudi Arabia." Saudi Med J **23**(3): 317-321.
- Karle, S. M., B. Uetz, et al. (2002). "Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **13**(2): 388-393.
- Karumanchi, S. A., S. E. Maynard, et al. (2005). "Preeclampsia: a renal perspective." Kidney Int **67**(6): 2101-2113.
- Kawachi, H., D. R. Abrahamson, et al. (1995). "Developmental expression of the nephritogenic antigen of monoclonal antibody 5-1-6." Am J Pathol **147**(3): 823-833.
- Kemper, M. J., G. Wolf, et al. (2001). "Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child." N Engl J Med **344**(5): 386-387.
- Kerjaschki, D. (1978). "Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin B." Lab Invest **39**(5): 430-440.
- Kerjaschki, D. (2001). "Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis." J Clin Invest **108**(11): 1583-1587.

- Kerjaschki, D., D. J. Sharkey, et al. (1984). "Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell." J Cell Biol **98**(4): 1591-1596.
- Kestila, M., U. Lenkkeri, et al. (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Mol Cell **1**(4): 575-582.
- Kim, J. M., H. Wu, et al. (2003). "CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility." Science **300**(5623): 1298-1300.
- Kim, Y. H., M. Goyal, et al. (2001). "Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat." Kidney Int **60**(3): 957-968.
- Kitano, Y., N. Yoshikawa, et al. (1993). "Glomerular anionic sites in minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis." Clin Nephrol **40**(4): 199-204.
- Klamt, B., A. Koziell, et al. (1998). "Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms." Hum Mol Genet **7**(4): 709-714.
- Kobayashi, N. and P. Mundel (1998). "A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non-neuronal cells." Cell Tissue Res **291**(2): 163-174.
- Kobayashi, N., J. Reiser, et al. (2001). "Process formation of podocytes: morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A." Histochem Cell Biol **115**(3): 255-266.
- Kojima, K., A. Davidovits, et al. (2004). "Podocyte flattening and disorder of glomerular basement membrane are associated with splitting of dystroglycan-matrix interaction." J Am Soc Nephrol **15**(8): 2079-2089.
- Koziell, A., V. Grech, et al. (2002). "Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration." Hum Mol Genet **11**(4): 379-388.
- Kreidberg, J. A. (2003). "Podocyte differentiation and glomerulogenesis." J Am Soc Nephrol **14**(3): 806-814.
- Kretzler, M., V. P. Teixeira, et al. (2001). "Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria." FASEB J **15**(10): 1843-1845.
- Kriz, W., M. Elger, et al. (1995). "Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft." J Am Soc Nephrol **5**(10): 1731-1739.
- Kriz, W., E. Hackenthal, et al. (1994). "A role for podocytes to counteract capillary wall distension." Kidney Int **45**(2): 369-376.
- Kriz, W., P. Mundel, et al. (1994). "The contractile apparatus of podocytes is arranged to counteract GBM expansion." Contrib Nephrol **107**: 1-9.
- Kurihara, H., J. M. Anderson, et al. (1992). "Diversity among tight junctions in rat kidney: glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junction protein ZO-1." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7075-7079.
- Lahdenpera, J., P. Kilpelainen, et al. (2003). "Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases." Kidney Int **64**(2): 404-413.
- Laity, J. H., J. Chung, et al. (2000). "Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes." Biochemistry **39**(18): 5341-5348.

