

Indice

1. La barriera di filtrazione glomerulare	3
1.1 Endotelio capillare fenestrato	4
1.2 Membrana basale glomerulare	4
1.3 Podociti	5
1.4 <i>Slit diaphragm</i> : struttura e natura molecolare	7
2. Il danno podocitario: glomerulosclerosi e sindrome nefrosica	12
2.1 Glomerulosclerosi focale e segmentale	14
2.1.1 Altri quadri istopatologici di podocitopatia	15
2.2 Sindrome nefrosica	16
2.2.1 Sindrome nefrosica steroideo-resistente	17
3. Geni podocitari e sindrome nefrosica	19
3.1 Fattori di trascrizione del podocita	21
3.1.1 <i>WT1</i>	22
3.1.2 <i>LMX1B</i>	24
3.2 Componenti della slit diaphragm	25
3.2.1 <i>NPHS1</i>	25
3.2.2 <i>NPHS2</i>	26
3.2.3 <i>CD2AP</i>	27
3.2.4 <i>TRPC6</i>	27
3.3 Componenti del citoscheletro podocitario	28
3.3.1 <i>ACTN4</i>	28
3.3.2 <i>MYH9</i>	28
3.3.3 <i>INF2</i>	29
3.4 Proteine citoplasmatiche e mitocondriali	29
3.4.1 <i>PLCE1</i>	30
3.4.2 <i>SCARB2</i>	30
3.4.3 <i>COQ2</i> , <i>PDSS2</i> e <i>MTTL1</i>	31
3.5 Proteine della membrana basale glomerulare	31
3.6 <i>PTPRO</i> , <i>MYO1E</i> ed <i>ITGA3</i>	34

4. Terapia della sindrome nefrosica e della glomerulosclerosi	35
4.1 Terapia farmacologica	35
4.2 Rigenerazione glomerulare con cellule staminali	38
5. Scopo della tesi	40
6. Materiali e metodi	41
6.1 Soggetti studiati	41
6.2 Estrazione del DNA	43
6.3 <i>Next Generation Sequencing</i>	43
6.4 <i>Targeted resequencing</i> di 45 geni podocitari	43
6.4.1 Selezione dei geni ed <i>array design</i>	44
6.4.2 Preparazione <i>library</i> di DNA ed amplificazione <i>pre-capture</i>	46
6.4.3 <i>Sequence capture</i> del DNA genomico: ibridazione in fase liquida con tecnica <i>NimbleGen</i>	49
6.4.4 emPCR: amplificazione clonale in emulsione	49
6.4.5 Sequenziamento con GS FLX Titanium 454 Roche	52
6.4.6 Analisi dei dati	54
6.4.7 Validazione varianti	55
6.5 <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>	56
7. Risultati	58
7.1 <i>Targeted resequencing</i> di 45 geni podocitari	58
7.1.1 Analisi della Run di sequenziamento e della <i>Sequence Capture</i>	58
7.1.2 Interpretazione delle varianti geniche individuate	61
7.1.3 Genotipo e fenotipo clinico	72
7.1.4 Genotipo e risposta alla terapia farmacologica	72
7.1.5 Genotipo e quadro istopatologico della biopsia renale	73
8. Discussione	76
Bibliografia	82

Capitolo 1

La barriera di filtrazione glomerulare

I reni, destro e sinistro, sono organi escretori situati nella parete posteriore dell'addome, in posizione retroperitoneale; oltre alla funzione emuntoria, hanno un ruolo nella regolazione del bilancio idrico, dell'equilibrio elettrolitico ed acido-base ed una funzione endocrina, in quanto producono gli ormoni renina ed eritropoietina e partecipano alla sintesi della vitamina D.

L'unità funzionale del rene è il nefrone; nell'uomo ogni rene contiene circa un milione di nefroni, ognuno dei quali è formato da un glomerulo capillare e da un tubulo.

Il glomerulo renale consiste di un gruppo di capillari sostenuti da cellule mesangiali. L'intero glomerulo è racchiuso dalla capsula di Bowman, dove si raccoglie il liquido filtrato, che da qui passa nel tubulo renale. L'alta pressione idrostatica intracapillare filtra il sangue in preurina; il filtro glomerulare consiste nella barriera di filtrazione glomerulare (BFG) (Fig. 1.1), che si compone di tre strati: l'endotelio capillare fenestrato, la membrana basale glomerulare ed uno strato di cellule endoteliali, i podociti, che ricoprono la superficie esterna della membrana basale.¹

L'ultrafiltrato glomerulare (preurina) è in media di 180 L/die; questo subisce, poi, un intenso processo di riassorbimento a livello del tubulo renale, per cui il volume urinario finale è ridotto a circa 1-1,5 L/die. Le molecole plasmatiche sono filtrate attraverso il glomerulo in base alla loro dimensione ed in base alla loro carica; molecole cariche negativamente o maggiori di 42 Å in diametro o di 200 kDa non vengono filtrate.

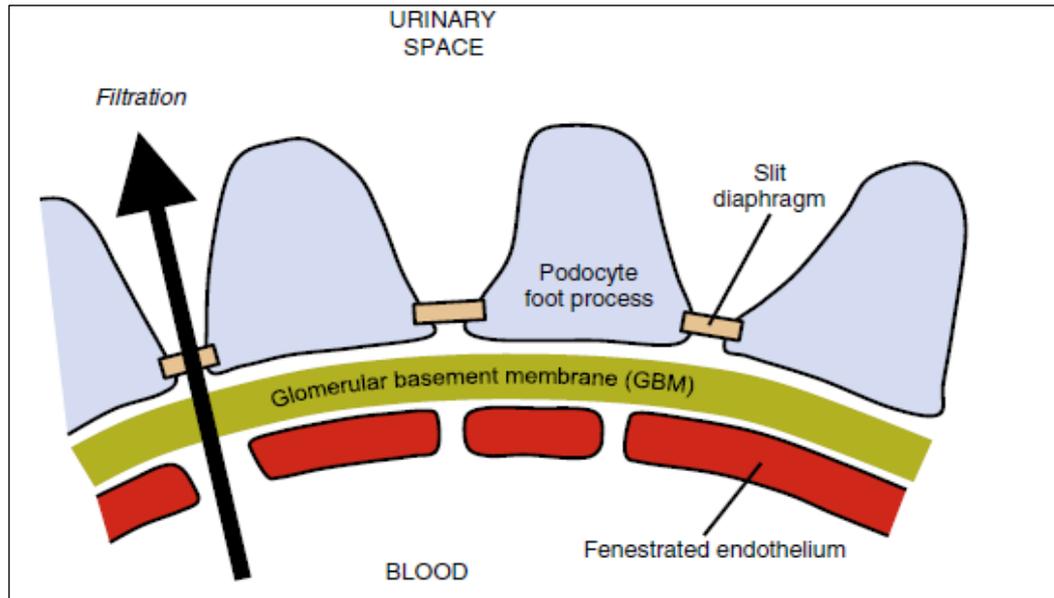


Fig. 1.1 Barriera di filtrazione glomerulare. E' composta dall'endotelio fenestrato, dalla membrana basale glomerulare e dai podociti. I podociti hanno il loro corpo cellulare all'interno dello spazio urinario e si ancorano alla membrana basale glomerulare attraverso i processi pedicellari, i quali sono separati tra loro da pori di filtrazione, coperti da una struttura a ponte definita '*slit diaphragm*'. Immagine ripresa da Leeuwis JW et al. (2010).²⁴

1.1 Endotelio capillare fenestrato

Le cellule endoteliali del glomerulo sono altamente fenestrate. Le *fenestrae* hanno un diametro di 70-100 nm e costituiscono il 20-25 % della superficie capillare del glomerulo.

Il diametro delle *fenestrae* è relativamente grande rispetto a quello dell'albumina, proteina fisiologicamente trattenuta dal filtro glomerulare; l'endotelio capillare non sembra quindi contribuire alla filtrazione, dimensione-dipendente, delle molecole plasmatiche. Tuttavia queste cellule, sul versante luminale, sono ricoperte da un glicocalice costituito da glicoproteine cariche negativamente, glicosaminoglicani e proteoglicani associati alla membrana delle cellule endoteliali; l'endotelio capillare sembra quindi avere un ruolo di filtro selettivo in base alla carica delle molecole plasmatiche.²

1.2 Membrana basale glomerulare

La membrana basale glomerulare (MBG) costituisce la struttura portante del glomerulo, cui le cellule endoteliali, da un lato, ed i podociti, dall'altro, si ancorano. E' costituita da una rete fibrosa, cui partecipano il collagene di tipo IV,

laminine e proteoglicani.

Il collagene di tipo IV è composto da catene $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$ e può essere considerato lo scheletro della membrana basale glomerulare: infatti mutazioni nei geni che codificano per il collagene di tipo IV causano la Sindrome di Alport, una malattia genetica che si manifesta con ematuria e progressivo decadimento della funzionalità renale.³

Le laminine sono proteine eterotrimeriche presenti in tutte le membrane basali, dove formano una rete con il collagene di tipo IV; nella MBG è soprattutto rappresentata la laminina-521, composta dalle catene $\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 1$. L'importanza di questa laminina per il funzionamento del filtro glomerulare è testimoniata dal fatto che mutazioni nel gene *LAMB2*, che codifica per la laminina $\beta 2$, causano una forma sindromica di sindrome nefrosica ad esordio precoce, nota come sindrome di Pierson.⁴

1.3 Podociti

I podociti sono cellule altamente specializzate e differenziate, localizzate sul versante esterno della MBG.