- Lehtonen, S., E. Lehtonen, et al. (2004). "Nephrin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin-Darby canine kidney cells expressing nephrin." Am J Pathol **165**(3): 923-936.
- Lehtonen, S., J. J. Ryan, et al. (2005). "Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(28): 9814-9819.
- Lenkkeri, U., M. Mannikko, et al. (1999). "Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations." Am J Hum Genet **64**(1): 51-61.
- Li, H., S. Lemay, et al. (2004). "SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin." J Am Soc Nephrol **15**(12): 3006-3015.
- Little, M. and C. Wells (1997). "A clinical overview of WT1 gene mutations." Hum Mutat **9**(3): 209-225.
- Liu, G., L. C. Clement, et al. (2006). "ZHX proteins regulate podocyte gene expression during the development of nephrotic syndrome." J Biol Chem **281**(51): 39681-39692.
- Liu, X. L., P. Kilpelainen, et al. (2005). "Characterization of the interactions of the nephrin intracellular domain." FEBS J **272**(1): 228-243.
- Looij, B. J., Jr., R. L. te Slaa, et al. (1988). "Genetic counselling in hereditary osteonychodysplasia (HOOD, nail-patella syndrome) with nephropathy." J Med Genet **25**(10): 682-686.
- Marshall, C. B. and S. J. Shankland (2006). "Cell cycle and glomerular disease: a minireview." Nephron Exp Nephrol **102**(2): e39-48.
- Mathis, B. J., S. H. Kim, et al. (1998). "A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13." Kidney Int **53**(2): 282-286.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977). "A new method for sequencing DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(2): 560-564.
- McEnery, P. T. and C. F. Strife (1982). "Nephrotic syndrome in childhood. Management and treatment in patients with minimal change disease, mesangial proliferation, or focal glomerulosclerosis." Pediatr Clin North Am **29**(4): 875-894.
- McTaggart, S. J., E. Algar, et al. (2001). "Clinical spectrum of Denys-Drash and Frasier syndrome." Pediatr Nephrol **16**(4): 335-339.
- Megremis, S., A. Mitsioni, et al. (2009). "Nucleotide variations in the NPHS2 gene in Greek children with steroid-resistant nephrotic syndrome." Genet Test Mol Biomarkers **13**(2): 249-256.
- Meier, M., J. Menne, et al. (2007). "Deletion of protein kinase C-epsilon signaling pathway induces glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis in vivo." J Am Soc Nephrol **18**(4): 1190-1198.
- Meyrier, A. (1992). "Antiproteinuric and immunological effects of cyclosporin A in the treatment of glomerular diseases." Nephrol Dial Transplant **7 Suppl 1**: 80-84.
- Meyrier, A. (2005). "Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis." Nat Clin Pract Nephrol **1**(1): 44-54.
- Michaud, J. L. and C. R. Kennedy (2007). "The podocyte in health and disease: insights from the mouse." Clin Sci (Lond) **112**(6): 325-335.

- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.
- Miner, J. H., R. Morello, et al. (2002). "Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation." J Clin Invest **109**(8): 1065-1072.
- Mitchell, M., D. Simon, et al. (1989). "Localization of murine X and autosomal sequences homologous to the human Y located testis-determining region." Genetics **121**(4): 803-809.
- Mitic, L. L. and J. M. Anderson (1998). "Molecular architecture of tight junctions." Annu Rev Physiol **60**: 121-142.
- Moeller, M. J. (2007). "Dynamics at the slit diaphragm--is nephrin actin'?" Nephrol Dial Transplant **22**(1): 37-39.
- Morton, M. J., K. Hutchinson, et al. (2004). "Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca²⁺-activated K⁺ channel: potential implications for the control of glomerular filtration." J Am Soc Nephrol **15**(12): 2981-2987.
- Mucha, B., F. Ozaltin, et al. (2006). "Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9." Pediatr Res **59**(2): 325-331.
- Mullis, K. B. (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction." Sci Am **262**(4): 56-61, 64-55.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Nagata, M., Y. Yamaguchi, et al. (1993). "Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys." Anat Embryol (Berl) **187**(3): 275-279.
- Nalla, V. K. and P. K. Rogan (2005). "Automated splicing mutation analysis by information theory." Hum Mutat **25**(4): 334-342.
- Nash, M. A. E., C.M.; Bernstein, J.; Barnett, H.L. (1992). The nephrotic syndrome. Boston, Little, Brown, and Company.
- Niaudet, P. (2004). Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.
- Niaudet, P., M. F. Gagnadoux, et al. (1998). "Treatment of childhood steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome." Adv Nephrol Necker Hosp **28**: 43-61.
- Niaudet, P. and M. C. Gubler (2006). "WT1 and glomerular diseases." Pediatr Nephrol **21**(11): 1653-1660.
- Noritake, J., T. Watanabe, et al. (2005). "IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2085-2092.
- Obeidova, H., M. Merta, et al. (2006). "Genetic basis of nephrotic syndrome--review." Prague Med Rep **107**(1): 5-16.
- Ohtaka, A., T. Ootaka, et al. (2002). "Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis." Am J Kidney Dis **39**(3): 475-485.
- Oleggini, R., R. Bertelli, et al. (2006). "Rare functional variants of podocin (NPHS2) promoter in patients with nephrotic syndrome." Gene Expr **13**(1): 59-66.
- Oosterwijk, E., G. N. Van Muijen, et al. (1990). "Expression of intermediate-sized filaments in developing and adult human kidney and in renal cell carcinoma." J Histochem Cytochem **38**(3): 385-392.