Hanno un voluminoso corpo cellulare che sporge nello spazio urinario; dal corpo cellulare partono delle lunghe proiezioni citoplasmatiche che si dividono in piccoli processi, chiamati processi pedicellari, i quali circondano la superficie esterna dei capillari. I processi pedicellari di podociti adiacenti si interdigitano tra loro in modo regolare, attraverso una giunzione cellulare specializzata detta *slit diaphragm* (SD), la quale copre a ponte i pori di filtrazione che separano un processo pedicellare dall'altro. Attraverso questi pori, coperti dalla SD, avviene la filtrazione del sangue in preurina.⁵ La SD divide la membrana plasmatica dei processi pedicellari in basale, apicale, e laterale (rappresentata dalla SD stessa). A livello citoplasmatico queste tre superfici sono interconnesse attraverso un citoscheletro di filamenti di actina.¹

Nel corpo cellulare, il reticolo endoplasmatico ed l'apparato di Golgi sono ampiamente rappresentati; al contrario, i processi pedicellari contengono solo pochi organelli. La densità di organelli nel corpo cellulare è espressione dell'intensa attività anabolica e catabolica del podocita, il quale svolge un ruolo importantissimo nel supporto e mantenimento della BFG, oltre a sintetizzare la maggior parte dei componenti della MBG.⁵ Altre funzioni podocitarie sono la

cooperazione con le altre cellule glomerulari, quali le cellule endoteliali e le cellule mesangiali, ed un ruolo di sorveglianza immunologica verso patogeni e proteine anomale eventualmente presenti nello spazio di Bowman, attraverso l'espressione costitutiva di un recettore *Toll-like* di tipo 4.⁶ Sul versante basale i podociti aderiscono alla MBG attraverso recettori cellulari transmembrana, quali integrine, tetraspanine e destroglicani (Fig. 1.2). Le integrine sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità α ed una β ; nei podociti l'isoforma $\alpha3\beta1$ è la più rappresentata. L'importanza di questa isoforma è testimoniata da esperimenti su topi *knock-out* per l'integrina $\alpha3$, i quali mostrano difficoltà nello sviluppo del glomerulo capillare e su topi in cui l'espressione dell'integrina è soppressa durante lo sviluppo podocitario. Questi ultimi sviluppano una massiva proteinuria dopo la nascita e, al microscopio elettronico, i glomeruli mostrano una completa retrazione dei pedicelli.⁷ L'integrina $\alpha3\beta1$ è il recettore della laminina-521; l'alterazione di questo complesso porta perciò ad un indebolimento dell'adesione dei podociti alla MBG, causando il distacco dei podociti dalla stessa, e quindi proteinuria. Recentemente la tetraspanina CD151 è stata localizzata a livello dei processi pedicellari ed esperimenti su topi *knock-out* per CD151 hanno mostrato lo sviluppo di proteinuria in assenza di questa proteina.⁸

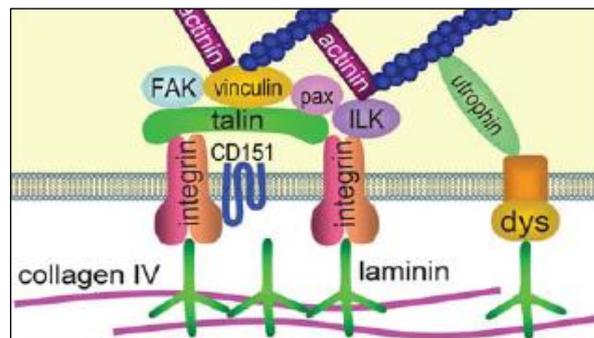


Fig. 1.2. Struttura molecolare sul versante basale del podocita. L'integrina $\alpha3\beta1$ interagisce con la laminina-521 permettendo così l'ancoraggio dei podociti alla MBG. Immagine ripresa da *Zenker M et al. (2009).*²⁵

Sul versante apicale la membrana plasmatica dei processi pedicellari è ricca di podocalicina, la quale è una proteina transmembrana O-glicosilata e ricca di acido sialico, responsabile della carica negativa del dominio apicale della membrana. La perdita di questa proteina o della sua carica negativa risulta in retrazione dei processi pedicellari.⁹

Il mantenimento della polarizzazione cellulare e della struttura dei processi

pedicellari è permesso da un citoscheletro altamente sviluppato. A livello del corpo cellulare prevale un citoscheletro composto di microtubuli e filamenti intermedi, mentre i microfilamenti di actina predominano a livello pedicellare, dove sono parte di un complesso apparato contrattile. I filamenti di actina mantengono la loro struttura grazie a proteine *crosslinker*, quali la α -actinina-4, il cui gene, *ACTN4*, è stato trovato mutato in forme autosomiche dominanti di glomerulosclerosi focale e segmentale.¹⁰ L'attività dell' α -actinina-4 è regolata dalla sinaptopodina, una proteina ricca in prolina.¹¹ Sul versante laterale dei processi pedicellari il citoscheletro è legato al complesso della SD attraverso molecole adattatrici quali ZO-1, catenine e CD2AP, che legano proteine quali la nefrina e la p-caderina ai filamenti di actina. Esiste anche un sistema di filamenti di actina a localizzazione subplasmalemmatica, il quale si connette alla podocalicina, attraverso l'erzina e NHERF2 (fattore regolatore 2 dello scambiatore Na^+/H^+).⁵

1.4 Slit diaphragm: struttura e natura molecolare

La SD è una giunzione cellulare altamente specializzata che connette i processi pedicellari, creando una membrana che copre il poro di filtrazione. Nel 1974 Karnovsky et al.¹² ne hanno rivelato l'aspetto al microscopio elettronico (Fig. 1.3) e l'hanno descritta come una struttura *zipper-like* con pori di diametro più piccolo di quello dell'albumina.

Dal punto di vista molecolare nella SD si trovano proteine comunemente presenti nella maggior parte delle giunzioni intercellulari, ma anche proteine a specifica espressione podocitaria, che rendono questa giunzione intercellulare una giunzione specializzata nell'ultrafiltrazione renale (Fig. 1.4). Le proteine che costituiscono il complesso della SD, sono: nefrina, NEPH1-2-3, podocina, Fat1, VE-caderina e P-caderina.¹³

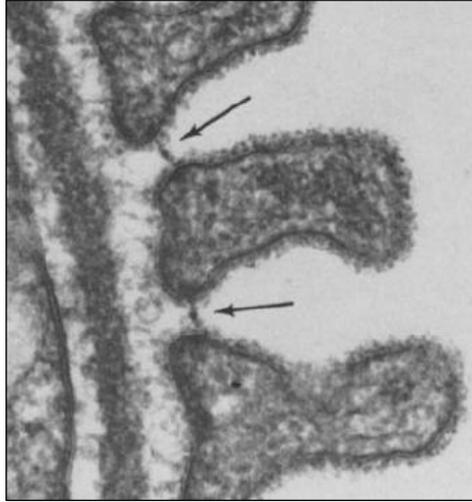


Fig. 1.3 Immagine al microscopio elettronico della BFG di un glomerulo renale di topo. La slit diaphragm (indiacata dalle frecce) appare come una linea elettrondensa che collega a ponte processi pedicellari adiacenti. Immagine ripresa da *Karnovsky et al. (1974)*.¹²

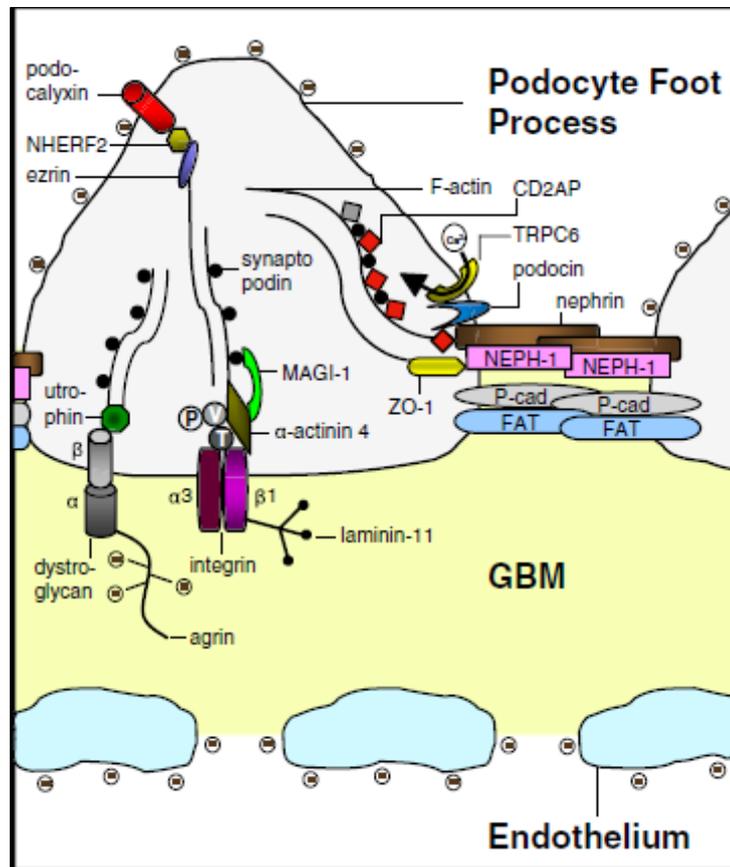


Fig. 1.4. Struttura molecolare della SD. Immagine ripresa da *Löwik MM et al. (2009)*.²⁶

La nefrina è stata la prima proteina della SD ad essere stata identificata attraverso clonaggio posizionale del gene che la codifica, *NPHS1*; mutazioni in questo gene sono responsabili della sindrome nefrosica congenita di tipo finnico, la quale si manifesta con proteinuria massiva già in fase perinatale.¹⁴ E' la molecola chiave della SD, in cui svolge un ruolo strutturale, ma anche di *signaling*. E' una proteina transmembrana di circa 185-200 kDa con un corto dominio intracellulare ed un dominio extracellulare con un motivo prossimale *fibronectina-tipo-3-like* ed otto motivi distali *IgG-like*. L'intero dominio extracellulare è lungo circa 35 nm. Molecole di nefrina da adiacenti processi pedicellari interagiscono al centro della SD attraverso interazioni omofiliche, formando una struttura *zipper-like* al centro della SD (Fig. 1.5 a e b) con pori su entrambi i lati della zona densa centrale.¹⁵ Il dominio citoplasmatico della nefrina è impegnato invece in funzioni di *signaling* intracellulare.

La podocina è un'altra importante proteina della SD; è codificata dal gene *NPHS2*, le cui mutazioni causano forme di sindrome nefrosica steroido-resistente con glomerulosclerosi focale e segmentale a trasmissione autosomica recessiva.¹⁶ Appartiene alla famiglia delle stomatine, ed è esclusivamente espressa nel podocita. Ha una struttura *hairpin-like* con entrambe le estremità localizzate a livello intracellulare. E' localizzata a livello dell'inserzione della SD dove si accumula in forma oligomerica associandosi ai *lipid rafts*, microdomini specializzati ricchi in glicosfingolipidie e colesterolo; si lega inoltre anche a CD2AP e alla nefrina attraverso il COOH-terminale, presentandosi quindi come una proteina *scaffold*, essenziale per l'organizzazione del complesso della SD.¹⁷

CD2AP è una proteina intracellulare inizialmente caratterizzata come proteina adattatrice dei linfociti T CD2 e successivamente localizzata anche nel citoplasma dei podociti dove connette la nefrina e la SD tutta, al citoscheletro di actina. Topi *knock-out* per il gene *CD2AP* muoiono precocemente per insufficienza renale, testimoniando l'importanza di questa proteina nel rene.¹⁸

Le proteine transmembrana della famiglia Neph (Neph1, Neph2) sono state localizzate alla SD e sono strutturalmente legate alla nefrina (Fig. 1.5 c); ognuna di esse ha motivi extracellulari *IgG-like* attraverso i quali forma etero-oligomeri con la nefrina.¹⁹

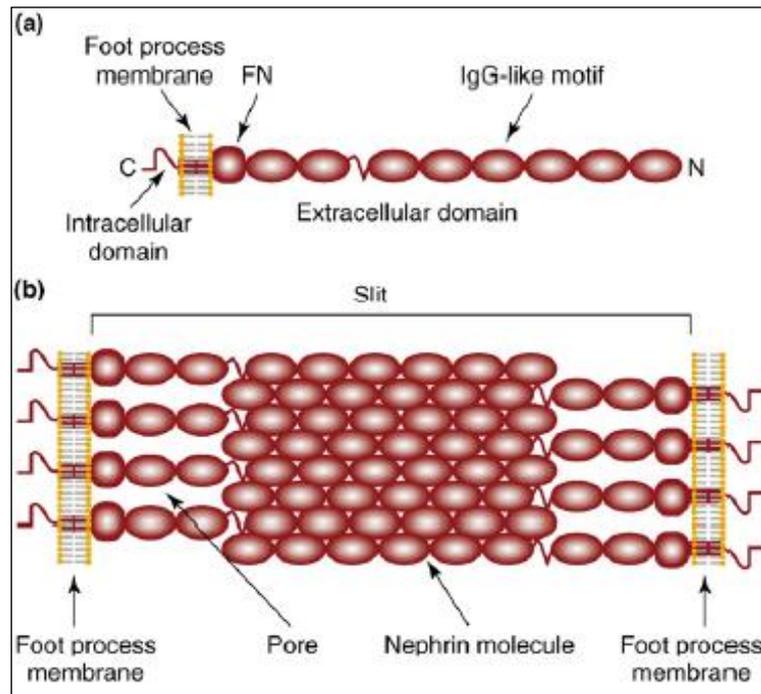


Fig. 1.5a Struttura della nefrina: dominio intracellulare, dominio transmembrana e dominio extracellulare con un motivo prossimale fibronectina-tipo-3-like ed otto motivi distali IgG-like; **b** interazioni omofiliche tra molecole di nefrina provenienti da processi pedicellari diversi, con formazione di una struttura densa centralmente al poro di filtrazione e di una struttura porosa lateralmente. Immagine ripresa da *Patrakka J et al. (2007)*.¹⁵

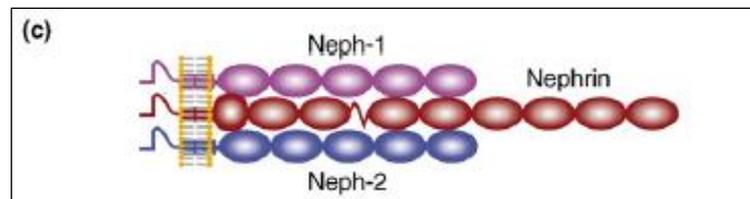


Fig. 1.5c Interazione della nefrina con Neph1 e Neph2. Immagine ripresa da *Patrakka J et al. (2007)*.¹⁵

Anche la protocaderina Fat1, P-caderina e la caderina dell'endotelio vascolare (VE-caderina) sono state localizzate a livello della SD. Fat1, insieme a nefrina, Neph1 e podocina, è essenziale per la formazione di una normale barriera di filtrazione glomerulare: topi *knock-out* per Fat1 presentano proteinuria ed assenza di SD;²⁰ al contrario la P-caderina non sembra essenziale per il funzionamento del filtro renale, mentre il ruolo della VE-caderina nei podociti è ancora sconosciuto. A livello della SD si localizzano anche ZO-1, una proteina intracellulare ampiamente espressa nelle giunzioni strette epiteliali e MAGI-1; il loro ruolo a livello podocitario è, però, ancora sconosciuto.²¹

A livello della SD si trova anche il canale TRPC6 (*Transient Receptor*

Potential Cation channel subfamily C-6), che appartiene alla famiglia dei canali cationici non selettivi, ed è coinvolto nella regolazione della concentrazione intracellulare di calcio in risposta all'attivazione di vie di trasduzione da parte della fosfolipasi C (PLC). TRPC6 è localizzato in vicinanza della SD dove interagisce con nefrina e podocina.²² Mutazioni nel gene, che codifica per questo canale sono state trovate in famiglie con glomerulosclerosi focale e segmentale a trasmissione autosomica dominante.²³

Capitolo 2

Il danno podocitario: glomerulosclerosi e sindrome nefrosica

Perchè il podocita possa svolgere le sue importanti funzioni è necessario che la sua complessa architettura cellulare e molecolare sia integra; in particolare non devono esserci danni a carico del complesso della *slit diaphragm*, del citoscheletro di actina, incluse le proteine ad esso associate, del 'microambiente' podocitario, rappresentato dalla membrana basale glomerulare e del *signaling* intra- ed extracellulare, che contribuisce al mantenimento dello stato differenziato.²⁷

La classica manifestazione del danno podocitario è la proteinuria, per alterazione della barriera di filtrazione glomerulare. Il danno al podocita può derivare da un difetto intrinseco, quale una mutazione in un gene podocitario o da uno stress estrinseco, quale un'infezione o un disordine immunologico. (Tabella 2.1)

Tabella 2.1 Cause di danno podocitario.

Danno podocitario	Danno podocitario
Mutazioni in: geni per fattori trascrizionali geni per proteine del citoscheletro geni per proteine del complesso della SD geni per proteine citoplasmatiche e di membrana geni per proteine mitocondriali geni per componenti della membrana basale glomerulare	infezioni virali farmaci e tossine glomerulomegalia ischemia acuta e microangiopatia trombotica danno immunologico diabete

In un podocita sottoposto ad un danno, sia nell'uomo che nel modello animale, è possibile, con il microscopio elettronico, individuare la comparsa di vacuolizzazione, di corpi di inclusione citoplasmatici, il distacco dalla membrana basale glomerulare ed il fenomeno dell'*effacement*, il quale consiste in un processo attivo di riorganizzazione e redistribuzione del citoscheletro di actina che porta ad appiattimento, retrazione ed accorciamento dei processi pedicellari, con perdita dell'interdigitazione con i processi delle cellule confinanti. Nel rene umano adulto ci sono circa 500-600 podociti per glomerulo; queste cellule hanno un *turnover* molto basso, per cui, se alcuni podociti vengono persi per apoptosi o distaccamento dalla MBG, le cellule rimanenti hanno poche possibilità di ricoprire le aree vuote a livello della membrana basale glomerulare. A livello di queste aree si formano delle sinechie con le cellule epiteliali parietali della capsula di Bowman.²⁸ E' così che si sviluppa la glomerulosclerosi focale e segmentale (Fig. 2.1).

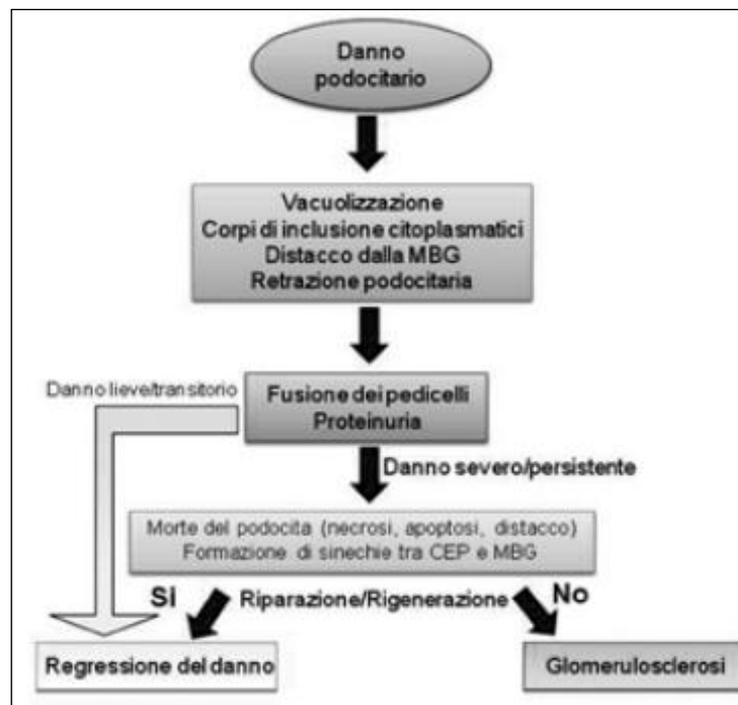
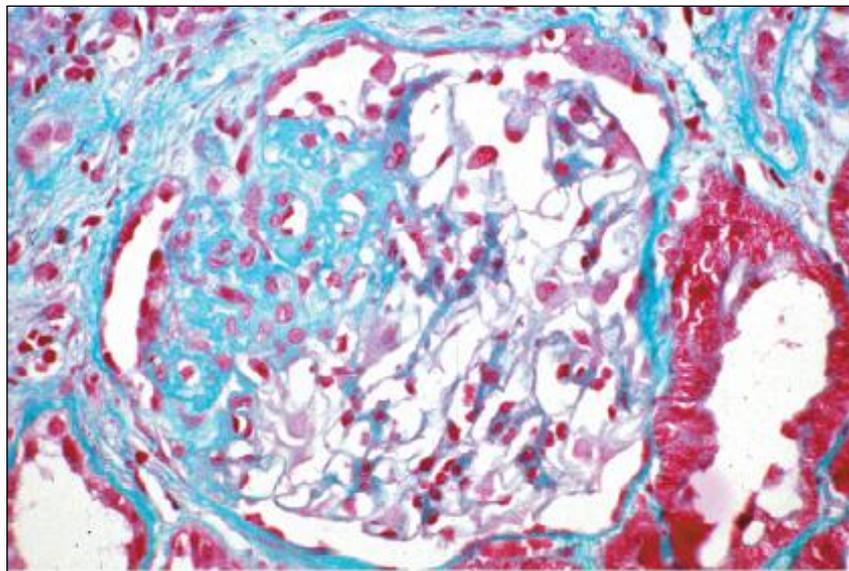


Fig. 2.1 Danno podocitario e progressione verso la glomerulosclerosi. Quando il danno è severo/persistente si ha morte podocitaria, diminuzione del numero dei podociti, esposizione di regioni della MBG e formazione di sinechie. Il mancato intervento di processi riparativi conduce alla glomerulosclerosi. Immagine ripresa da *Ronconi E. et al. (2009)*.²⁹

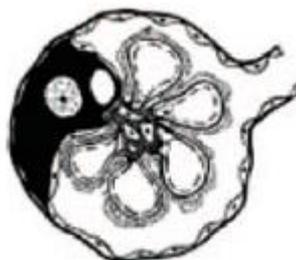
2.1 Glomerulosclerosi focale e segmentale

La glomerulosclerosi focale e segmentale (GSFS) consiste in un processo di sclerosi glomerulare caratterizzato da segmentarietà, per la quale la lesione colpisce soltanto parte di un glomerulo e focalità, per cui non tutti i glomeruli sono colpiti (Fig. 2.2 A e B). Le lesioni inizialmente interessano i glomeruli della giunzione cortico-midollare; con il progredire della patologia la sclerosi assume un aspetto più diffuso e globale. Inoltre è solitamente presente ialinosi diffusa, mentre l'indagine di immunofluorescenza comunemente evidenzia depositi mesangiali di IgM e C3.²⁶

La GSFS può essere primitiva o secondaria; le forme secondarie possono essere dovute ad infezioni, quali l'epatite C e l'HIV, a farmaci o tossine, all'obesità, ad ischemia renale acuta.³⁰