- Orikasa, M., K. Matsui, et al. (1988). "Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody." J Immunol **141**(3): 807-814.
- Orlando, R. A., T. Takeda, et al. (2001). "The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin." J Am Soc Nephrol **12**(8): 1589-1598.
- Ozcakar, Z. B., F. B. Cengiz, et al. (2006). "Analysis of NPHS2 mutations in Turkish steroid-resistant nephrotic syndrome patients." Pediatr Nephrol **21**(8): 1093-1096.
- Patrakka, J., V. Ruotsalainen, et al. (2002). "Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin." Transplantation **73**(3): 394-403.
- Pavenstadt, H. (1998). "The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes." Exp Nephrol **6**(2): 98-103.
- Pavenstadt, H., W. Kriz, et al. (2003). "Cell biology of the glomerular podocyte." Physiol Rev **83**(1): 253-307.
- Pelletier, J., W. Bruening, et al. (1991). "Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome." Cell **67**(2): 437-447.
- Pereira, A. C., A. B. Pereira, et al. (2004). "NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population." Kidney Int **65**(3): 1026-1030.
- Pierson, M., J. Cordier, et al. (1963). "[an Unusual Congenital and Familial Congenital Malformative Combination Involving the Eye and Kidney]." J Genet Hum **12**: 184-213.
- Putala, H., R. Soininen, et al. (2001). "The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death." Hum Mol Genet **10**(1): 1-8.
- Quack, I., L. C. Rump, et al. (2006). "beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14110-14115.
- Quaggin, S. E. (2002). "Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation." Microsc Res Tech **57**(4): 208-211.
- Quaggin, S. E., L. Schwartz, et al. (1999). "The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis." Development **126**(24): 5771-5783.
- Ramensky, V., P. Bork, et al. (2002). "Human non-synonymous SNPs: server and survey." Nucleic Acids Res **30**(17): 3894-3900.
- Rapola, J. (1987). "Congenital nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **1**(3): 441-446.
- Reiser, J., J. Oh, et al. (2004). "Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin." J Biol Chem **279**(33): 34827-34832.
- Reiser, J., K. R. Polu, et al. (2005). "TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function." Nat Genet **37**(7): 739-744.
- Rodewald, R. and M. J. Karnovsky (1974). "Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse." J Cell Biol **60**(2): 423-433.

- Rodriguez, O. C., A. W. Schaefer, et al. (2003). "Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis." Nat Cell Biol **5**(7): 599-609.
- Rohr, C., J. Prestel, et al. (2002). "The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes." J Clin Invest **109**(8): 1073-1082.
- Rose, E. A., T. Glaser, et al. (1990). "Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene." Cell **60**(3): 495-508.
- Royer-Pokora, B., M. Beier, et al. (2004). "Twenty-four new cases of WT1 germline mutations and review of the literature: genotype/phenotype correlations for Wilms tumor development." Am J Med Genet A **127A**(3): 249-257.
- Ruf, R. G., A. Lichtenberger, et al. (2004). "Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **15**(3): 722-732.
- Ruf, R. G., M. Schultheiss, et al. (2004). "Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome." Kidney Int **66**(2): 564-570.
- Ruotsalainen, V., P. Ljungberg, et al. (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7962-7967.
- Sadl, V., F. Jin, et al. (2002). "The mouse Kreisler (Krml1/MafB) segmentation gene is required for differentiation of glomerular visceral epithelial cells." Dev Biol **249**(1): 16-29.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Sasdelli, M., L. Cagnoli, et al. (1981). "Cell mediated immunity in idiopathic glomerulonephritis." Clin Exp Immunol **46**(1): 27-34.
- Satchell, S. C., S. J. Harper, et al. (2002). "Human podocytes express angiopoietin 1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factor." J Am Soc Nephrol **13**(2): 544-550.
- Savin, V. J., R. Sharma, et al. (1996). "Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis." N Engl J Med **334**(14): 878-883.
- Schmieder, S., M. Nagai, et al. (2004). "Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells." J Am Soc Nephrol **15**(9): 2289-2298.
- Schnabel, E., J. M. Anderson, et al. (1990). "The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium." J Cell Biol **111**(3): 1255-1263.
- Schrijvers, B. F., A. Flyvbjerg, et al. (2004). "The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology." Kidney Int **65**(6): 2003-2017.
- Schulman, S. L., B. A. Kaiser, et al. (1988). "Predicting the response to cytotoxic therapy for childhood nephrotic syndrome: superiority of response to corticosteroid therapy over histopathologic patterns." J Pediatr **113**(6): 996-1001.
- Schultheiss, M., R. G. Ruf, et al. (2004). "No evidence for genotype/phenotype correlation in NPHS1 and NPHS2 mutations." Pediatr Nephrol **19**(12): 1340-1348.