A



B

Fig. 2.2 A. Aspetto istologico di GSFS. Immagine ripresa da *Eddy AA et al. (2003)*³⁷; **B.** Schema di GSFS, in cui si ha sclerosi segmentale del glomerulo, con perdita podocitaria, ed accumulo di matrice extracellulare. Immagine ripresa da *Barisoni L. et al. (2007)*.²⁷

Il principio fisiopatologico comune alle varie varianti di GSFS è rappresentato dalla perdita di podociti. Il numero di podociti in un glomerulo è un fattore determinante per la possibilità di evoluzione in GSFS; uno studio su un modello murino con espressione transgenica podocitaria per il recettore della tossina difterica ha dimostrato come una perdita podocitaria del 10-20% possa essere recuperata, una perdita del 20-40% risulti in una risposta cicatriziale, mentre per livelli di perdita superiori al 40%, i glomeruli diventano sclerotici e perdano la capacità di filtrazione.³¹

2.1.1 Altri quadri istopatologici di podocitopatia

Il podocita può rispondere al danno anche con il solo fenomeno dell'*effacement*, senza variazione nel numero di podociti: si ha così il quadro istopatologico della malattia a lesioni minime (MCD, *minimal change disease*), caratterizzata dall'assenza di alterazioni all'osservazione al microscopio ottico mentre all'esame al microscopio elettronico è visibile la retrazione dei pedicelli. (Fig. 2.3)

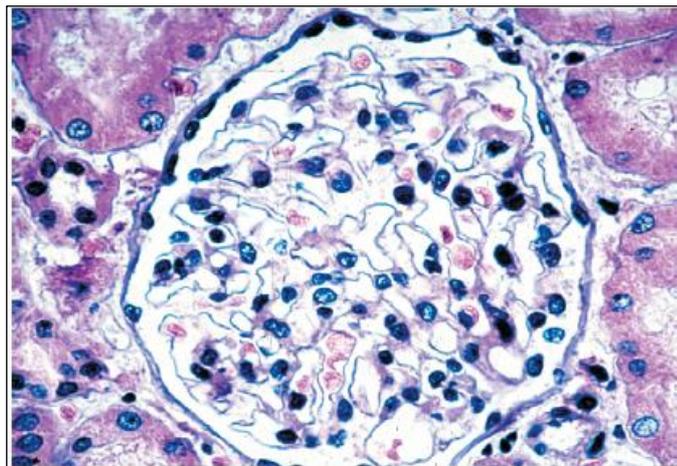


Fig. 2.3. Aspetto istopatologico di malattia a lesioni minime. Alla microscopia ottica non sono visibili alterazioni patologiche. Immagine ripresa da *Eddy AA et al. (2003)*.³⁵

Altro quadro istopatologico possibile è la sclerosi mesangiale diffusa, caratterizzata da espansione mesangiale, per accumulo di matrice extracellulare, e da ipertrofia podocitaria.²⁷

2.2 Sindrome nefrosica

Il danno podocitario si esprime clinicamente con la comparsa di proteinuria, ovvero con un aumentata concentrazione urinaria di proteine plasmatiche, che normalmente non superano il filtro renale; tra queste soprattutto l'albumina.

In particolare si parla di sindrome nefrosica in caso di riscontro di valori di proteinuria superiori a 40mg/m²/h (o di un rapporto Proteinuria/Creatininuria >2.0) con albuminemia inferiore a 2,5g/dL; alla proteinuria si associa un quadro clinico di edemi ed iperlipidemia.

La sindrome nefrosica è una patologia renale comune nei bambini: negli Stati Uniti e in Europa l'incidenza è di circa 1-3 bambini su 100.000, con una prevalenza di 16 su 100.000 bambini. Colpisce soprattutto bambini di 3-6 anni. Secondo lo studio ISKDC (*International Study of Kidney Disease in Children*)³² l'80% dei bambini con sindrome nefrosica risponde positivamente ad 8 settimane di terapia con prednisone. Il rimanente 20%, steroideo-resistente, è particolarmente a rischio per lo sviluppo di insufficienza renale terminale, che compare nel 30-40% dei casi entro 10 anni dalla diagnosi.³³

Si pensa che, nelle forme steroideo-responsive, il meccanismo fisiopatologico sia di tipo immunitario, probabilmente legato alla presenza di un fattore proteinurico circolante non ancora identificato, la cui produzione sembra in relazione ad una disfunzione dei linfociti T.³⁶ Il quadro istopatologico in questi casi è rappresentato, nella maggior parte dei casi, da MCD.³²

La principale manifestazione clinica della sindrome nefrosica è l'edema, la cui patogenesi è ancora oggetto di dibattito. Alcuni sostengono la cosiddetta teoria dell'*under-filling*, secondo la quale l'edema è dovuto a passaggio di liquidi nello spazio interstiziale per riduzione della pressione oncotica plasmatica, a sua volta determinata dall'ipoalbuminemia; secondariamente si sviluppa ritenzione idro-sodica per compensare la perdita di volume intravascolare. Altri sono a favore della teoria dell'*over-filling*, secondo la quale l'edema è dovuto ad un primitivo difetto nell'escrezione del sodio: si realizza quindi un aumentato riassorbimento di acqua ed espansione del volume intravascolare, fino alla comparsa di edema per aumentata pressione idrostatica intravascolare.³⁵

L'edema rappresenta spesso il primo segno clinico: inizialmente si localizza ai tessuti periorbitari ed agli arti inferiori, poi può coinvolgere lo scroto o le grandi

labbra fino ad un quadro di anasarca, con versamenti pleurici e peritoneali. All'edema si associa aumento di peso. Gli esami ematici evidenziano ipoproteinemia con ipoalbuminemia ($<2,5$ g/dL); l'elettroforesi delle sieroproteine mostra inoltre un marcato aumento delle bande α_2 e β . Molto spesso si riscontra anche ipercolesterolemia ed ipertrigliceridemia. L'iperlipidemia è dovuta ad un'aumentata attività proteosintetica epatica, in risposta alla ridotta pressione oncologica plasmatica, causata dalla proteinuria: aumenta, quindi, anche la quantità di lipoproteine circolanti.³⁵

2.2.1 Sindrome nefrosica steroideo-resistente

Il trattamento di una sindrome nefrosica di nuova insorgenza consiste in 4 settimane di terapia con prednisone alla dose di 60mg/m²/die, con successivo *tapering* della dose fino alla sospensione del trattamento. Si parla di sindrome nefrosica steroideo-resistente (SNSR) se, dopo 4 settimane di trattamento con prednisone (60mg/m²/die), non si ha remissione, ovvero marcata riduzione della proteinuria, risoluzione dell'edema e normalizzazione dell'albuminemia.

Come già detto, le forme steroideo-resistenti rappresentano il 20% delle sindromi nefrosiche nel bambino; dal punto di vista istopatologico, il quadro più frequente nelle forme resistenti è la GSFS; secondo lo studio ISKDC soltanto il 30% delle GSFS ottiene la remissione del quadro clinico con terapia steroidea, rispetto al 92% delle forme con MCD.³²

Sono forme a prognosi peggiore in quanto, nella nefrosi, il più importante fattore prognostico per il mantenimento a lungo termine di una normale funzione renale è proprio l'iniziale risposta ai corticosteroidi. La steroideo-resistenza determina, insieme allo sviluppo delle complicanze caratteristiche della sindrome nefrosica, la progressione verso l'insufficienza renale terminale, che rappresenta indicazione al trapianto renale.³⁵ Tuttavia, nelle GSFS, esiste un rischio di recidiva post-trapianto di circa il 25%.³⁶

Le complicanze della sindrome nefrosica sono di tipo infettivo, tromboembolico e legate all'aumento del rischio cardiovascolare. A queste si aggiungono le complicanze specifiche dei farmaci utilizzati per il trattamento, in particolare l'effetto dei corticosteroidi sulla maturazione ossea. La perdita urinaria di IgG e di fattori del complemento, associata all'uso di steroidi ed altri farmaci immunosoppressori, rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo di infezioni. L'infezione più comune e più grave è la peritonite batterica; altri tipi di infezione

sono celluliti, meningiti, polmoniti e sepsi. Tra le infezioni virali soprattutto la varicella può essere pericolosa: è quindi necessario valutare l'eventuale immunità verso il virus e, nel caso il bambino non sia immune, si devono somministrare immunoglobuline specifiche contro il virus.

La sindrome nefrosica rientra tra le sindromi da ipercoagulabilità: l'aumentata sintesi epatica di fattori pro-coagulativi e la perdita urinaria di inibitori della coagulazione determinano un aumentato rischio di trombosi, che si presenta nell'1,8-5% dei bambini con la sindrome.³⁷ In caso di trombocitosi severa, è da considerare l'uso dell'aspirina. Altri fattori di rischio cardiovascolare nel bambino, con sindrome nefrosica, sono rappresentati dall'iperlipidemia e dall'ipertensione, che devono dunque essere trattate adeguatamente.

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno mostrato che le forme di sindrome nefrosica steroideo-resistenti hanno molto spesso una base genetica, legata a mutazioni in geni essenziali per l'integrità e il funzionamento della barriera di filtrazione glomerulare ed, in particolare, in geni del podocita, il quale ha quindi assunto un ruolo chiave nella patogenesi delle glomerulopatie. Ad esempio, in uno studio su 89 bambini con sindrome nefrosica esordita nel primo anno di vita, l'analisi genetica nei geni *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1* e *LAMB2* ha evidenziato in questi mutazioni nel 66,3% dei casi, e, in particolare, tali mutazioni sono state trovate in quei bambini con forme steroideo-resistenti.³⁸

Le difficoltà terapeutiche che caratterizzano queste forme geneticamente determinate impongono la necessità di uno *screening* genetico sempre più ampio e rapido, in modo da non intraprendere terapie che molto spesso sono inutili, e non certo prive di effetti collaterali.

Capitolo 3

Geni podocitari e sindrome nefrosica

Come abbiamo visto, alcune forme di sindrome nefrosica, in particolare quelle steroido-resistenti, sono dovute a mutazione in geni podocitari importanti per il mantenimento dell'integrità della barriera di filtrazione glomerulare. E' importante sottolineare come la sindrome nefrosica sia, dal punto di vista genetico, una patologia caratterizzata da eterogeneità genetica e da variabilità fenotipica. Ad oggi sono numerosi i geni individuati come responsabili della sindrome, sia in forma isolata, che all'interno di quadri sindromici più complessi.³⁹ (Tabella 3.1)

Questi geni appartengono fondamentalmente a cinque gruppi:

- fattori di trascrizione del podocita;
- proteine del complesso della *slit diaphragm*;
- componenti del citoscheletro di actina;
- proteine citoplasmatiche e mitocondriali;
- proteine della membrana basale glomerulare.

In uno studio su 19 pazienti con sindrome nefrosica steroido-resistente non familiare, l'analisi di sette geni podocitari (*NPHS1*, *NPHS2*, *ACTN4*, *CD2AP*, *WT-1*, *TRPC6* e *PLCE1*) ha messo in luce la possibilità che un paziente possa presentare mutazioni in più geni malattia (genotipo composto); ad esempio un paziente presentava una mutazione eterozigote in *NPHS2* ed una mutazione eterozigote in *CD2AP*; un altro caso presentava addirittura un genotipo 'trialelico' con una mutazione eterozigote composta in *NPHS2* e una mutazione

eterozigote in *NPHS1*.⁴⁰ Questi risultati sottolineano la necessità di analizzare più geni malattia per ogni paziente, in quanto il fenotipo clinico può essere anche il risultato di una combinazione di mutazioni a carico di geni podocitari.

3.1 Fattori di trascrizione del podocita

I fattori di trascrizione sono essenziali, a livello podocitario, per lo sviluppo del glomerulo renale e per il mantenimento di tale stato differenziato. Il nefrone origina dal mesenchima del blastema metanefrico, la cui differenziazione in glomerulo e tubulo renale è indotta dalla gemma ureterica. Dalle stesse cellule mesenchimali originano quindi tipi cellulari molto diversi e altamente specializzati, tra cui i podociti.⁴¹ Esiste una vera e propria linea temporale per l'espressione di questi fattori di trascrizione, che a loro volta regolano l'espressione delle più importanti proteine podocitarie (Fig. 3.1).

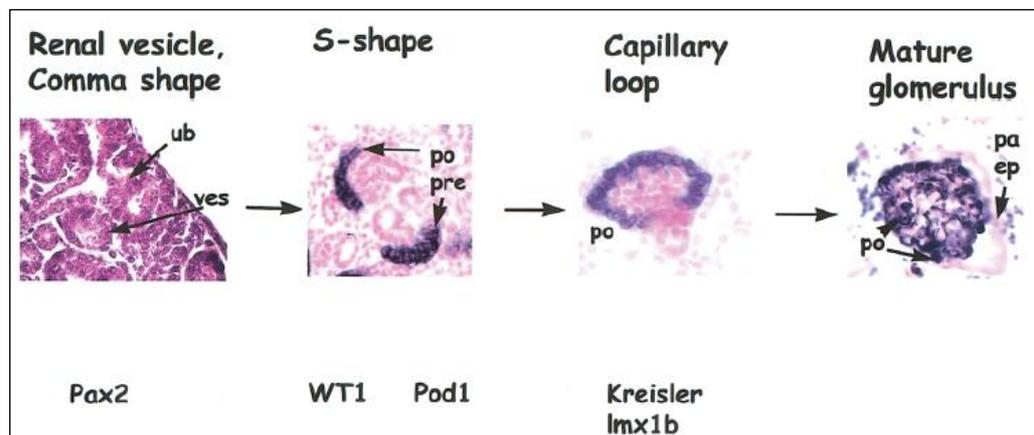


Fig 3.1 Espressione dei fattori di trascrizione podocitari durante le fasi di embriogenesi del glomerulo. Immagine ripresa da *Quaggin SE (2002)*.⁴¹

Il primo fattore di trascrizione ad essere espresso è *PAX2*, un gene *homeobox*, essenziale per l'iniziale conversione delle cellule mesenchimali del blastema metanefrico in cellule epiteliali.⁴² Successivamente l'espressione di *PAX2* si riduce ed allo stesso tempo aumenta quella del fattore di trascrizione *WT1*, che costituisce un marker podocitario importante durante lo sviluppo e la vita adulta; è lo stesso *WT1* che riduce l'espressione di *PAX2*.⁴³ Insieme a *WT1* è anche espresso *Pod-1*, un fattore di trascrizione *helix-loop-helix* simile a *WT1*. Nelle fasi successive sono espressi i fattori di trascrizione *Kreisler* (*mafB*) e *Lmx1b*.⁴³ (Fig. 3.1)

Alcuni di questi fattori di trascrizione, quali *WT1* e *LMX1B*, appartengono al gruppo di geni ad oggi identificati come causa di sindrome nefrosica, per altri l'effetto dannoso sul rene è stato dimostrato soltanto in modelli animali.⁴⁴

3.1.1 *WT1*

Il gene *WT1* (*Wilms' Tumor 1*), identificato tramite clonaggio posizionale in bambini con una sindrome caratterizzata da tumore di Wilms, anidria, malformazioni genitourinarie e ritardo mentale,⁴⁵ mappa in 11p13, contiene 10 esoni e codifica per un fattore di trascrizione *zinc-finger* che regola l'espressione di molti geni attraverso il legame al DNA. A livello genico gli esoni 1-6 codificano per una regione ricca in prolina e glutammina, coinvolta nella attivazione/repressione trascrizionale e nella omodimerizzazione della proteina, mentre gli esoni 7-10 codificano per 4 domini *zinc-fingers* per il legame al DNA, ognuno dei quali consiste in una sequenza di 28-30 aminoacidi, tra cui una coppia di istidine e cisteine legate ad un atomo di zinco a formare il *finger*. Il gene è sottoposto a *splicing* alternativo in due siti: uno determina l'inclusione/esclusione di 17 aminoacidi codificati dall'esone 5, l'altro l'inclusione/esclusione della triade aminoacidica lisina-treonina-serina (KTS) nell'esone 9, tra i domini *zinc fingers* 3 e 4. Queste quattro isoforme sono espresse in modo stabile e proporzionale durante lo sviluppo e la vita adulta; l'isoforma KTS+ rappresenta l'80% dei trascritti.⁴⁶ È ampiamente espresso a livello renale dove ha un ruolo molto importante nello sviluppo dell'apparato urinario; mutazioni in questo gene possono causare lo sviluppo di tumori o sindromi come la sindrome di Denys-Drash e la sindrome di Frasier, ma anche forme di sclerosi mesangiale diffusa isolata o di sindrome nefrosica isolata. La sindrome di Denys-Drash si caratterizza per la presenza di pseudoermafroditismo maschile associato ad una precoce comparsa di sindrome nefrosica, caratterizzata da sclerosi mesangiale diffusa e rapida progressione ad insufficienza renale, e all'aumentato rischio di sviluppare tumore di Wilms. In pazienti con la sindrome le mutazioni, per lo più di tipo *missense*, sono state trovate a livello degli esoni 8 e 9 che codificano per gli *zinc-fingers* 2 e 3. Mutazioni negli stessi siti sono state trovate anche in forme di sindrome nefrosica isolata con sclerosi mesangiale diffusa o GSFS, prevalentemente in soggetti di sesso femminile.⁴⁷

Soggetti con sindrome di Frasier presentano genitali esterni femminili con gonadi fibrose, cariotipo XY e sviluppano una nefropatia progressiva con sindrome nefrosica e GSFS a rapida evoluzione verso l'insufficienza renale terminale; si associa anche un aumentato rischio di sviluppare un gonadoblastoma. In questo caso abbiamo mutazioni al sito donatore di *splicing* dell'introne 9 con perdita dell'isoforma KTS+.⁴⁸

Nella cellula podocitaria sono direttamente regolati da *WT1* i geni che codificano per podocalicina, nefrina e *PAX2*.^{49,50,43} In particolare, in alcuni pazienti con sindrome di Denys Drash, accanto ad una ridotta o assente espressione nucleare di *WT1*, si è trovata espressione podocitaria di *PAX2*, normalmente espresso soltanto nelle fasi di sviluppo del glomerulo renale.⁵¹

Due proteine associate a *WT1*, *WTIP* (WT1-interacting protein) e *BASP-1* (brain acid soluble protein 1) sono anch'esse espresse nel podocita e funzionano come co-soppressori dell'attività trascrizionale di *WT1*.⁴⁴ *WTIP* è codificata dal gene *WTIP*, localizzato in 19q13.11; ha tre domini LIM per l'interazione proteina-proteina, con struttura simile ad una molecola di adesione. In glomeruli normali, *WTIP* sembra localizzarsi a livello di un complesso multiproteico nei processi pedicellari, con possibile interazione con il complesso CD2AP-nefrina-podocina. In caso di danno podocitario (Fig. 3.2) *WTIP* trasloca nel nucleo, dove si associa con *WT1*, inibendone l'attività trascrizionale, portando quindi a perdita del fenotipo podocitario, con redistribuzione delle proteine della SD e riarrangiamento del citoscheletro di actina, con conseguente *effacement* pedicellare.⁵²

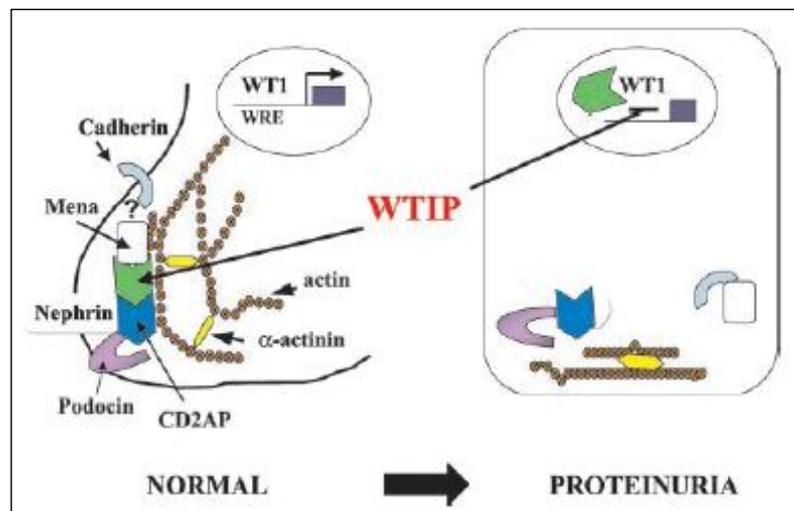


Fig 3.2. Un modello per la funzione di *WTIP* nel podocita. Nel podocita normale *WTIP* fa parte di un complesso multiproteico a livello dei processi pedicellari ed interagisce con il complesso della SD. In seguito ad un danno *WTIP* trasloca nel nucleo, dove reprime l'azione di *WT1*.