- Schumacher, V., S. Schneider, et al. (1997). "Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3972-3977.
- Schwarz, K., M. Simons, et al. (2001). "Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin." J Clin Invest **108**(11): 1621-1629.
- Scott, R. H., L. Walker, et al. (2006). "Surveillance for Wilms tumour in at-risk children: pragmatic recommendations for best practice." Arch Dis Child **91**(12): 995-999.
- Senggutuvan, P., J. S. Cameron, et al. (1990). "Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in transplanted kidneys: analysis of incidence and risk factors in 59 allografts." Pediatr Nephrol **4**(1): 21-28.
- Shalhoub, R. J. (1974). "Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function." Lancet **2**(7880): 556-560.
- Sharma, R., H. B. Lovell, et al. (1992). "Vasoactive substances induce cytoskeletal changes in cultured rat glomerular epithelial cells." J Am Soc Nephrol **3**(5): 1131-1138.
- Sharples, P. M., J. Poulton, et al. (1985). "Steroid responsive nephrotic syndrome is more common in Asians." Arch Dis Child **60**(11): 1014-1017.
- Shih, N. Y., J. Li, et al. (1999). "Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein." Science **286**(5438): 312-315.
- Shirato, I., T. Sakai, et al. (1996). "Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis." Am J Pathol **148**(4): 1283-1296.
- Shulman, K., S. Rosen, et al. (1996). "Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases." J Am Soc Nephrol **7**(5): 661-666.
- Sinha, A., S. Sharma, et al. (2010). "Frasier syndrome: early gonadoblastoma and cyclosporine responsiveness." Pediatr Nephrol **25**(10): 2171-2174.
- Smoyer, W. E. and P. Mundel (1998). "Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome." J Mol Med (Berl) **76**(3-4): 172-183.
- Sorof, J. M., E. P. Hawkins, et al. (1998). "Age and ethnicity affect the risk and outcome of focal segmental glomerulosclerosis." Pediatr Nephrol **12**(9): 764-768.
- Srivastava, T., S. D. Simon, et al. (1999). "High incidence of focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic syndrome of childhood." Pediatr Nephrol **13**(1): 13-18.
- Stamenkovic, I., O. Skalli, et al. (1986). "Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomeruli." Am J Pathol **125**(3): 465-475.
- Stefanidis, C. J. and U. Querfeld (2011). "The podocyte as a target: cyclosporin A in the management of the nephrotic syndrome caused by WT1 mutations." Eur J Pediatr.
- Takeda, T., W. Y. Go, et al. (2000). "Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells." Mol Biol Cell **11**(9): 3219-3232.

- Takeda, T., T. McQuistan, et al. (2001). "Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton." J Clin Invest **108**(2): 289-301.
- Teixeira Vde, P., S. M. Blattner, et al. (2005). "Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage." Kidney Int **67**(2): 514-523.
- Tejani, A. and D. H. Stablein (1992). "Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis posttransplantation: a special report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study." J Am Soc Nephrol **2**(12 Suppl): S258-263.
- Tisi, D., J. F. Talts, et al. (2000). "Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin." EMBO J **19**(7): 1432-1440.
- Topaloglu, R., U. Saatci, et al. (1994). "T-cell subsets, interleukin-2 receptor expression and production of interleukin-2 in minimal change nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **8**(6): 649-652.
- Topham, P. S., H. Kawachi, et al. (1999). "Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin." J Clin Invest **104**(11): 1559-1566.
- Tryggvason, K. (1999). "Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm." J Am Soc Nephrol **10**(11): 2440-2445.
- Tryggvason, K., J. Patrakka, et al. (2006). "Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria." N Engl J Med **354**(13): 1387-1401.
- Tryggvason, K., T. Pikkarainen, et al. (2006). "Nck links nephrin to actin in kidney podocytes." Cell **125**(2): 221-224.
- Tryggvason, K., V. Ruotsalainen, et al. (1999). "Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney." Int J Dev Biol **43**(5): 445-451.
- Tsuda, M., M. Owada, et al. (1999). "WT1 nephropathy in a girl with normal karyotype (46,XX)." Clin Nephrol **51**(1): 62-63.
- Tsukaguchi, H., A. Sudhakar, et al. (2002). "NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele." J Clin Invest **110**(11): 1659-1666.
- Tyson, G. E. (1977). "Scanning electron microscopic study of the effect of vinblastine on podocytes of rat kidney." Virchows Arch B Cell Pathol **25**(2): 105-115.
- Usui, J., H. Kurihara, et al. (2003). "Localization of intercellular adherens junction protein p120 catenin during podocyte differentiation." Anat Embryol (Berl) **206**(3): 175-184.
- van den Berg, J. G., M. A. van den Bergh Weerman, et al. (2004). "Podocyte foot process effacement is not correlated with the level of proteinuria in human glomerulopathies." Kidney Int **66**(5): 1901-1906.
- van den Born, J., L. P. van den Heuvel, et al. (1992). "A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats." Kidney Int **41**(1): 115-123.
- Vasmant, D., M. Maurice, et al. (1984). "Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat." Anat Rec **210**(1): 17-24.

- Verma, R., I. Kovari, et al. (2006). "Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization." J Clin Invest **116**(5): 1346-1359.
- Verma, R., B. Wharram, et al. (2003). "Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin." J Biol Chem **278**(23): 20716-20723.
- Viney, R. L., A. A. Morrison, et al. (2007). "A proteomic investigation of glomerular podocytes from a Denys-Drash syndrome patient with a mutation in the Wilms tumour suppressor gene WT1." Proteomics **7**(5): 804-815.
- Voskarides, K., C. Makariou, et al. (2008). "NPHS2 screening with SURVEYOR in Hellenic children with steroid-resistant nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **23**(8): 1373-1375.
- Wagner, K. D., N. Wagner, et al. (2003). "The complex life of WT1." J Cell Sci **116**(Pt 9): 1653-1658.
- Wang, S. X., P. Mene, et al. (2001). "Nephrin mRNA regulation by protein kinase C." J Nephrol **14**(2): 98-103.
- Wartiovaara, J., L. G. Ofverstedt, et al. (2004). "Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography." J Clin Invest **114**(10): 1475-1483.
- Weber, S., O. Gribouval, et al. (2004). "NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence." Kidney Int **66**(2): 571-579.
- Weins, A., P. Kenlan, et al. (2005). "Mutational and Biological Analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis." J Am Soc Nephrol **16**(12): 3694-3701.
- Welsch, T., N. Endlich, et al. (2001). "CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes." Am J Physiol Renal Physiol **281**(4): F769-777.
- White, R. H., E. F. Glasgow, et al. (1970). "Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood." Lancet **1**(7661): 1353-1359.
- Winn, M. P., P. J. Conlon, et al. (2005). "A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis." Science **308**(5729): 1801-1804.
- Winn, M. P., P. J. Conlon, et al. (1999). "Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity." Genomics **58**(2): 113-120.
- Wolff, R. K., K. A. Frazer, et al. (1992). "Analysis of chromosome 22 deletions in neurofibromatosis type 2-related tumors." Am J Hum Genet **51**(3): 478-485.
- Yan, K., K. Nakahara, et al. (1998). "The increase of memory T cell subsets in children with idiopathic nephrotic syndrome." Nephron **79**(3): 274-278.
- Yang, Y., C. Jeanpierre, et al. (1999). "WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis." Am J Pathol **154**(1): 181-192.
- Yaoita, E., W. W. Franke, et al. (1999). "Identification of renal podocytes in multiple species: higher vertebrates are vimentin positive/lower vertebrates are desmin positive." Histochem Cell Biol **111**(2): 107-115.
- Yaoita, E., G. Wiche, et al. (1996). "Perinuclear distribution of plectin characterizes visceral epithelial cells of rat glomeruli." Am J Pathol **149**(1): 319-327.