Immagine ripresa da Srichai MB et al. (2004).⁵²

BASP1 è codificata dal gene *BASP1*, che mappa in 5p15.1; é localizzato a livello nucleare dove può bloccare l'attività trascrizionale di WT1; entrambe queste proteine sono co-esprese durante la nefrogenesi e sono espresse a livello podocitario durante la vita adulta.⁵³

3.1.2 *LMX1B*

Il gene *LMX1B*, localizzato in 9q33.3, contiene 8 esoni e codifica per Lmx1b, ovvero il fattore di trascrizione *LIM-homeobox 1β*. Mutazioni del gene sono responsabili per la sindrome nail-patella, anche detta onico-osteo- displasia, una malattia ereditaria autosomica dominante caratterizzata da displasia ungueale con lunula triangolare, ipoplasia/agenesia delle rotule, esostosi iliache e displasia dei gomiti.⁵⁴ Può esservi coinvolgimento oculare e ipoacusia neurosensoriale. In un terzo dei casi vi è coinvolgimento renale, con proteinuria ed un alto rischio di insufficienza renale. Ultrastrutturalmente la membrana basale glomerulare si presenta ispessita e in parte dei podociti si realizza il fenomeno dell'*effacement*.⁵⁵ *LMX1B* codifica per un fattore di trascrizione che contiene due domini *zinc-binding* LIM all' N-terminale ed un dominio per il legame al DNA nella porzione centrale. I domini LIM mediano l'interazione proteina-proteina. Le mutazioni descritte fino ad ora determinano l'assenza o l'inattivazione dell'omeodominio, rendendo impossibile il legame con le proteine target. Numerosi studi su topi *knock-out* per *LMX1B* hanno dimostrato l'importante ruolo di questo gene nella determinazione del fenotipo podocitario: questi topi mostrano podociti con pochi rudimentali processi pedicellari, privi di SD.⁵⁶⁻⁵⁷ Dal punto di vista trascrizionale l'assenza di *LMX1B* determina mancata espressione della podocina, codificata da *NPHS2*, al cui promotore Lmx1b si lega, regolandone la trascrizione; risulta ridotta anche l'espressione delle catene $\alpha 3$ e $\alpha 4$ del collagene di tipo IV della membrana basale glomerulare.⁵⁷ Tuttavia, i geni *NPHS2*, *COL4A3* e *COL4A4* risultano normalmente espressi nei podociti di pazienti con sindrome nail-patella.⁵⁸

3.2 Componenti della *slit diaphragm*

La *slit diaphragm* rappresenta la struttura più importante della barriera di filtrazione glomerulare; è, quindi, facile immaginare che mutazioni nei geni codificanti per importanti proteine del complesso della SD, quali *NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP* e *TRPC6*, siano responsabili di quadri di sindrome nefrosica.

3.2.1 *NPHS1*

Il gene *NPHS1*, mappa in 19q13.1, contiene 29 esoni e codifica per la nefrina, proteina podocitaria di 185 kDa indispensabile per la formazione della *slit diaphragm*, di cui rappresenta la proteina centrale, e per funzioni di *signaling* intracellulare. Il gene *NPHS1* è stato inizialmente identificato come gene malattia della sindrome nefrosica congenita di tipo Finnico.¹⁴

Questa malattia, a trasmissione autosomica recessiva, è particolarmente frequente in Finlandia, dove ha un'incidenza di 1 su 8200 nati. Il quadro clinico è caratterizzato da proteinuria massiva, anche in utero, e da sindrome nefrosica che esordisce subito dopo la nascita; caratteristico è il riscontro istologico di tubuli prossimali dilatati. Nella popolazione finnica questa malattia è legata a due mutazioni principali, che determinano la formazione di proteine tronche: la mutazione *Fin-maior* (p.L41fxX91) e la mutazione *Fin-minor* (p.R1109X), presenti rispettivamente nel 78% e nel 16% dei casi. In altri gruppi etnici le mutazioni in *NPHS1* che causano sindrome nefrosica congenita di tipo finnico (CNF) sono diverse. La CNF non risponde al trattamento con corticosteroidi o ciclofosfamide; se non si effettua il trapianto renale, questa malattia risulta mortale. Esiste anche il rischio di recidiva post-trapianto, che avviene nel 25% dei casi; in metà dei casi di recidiva sono stati individuati anticorpi anti-nefrina.⁵⁹

Recentemente lo spettro di patologie, associate a mutazioni in *NPHS1*, si è ampliato: infatti mutazioni in questo gene sono state trovate anche in casi di sindrome nefrosica steroideo-resistente ad esordio infantile o giovanile.⁶⁰ La presenza di almeno una mutazione 'lieve' può spiegare l'esordio più tardivo o il decorso meno grave; possono essere considerate 'lievi' mutazioni *missense* che non alterano troppo il traffico della proteina nella cellula, mutazioni ai siti di *splicing*, che in parte permettono uno *splicing* funzionante o mutazioni troncanti, che eliminano solo l'ultimissima porzione al C-terminale, in quanto la funzione della nefrina è parzialmente conservata.

La variabilità fenotipica può essere spiegata con la presenza di geni modificatori o con l'effetto di fattori ambientali; ad esempio, infatti, le stesse due mutazioni in *NPHS1* (p.R827X e p.R976S) sono state trovate in un adulto con GSFS diagnosticata all'età di 27 anni e in un bambino con sindrome nefrosica ad esordio infantile.⁶¹ Ad oggi si conoscono più di 130 mutazioni diverse.

Oltre al quadro renale, pazienti con mutazioni in *NPHS1* possono mostrare anche segni neurologici, quali ipotonia muscolare, discinesia, atrofia cerebrale moderata e sordità.⁶²

3.2.2 *NPHS2*

Il gene *NPHS2* mappa in 1q25-q31 e codifica per la podocina, proteina ad esclusiva espressione podocitaria. Inizialmente mutazioni in questo gene sono state descritte in forme familiari di sindrome nefrosica steroideo-resistente autosomica recessiva, caratterizzata da esordio della proteinuria nella prima infanzia, resistenza al trattamento immunosoppressivo e rapida progressione verso la GSFS.¹⁶ Mutazioni in questo gene rappresentano circa il 40% delle forme familiari ed il 10% delle forme sporadiche di sindrome nefrosica steroideo-resistente.³⁹ *NPHS2* è stato inoltre trovato mutato in forme di sindrome nefrosica congenita di tipo Finnico ed in forme ad esordio adulto. La podocina agisce come proteina *scaffold*: recluta ed interagisce, attraverso il suo C-terminale, con nefrina e CD2AP per la formazione della SD.

Ad oggi più di cento mutazioni diverse sono state descritte; pazienti con mutazioni nonsense, *frameshift* o omozigoti per la mutazione p.R138Q presentano la sintomatologia più precocemente. La proteina mutante p.R138Q rappresenta il 30% di tutte le mutazioni in *NPHS2*; determina un fenotipo simile a quello di mutazioni nonsense e *frameshift*, in quanto la podocina è trattenuta nel reticolo endoplasmatico, con completa perdita di funzione.⁶³

La variante p.R229Q, in stato eterozigote, ha una frequenza del 3-4% nella popolazione europea: se associata ad una mutazione patogenetica in *NPHS2*, determina un quadro di sindrome nefrosica ad esordio tardivo.⁶⁴ Studi in vitro hanno mostrato che la proteina variante p.R229Q si lega meno alla nefrina, dando così una spiegazione al suo ruolo patogenetico.⁶⁵ Inoltre, un ampio studio su più di 1500 individui, selezionati nella popolazione generale, ha dimostrato l'associazione della variante eterozigote p.R229Q, con la presenza di microalbuminuria.⁶⁶

3.2.3 CD2AP

CD2AP mappa in 6p12.3 e codifica per la proteina CD2-associata (CD2AP), una molecola *adapter*, inizialmente identificata come ligando del CD2 dei linfociti T. E' una proteina citoplasmatica di 80kDa e contiene 3 domini SH3 (Src homology 3) all' N-terminale. Questo gene è stato poi associato con il rene tramite esperimenti su topi *knock-out* per *CD2AP*, i quali presentano sindrome nefrosica nelle prime settimane di vita.¹⁸ La proteina CD2AP è, infatti, espressa anche nel podocita, a livello della SD, dove connette la nefrina con il citoscheletro di actina. La somiglianza delle lesioni renali nei topi *knock-out* per *CD2AP* con la GSFS ha portato all'analisi del gene in pazienti con GSFS: una mutazione eterozigote in un sito di *splicing* è stata identificata in due pazienti;⁶⁷ successivamente una mutazione omozigote è stata trovata in un bambino di 10 mesi con GSFS, i cui genitori erano eterozigoti per la mutazione e non presentavano sindrome nefrosica.⁶⁸ Quest'ultima mutazione produceva un codone di stop al C-terminale, eliminando solo il 4% della proteina; ciò può spiegare la mancanza di fenotipo patologico nei genitori eterozigoti.

3.2.4 TRPC6

Il gene *TRPC6*, localizzato in 11q21-q22, è stato recentemente associato alla GSFS, perchè trovato mutato in un'ampia famiglia neozelandese affetta da GSFS.²³ Codifica per la proteina TRPC6, un canale del calcio localizzato nella membrana cellulare del podocita in vicinanza della SD, dove interagisce con nefrina e podocina.²² Dal punto di vista strutturale presenta sei domini transmembrana, con N- e C-terminale a livello citosolico; all' N-terminale vi sono quattro ripetizioni di ankirina ed un dominio coiled-coil. Funzionalmente è coinvolto nella regolazione della concentrazione intracellulare di calcio in risposta all'attivazione da parte delle vie di trasduzione attivate dalla fosfolipasi C (PLC).⁶⁹

In particolare, mutazioni in *TRPC6* sono state associate a GSFS con esordio in età adulta e trasmissione autosomica dominante.⁷⁰ Si tratta per lo più di mutazioni *gain-of-function* che aumentano l'ingresso intracellulare di calcio e colpiscono soprattutto i domini intracellulari N- e C-terminale.

3.3 Componenti del citoscheletro podocitario

A livello dei processi pedicellari, il citoscheletro è costituito essenzialmente da filamenti di actina, che formano un complesso multiproteico dinamico, impegnato nel mantenimento della struttura della BFG. In caso di danno podocitario uno dei primi segni è il fenomeno dell'*effacement*, ovvero l'attiva riorganizzazione del citoscheletro di actina che porta a retrazione dei processi pedicellari.

Alcuni geni legati al citoscheletro podocitario sono stati trovati mutati in pazienti con sindrome nefrosica e GSFS: in particolare i geni *ACTN4*, *INF2* e *MYH9*.

3.3.1 *ACTN4*

Il gene *ACTN4*, localizzato in 19q13, è stato recentemente trovato mutato in tre famiglie con una forma autosomica dominante di GSFS, il cui quadro clinico era caratterizzato da una proteinuria progressivamente ingravescente esordita durante l'adolescenza, dallo sviluppo di GSFS e dallo sviluppo di insufficienza renale nelle decadi successive.⁷¹ Codifica per la proteina α -actinina-4, una proteina *crosslinker* per i filamenti di actina, principalmente localizzata a livello dei processi pedicellari. Nonostante questa proteina sia espressa in diversi tessuti, il fenotipo associato a mutazioni in *ACTN4* coinvolge soltanto il rene. In vitro l' α -actinina-4 mutante mostra un legame più stretto con il filamento di actina:⁷¹ sulla base di questa osservazione, è stato proposto, che mutazioni dominanti in *ACTN4*, interferiscano con la normale funzione del citoscheletro dei pedicelli. Mutazioni in *ACTN4* sono state trovate anche in casi sporadici di GSFS: in particolare, la frequenza di mutazioni in *ACTN4* è stata stimata al 4% per le forme familiari di GSFS ed all'1% per le forme sporadiche.⁷²

3.3.2 *MYH9*

Il gene *MYH9* è localizzato in 22q12.3, e contiene 40 esoni che codificano per la catena pesante IIA della miosina non muscolare. Nei podociti il complesso actina-miosina è legato a numerosi ed importanti complessi proteici, quali la SD, la podocalicina sul versante apicale, integrine e destruglicani sul versante basale della membrana plasmatica. La proteina contiene un sito di legame per l'actina, un sito di legame per l'ATP ed un dominio *coiled-coil*.⁷³

Mutazioni *missense* o *nonsense* in questo gene sono causa di un gruppo di patologie caratterizzate da macrotrombocitemia, sordità neurosensoriale e glomerulopatia; tra queste la sindrome di May-Hegglin, la sindrome di Epstein, la

sindrome di Fetchner e la sindrome di Sebastian.⁷⁴ Le anomalie renali, presenti nella sindrome di Fechtner e di Epstein, includono ematuria microscopica con o senza proteinuria e possibile evoluzione in insufficienza renale terminale.

Recentemente alcune varianti genetiche in *MYH9* sono state associate ad un maggior rischio di sviluppare GSFS e insufficienza renale terminale, soprattutto in soggetti Afro-Americani: l'aplotipo E1, che conferisce il rischio di GSFS, è infatti presente in più del 60% dei soggetti afroamericani e solo nel 4% degli americani di origine europea.⁷⁵ Tuttavia, ad oggi, il sequenziamento dell'intero gene in soggetti con GSFS e nefropatia HIV- correlata non ha identificato alcuna mutazione che possa essere responsabile del quadro clinico.⁷⁴

La ricerca iniziale ha concentrato l'attenzione sul gene *MYH9* come candidato più probabile, tuttavia, successivamente studi genome-wide hanno consentito a due gruppi di ricerca indipendenti, di scoprire che in realtà mutazioni più fortemente associate a GSFS, cadevano all'interno del gene *APOL1*, che occupava lo stesso locus 22q. Infatti, la selezione evolutiva di un patogeno infettivo in Africa occidentale ha favorito la diffusione di varianti in *APOL1* che proteggono contro una forma letale di malattia del sonno africana, ma sono altamente associate a un aumentato rischio di malattie renali.⁷⁶

3.3.3 *INF2*

Recentemente il gene *INF2* è stato aggiunto alla lista dei geni malattia per forme di sindrome nefrosica steroideo-resistente e GSFS a trasmissione autosomica dominante.⁷⁷ Mappa in 14q32 e codifica per *INF2* (*Inverted formin 2*), proteina che appartiene alla famiglia della formina, una proteina che promuove la nucleazione all'actina. La maggior parte delle mutazioni identificate erano a livello dell'esone 4, una regione che codifica per la regione regolatoria all' N-terminale della proteina. La proteinuria in questi pazienti compariva durante l'adolescenza o l'età adulta; mutazioni in questo gene, così come nel caso di mutazioni in *TRPC6* e *ACTN4*, mostrano una penetranza età-correlata.

3.4 Proteine citoplasmatiche e mitocondriali

Mutazioni nei geni *PLCE1* e *SCARB2*, che codificano, rispettivamente, per la proteina citoplasmatica fosfolipasi C $\epsilon 1$ (PLC $\epsilon 1$) e per la proteina lisosomiale LIMP-2, sono state associate a forme non sindromiche e sindromiche di sindrome

nefrosica.

Anche mutazioni in due geni, *COQ2* e *PDSS2*, che codificano, rispettivamente, per le proteine mitocondriali polipreniltransferasi e decaprenil-difosfato-sintetasi, sono state associate a proteinuria e GSFS. Anche alterazioni nel DNA mitocondriale che codifica per il tRNA per l'amminoacido leucina sono state associate a forme di GSFS.

3.4.1 *PLCE1*

Il gene *PLCE1* mappa in 10q23 e codifica per la fosfolipasi C epsilon 1. Mutazioni in questo gene sono state recentemente riportate come causa di sindrome nefrosica ad esordio precoce con un quadro istologico prevalente di sclerosi mesangiale diffusa; alcuni casi presentavano una GSFS.⁷⁸ Uno studio successivo ha dimostrato che le mutazioni in *PLCE1* rappresentano la principale causa di sclerosi mesangiale (MS) diffusa, con una percentuale di mutazioni identificate (28%) maggiore di quella per mutazioni in *WT1* e *LAMB2*.⁷⁹ Gli individui riportati in letteratura presentano un quadro classico di MS e generalmente mutazioni in omozigosi, sebbene siano state riportate anche mutazioni troncanti in eterozigosi.⁷⁸ Successivamente, l'analisi molecolare del gene *PLCE1* in 139 pazienti con sindrome nefrosica steroido-resistente, negativi per mutazioni in *NPHS2* e *WT1*, e nei loro familiari, ha sorprendentemente identificato tre individui completamente asintomatici portatori della stessa mutazione omozigote presente nei familiari affetti:⁸⁰ questa osservazione fa pensare al ruolo di geni modificatori o di fattori ambientali nella determinazione della variabilità fenotipica osservabile nei soggetti con mutazioni di *PLCE1*.

La fosfolipasi C epsilon 1 appartiene alla famiglia delle fosfolipasi C, le quali catalizzano l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana per generare secondi messaggeri, quali l'inositolo 1,4,5-trifosfato e il diacilglicerolo; ha quindi un ruolo importante in vie di *signaling* intracellulare. Nel rene PLCε1 è ampiamente espressa a livello del corpo e dei pedicelli podocitari, soprattutto durante lo sviluppo glomerulare.

3.4.2 *SCARB2*

Il gene *SCARB2*, localizzato in 4q13-q12, codifica per la proteina lisosomiale LIMP-2 (*Lysosomal integral membrane protein type 2*) che agisce come recettore per la β-glucocerebrosidasi, enzima che, se assente, causa la malattia di Gaucher. Una mutazione omozigote in questo gene è stata trovata in due fratelli figli di

genitori consanguinei, il cui quadro clinico era caratterizzato da epilessia mioclonica progressiva senza ritardo mentale e sindrome nefrosica con un marcato accumulo di C1q a livello dei capillari glomerulari;⁸¹ nel complesso questa sindrome è definita AMRF (*Action myoclonus-renal failure*). In uno studio il gene *SCARB2* è stato analizzato anche in casi non sindromici di GSFS, malattia a lesioni minime, senza il riscontro di alcuna mutazione.⁸²

3.4.3 *COQ2*, *PDSS2* e *MTTL1*

Il gene *COQ2* mappa in 4q21-q22 e codifica per l'enzima para-idrossibenzoato-poliprenil-transferasi del *pathway* di sintesi del coenzima Q10. Mutazioni in questo gene sono state trovate in pazienti con sindrome nefrosica steroido-resistente;⁸³ solo alcuni presentavano segni neurologici, propri del deficit del coenzima Q10. All'esame ultrastrutturale le cellule glomerulari mostravano un aumentato numero di mitocondri dismorfici.

Il gene *PDSS2*, localizzato in 6q21, codifica per una subunità del decaprenil difosfato sintetasi, il primo enzima nel *pathway* di biosintesi del coenzima Q10. Mutazioni in questo gene sono state recentemente descritte in un paziente con sindrome di Leigh, caratterizzata da deficit di Q10 e sindrome nefrosica.⁸⁴

Entrambi questi geni interferiscono quindi con la biosintesi del coenzima Q10 e determinano una sua carenza; un approccio terapeutico, per controllare la sintomatologia renale e neurologica prodotta dal deficit di coenzima Q10, può essere dunque la supplementazione dello stesso.⁸⁵

Mutazioni nel gene mitocondriale che codifica per il tRNA per l'amminoacido leucina sono prevalentemente associate alla sindrome MELAS, caratterizzata da miopatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica ed episodi *stroke-like*. In alcuni casi mutazioni in questo gene sono state descritte anche in casi di GSFS.⁸⁶

3.5 Proteine della membrana basale glomerulare

La membrana basale glomerulare è assai ricca di laminina-521, composta dalle catene $\alpha 5$, $\beta 2$ e $\gamma 1$. Mutazioni nel gene che codifica per la catena $\beta 2$, ovvero il gene *LAMB2*, sono state primariamente trovate in pazienti con sindrome nefrosica

congenita, con quadro istologico di sclerosi mesangiale diffusa, in associazione a malformazioni oculari, tra le quali la più caratteristica è la microcoria, definita come sindrome di Pierson.⁴ I soggetti affetti possono presentare anche ritardo psicomotorio. La laminina $\beta 2$ è specificamente espressa in quei distretti, quali il rene, l'occhio e il sistema neuromuscolare, in cui la sindrome si esprime fenotipicamente.

Il gene *LAMB2* mappa in 3p21; mutazioni in questo gene risultano in perdita dell'espressione della laminina $\beta 2$. La maggior parte delle mutazioni sono mutazioni *nonsense* che determinano completa perdita di funzione della proteina; esiste una correlazione genotipo-fenotipo in quanto mutazioni *missense* o piccole delezioni in *frame* determinano un'età di esordio della nefrosi più tardiva e l'assenza di manifestazioni neurologiche.⁸⁷

Tabella 3.1 Geni malattia per sindrome nefrosica.³⁹

Gene	Locus	Proteina	Funzione/Localizzazione
<i>NPHS1</i>	19q13.1	nefrina	Principale componente SD
<i>NPHS2</i>	1q25-q31	podocina	Proteina <i>scaffold</i> della SD
<i>CD2AP</i>	6p12.3	CD2 proteina associata	Ancora la SD al citoscheletro di actina
<i>TRPC6</i>	11q21-q22	TRPC6	Canale del calcio
<i>ACTN4</i>	19q13	α -actinina-4	Proteina <i>cross-linker</i> per microfilamenti di actina
<i>MYH9</i>	22q12.3	NMMHC-IIA	Miosina cellulare
<i>INF2</i>	14q32	Inverted formin 2	Promuove la nucleazione dell'actina
<i>WT1</i>	11p13	Wilms' tumor 1	Fattore di trascrizione podocitario
<i>LMX1B</i>	9q34.1	Lmx1b	Fattore di trascrizione podocitario
<i>LAMB2</i>	3p21	Laminin- β 2	Catena β della laminina-521 della MBG
<i>PLCE1</i>	10q23	Fosfolipasi C ϵ 1	Proteina coinvolta in signaling intracellulare
<i>SCARB2</i>	4q13-q21	LIMP II	Proteina lisosomiale
<i>COQ2</i>	4q21-q22	Polipreniltransferasi	Proteina mitocondriale
<i>MTTL1</i>	mtDNA	tRNA-LEU	TRNA mitocondriale per leucina
<i>PDSS2</i>	6q21	Decaprenil-difosfato-sintetasi	Proteina mitocondriale

3.6 *PTPRO*, *MYOIE* e *ITGA3*

Recentemente sono stati associati alla SNSR altri tre nuovi geni: *PTPRO*⁸⁸, *MYOIE*^{89,90} e *ITGA3*.^{91,92}