- Yu, C. C., T. S. Yen, et al. (2001). "Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn." Curr Biol **11**(1): 34-38.
- Yu, Y., C. G. Leng, et al. (1997). "Ultrastructural study of glomerular capillary loops at different perfusion pressures as revealed by quick-freezing, freeze-substitution and conventional fixation methods." Nephron **76**(4): 452-459.
- Yu, Z., J. Ding, et al. (2004). "A novel mutation of NPHS2 identified in a Chinese family." Pediatr Nephrol **19**(11): 1285-1289.
- Yu, Z., J. Ding, et al. (2005). "Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children." Nephrol Dial Transplant **20**(5): 902-908.
- Zenker, M., T. Aigner, et al. (2004). "Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities." Hum Mol Genet **13**(21): 2625-2632.
- Zimmermann, J., H. Voss, et al. (1988). "Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol." FEBS Lett **233**(2): 432-436.

Ευρετήριο πινάκων και εικόνων

Πίνακας 1: Αίτια νεφρωσικού συνδρόμου (μετά τους πρώτους 3 μήνες ζωής)	14
Πίνακας 2: Εστιακή τμηματική σπειραματική σκλήρυνση όπως αναφέρεται στη βάση δεδομένων OMIN PubMed.	48
Πίνακας 3: Πίνακας γονιδίων μεταλλάξεις των οποίων οδηγούν σε SRNS	49
Πίνακας 4: Γονίδια υπεύθυνα για SRNS σε ενήλικες	59
Πίνακας 5: Κατηγορίες ασθενών που πήραν μέρος στην έρευνα με βάση τα κλινικά ευρήματα και το ιστορικό τους.	65
Πίνακας 6: συγκεντρωτικός πίνακας με τα κλινικά στοιχεία όλων των ασθενών	67
Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό των περιοχών στόχων του γονιδίου ACTN4	73
Πίνακας 8: Συνθήκες DGGE για έλεγχο μεταλλάξεων στο γονίδιο NPHS2 (ποδοκίνη)	75
Πίνακας 9: νουκλεοτιδικές αλλαγές σε εσώνια και εξώνια των περιοχών στόχων του γονιδίου NPHS2 ανά κλινική ομάδα και σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.	80
Πίνακας 10: νουκλεοτιδικές αλλαγές που αναγνωρίστηκαν στο γονίδιο ACTN4 (h:ετεροζυγωτία, H:ομοζυγωτία)	86
Πίνακας 11: Κλινικά δεδομένα και παθολογικοί γονότυποι ασθενών με μεταλλάξεις του μεταγραφικού παράγοντα WT1	93
Εικόνες	
Εικόνα 1: Ηλεκτρονική μικρογραφία των συστατικών του σπειραματικού φραγμού διηθήσεως	21
Εικόνα 2: Ιστολογικά ευρήματα από βιοψίες νεφρού ασθενών με SRNS	25
Εικόνα 3: Ιστομορφολογία βιοψίας νεφρού με κυτταρικού τύπου FSGS	26
Εικόνα 4: Άλλοι τύποι FSGS	27
Εικόνα 5: Ιστομορφολογία ασθενούς 16 ετών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα	27
Εικόνα 6: Οικογενή περιστατικά με υπολειπόμενο SRNS (FR-SRNS) και οι νουκλεοτιδικές αλλαγές που ανιχνεύθηκαν σε αυτά	69
Εικόνα 7: sequencing	77
Εικόνα 8: αποτελέσματα από την ανίχνευση παθολογικών μεταλλάξεων ασθενών με SRNS με τη μέθοδο re-sequencing	81