Il gene *PTPRO* mappa in 12p13-p12 e codifica per una tirosina fosfatasi espressa sulla membrana apicale dei processi pedicellari dei podociti. La tirosinofosforilazione delle proteine della *slit diaphragm* è importante per la permeabilità glomerulare e per il rimodellamento del citoscheletro di actina. L'assenza di espressione di *PTPRO* è già stata osservata in numerose nefropatie associate a proteinuria mentre le mutazioni identificate recentemente in uno studio effettuato in 17 famiglie con SNSR sono mutazioni ai siti di *splicing* che determinano lo *skipping* di alcuni esoni nella trascrizione da DNA ad RNA.⁸⁸

Il gene *MYOIE* mappa in 15q21-q22 e codifica per la miosina 1E, una miosina non muscolare di classe I, molecola importante per la struttura del podocita. Topi *knock-out* per *MYOIE*, così come i pazienti in cui la mutazione omozigote è stata individuata, presentano proteinuria, danno podocitario ed insufficienza renale. La scoperta di questo nuovo gene mette ancora una volta in luce il ruolo centrale del citoscheletro podocitario nel mantenimento di struttura e funzione della barriera di filtrazione glomerulare.^{89,90}

Il gene *ITGA3* mappa in 17q21.33 e codifica per la subunità alfa 3 transmembrana del recettore dell'integrina essenziale nel mantenimento della connessione tra il citoscheletro e la matrice extracellulare, in particolare a livello podocitario interagisce con la tetraspanina CD151, per sostenere la barriera di filtrazione. Recentemente è stato descritto un fenotipo complesso, in neonati con mutazione in omozigosi a carico di questo gene^{91,92}, caratterizzato da distruzione della membrana basale e compromissione della funzione di barriera, a livello renale, polmonare e della cute. Prevalentemente i pazienti presentavano una grave SN congenita e fibrosi polmonare.

Capitolo 4

Terapia della sindrome nefrosica steroido-resistente

Il trattamento di una sindrome nefrosica di nuova insorgenza consiste in 4 settimane di terapia con prednisone alla dose di 60mg/m²/die, con successivo *tapering* della dose fino alla sospensione del trattamento. Questa terapia non ha successo in caso di SNSR, la quale richiede un approccio farmacologico complesso e, purtroppo, non sempre efficace.

La scelta del trattamento farmacologico è ancora più difficile per quei casi di SNSR su base genetica, nel caso siano presenti mutazioni in geni importanti per l'integrità strutturale e funzionale della barriera di filtrazione glomerulare. Un recente studio tedesco, infatti, compiuto su 91 bambini con SNSR, ha dimostrato come in presenza di mutazioni nei geni podocitari (nello studio sono stati analizzati i geni *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *LAMB2* e *TRPC6*) la risposta al trattamento con ciclosporina sia molto più bassa e la prognosi peggiore, rispetto alle forme di SNSR in cui sia esclusa una base genetica.⁹³ Questo studio ribadisce quindi l'importanza di un accurato *screening* genetico prima d'intraprendere terapie potenzialmente non efficaci e certamente non prive di effetti collaterali.

4.1 Terapia farmacologica

I farmaci a disposizione consistono in: corticosteroidi, inibitori della calcineurina (ciclosporina, tacrolimus), agenti alchilanti (ciclofosfamide), micofenolato mofetile, rituximab. A questi si associano ACE inibitori e antagonisti del recettore AT1 dell'angiotensina II.⁹⁴

Negli anni '90 Mendoza et al.⁹⁵ proposero un regime di tre boli intravenosi di

metilprednisolone alla dose di 30mg/kg in associazione a ciclofosfamide orale e prednisone orale a giorni alterni; questo protocollo, chiamato 'Protocollo Mendoza' portò a remissione 12 dei 23 bambini trattati ed è stato da allora usato in numerosi centri.

Oggi la maggior parte dei nefrologi pediatrici utilizza inibitori della calcineurina, in particolare la ciclosporina. La ciclosporina A è un polipeptide ciclico di 11 aminoacidi, ed ha un'azione immunosoppressiva sui linfociti T: inibisce la trasduzione del segnale stimolata dall'antigene, bloccando l'espressione di molte linfocine. La ciclosporina si lega alla ciclofilina, una proteina recettoriale citoplasmatica presente nelle cellule bersaglio; si forma quindi il complesso ciclosporina-ciclofilina, il quale lega la fosfatasi calcineurina, inibendola, ed impedendo quindi la defosforilazione di NFAT (fattore nucleare delle cellule T attivate). NFAT, una volta fosforilato, trasloca nel nucleo e funziona da fattore di trascrizione per l'interleuchina 2 ed altre citochine; la mancata defosforilazione di NFAT, per azione della ciclosporina, impedisce quindi la formazione di citochine. Questo meccanismo d'azione può spiegare l'effetto della ciclosporina in quelle forme di sindrome nefrosica di origine immunologica. In un recente studio, tre pazienti con SNSR legata a mutazioni in *WT1* hanno presentato una riduzione della proteinuria dopo trattamento con ciclosporina in associazione a corticosteroidi, ACE inibitori ed antagonisti del recettore AT1 dell'angiotensina II.⁹⁶ Pazienti con mutazioni in *NPHS2* sono generalmente resistenti anche al trattamento con ciclosporina,⁹³ ma in alcuni casi sono state descritte delle remissioni parziali del quadro clinico.⁹⁷

L'effetto della ciclosporina nelle forme genetiche di sindrome nefrosica è spiegato attraverso meccanismi non-immunologici e principalmente attraverso la stabilizzazione del citoscheletro podocitario,⁹⁸ la cui integrità è necessaria per il corretto funzionamento del filtro renale. La ciclosporina infatti blocca, attraverso l'inibizione della calcineurina, la defosforilazione della sinaptopodina, una proteina importante per l'organizzazione del citoscheletro di actina. Quando fosforilata la sinaptopodina è protetta dalla proteolisi catepsina L-mediata; ciò suggerisce che l'effetto antiproteinurico della ciclosporina A sia il risultato dell'effetto protettivo della stessa verso la sinaptopodina e del suo ruolo di stabilizzatore del citoscheletro.⁹⁸ In casi di GSFS dovuta a mutazioni *gain-of-function* nel gene *TRPC6* si è visto che le proteine mutanti attivano, nei podociti, il fattore di trascrizione NFAT;⁹⁹ si può quindi ipotizzare l'efficacia della ciclosporina anche nei casi di sindrome nefrosica dovuti a mutazioni in *TRPC6*.

Nonostante ciò, la risposta al farmaco nei pazienti con forme genetiche è significativamente peggiore rispetto a quella in pazienti con forme non genetiche.⁹³

Il tacrolimus, un altro inibitore della calcineurina, può servire come alternativa alla ciclosporina. Uno studio recente mostra come, in un gruppo di bambini con SNSR dovuta a differenti quadri istopatologici, la terapia con tacrolimus sia in grado di indurre una remissione parziale o completa nell'81% dei casi, anche se la risposta è inferiore nei casi di GSFS.¹⁰⁰

Il micofenolato mofetile è un profarmaco che è rapidamente idrolizzato a farmaco attivo, l'acido micofenolico (MPA), un inibitore selettivo, non competitivo e reversibile, dell'inosina monofosfato deidrogenasi che, attraverso il controllo di una via di segnale intracellulare, inibisce la proliferazione di linfociti B e T. Il meccanismo d'azione nel trattamento delle glomerulopatie non è ancora del tutto noto.¹⁰¹ Riguardo all'efficacia del farmaco nelle SNSR sono oggi disponibili solo pochi dati, dai quali sembra che il micofenolato mofetile possa indurre una parziale o completa remissione nelle forme di GSFS resistenti agli steroidi e alla ciclosporina, senza indurre gli effetti nefrotossici di quest'ultima.¹⁰²

Il rituximab è un anticorpo monoclonale rivolto verso l'antigene CD20 dei linfociti B; fu inizialmente introdotto nel trattamento dei linfomi non- Hodgkin a cellule B e successivamente utilizzato in pazienti con patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso e glomerulonefriti da deposizione d'immunocomplessi. Ad oggi l'efficacia nel trattamento della SNSR risulta variabile a seconda dello studio considerato; è in corso uno studio randomizzato controllato in doppio cieco per valutare efficacia e sicurezza del farmaco in pazienti con SNSR ad esordio infantile.¹⁰³

L'efficacia del trattamento con agenti alchilanti, quali la ciclofosfamide, è controversa: sebbene alcuni studi mostrino un miglioramento in alcuni pazienti con SNSR, recentemente uno studio clinico randomizzato ha dimostrato la superiorità del trattamento con ciclosporina rispetto ad un regime terapeutico con ciclofosfamide somministrata per via endovenosa.¹⁰⁴

Recentemente una *review*, pubblicata su *Cochrane* (<http://www2.cochrane.org/reviews/>)¹⁰⁵, ha analizzato quattordici studi clinici randomizzati controllati per il trattamento della SNSR, con l'obiettivo di valutare vantaggi e svantaggi delle attuali terapie in uso: i risultati mostrano come la ciclosporina sia più efficace non solo del placebo, ma anche della ciclofosfamide per via endovenosa; che non esiste una sostanziale differenza tra ciclosporina e

tacrolimus e che l'utilizzo di ACE inibitori riduce in modo significativo la proteinuria.

Gli inibitori dell'enzima che converte l'angiotensina (ACE-inibitori) sono infatti sempre più utilizzati nel controllo della proteinuria e della pressione arteriosa nei bambini con SNSR; il loro effetto antiproteinurico e antipertensivo è stato dimostrato anche dall'*Escape Trial*, in cui 339 bambini con insufficienza renale cronica ed ipertensione sono stati trattati con Ramipril 6 mg/m²/die ottenendo una riduzione della proteinuria del 50% in media e riduzione della pressione arteriosa.¹⁰⁶ Nel ratto è stato, inoltre, dimostrato come l'inibizione farmacologica del sistema renina-angiotensina- aldosterone promuova la regressione della glomerulosclerosi, anche nelle fasi avanzate di malattia.¹⁰⁷

4.2 Rigenerazione glomerulare con cellule staminali

Come descritto precedentemente l'evento centrale nello sviluppo della GSFS è la perdita di podociti, i quali non sono in grado di replicarsi. Alcuni dati suggeriscono che durante la vita vi sia una costante perdita di podociti nelle urine, ma dal momento che la GSFS non rappresenta una fisiologica conseguenza dell'invecchiamento, si può ipotizzare che nell'organismo esistano cellule capaci di rigenerare i podociti.²⁹ Una possibile risorsa di cellule per la rigenerazione podocitaria è rappresentata dalle cellule staminali del midollo osseo, che, in uno studio su un modello murino di sindrome di Alport, si sono dimostrate capaci di migrare nel glomerulo;¹⁰⁸ tuttavia un altro studio ha mostrato che all'iniziale beneficio di queste cellule staminali nel danno glomerulare segue la trasformazione di queste cellule in adipociti e l'aggravamento della glomerulosclerosi.¹⁰⁹ Grazie ad alcuni studi recenti è stato scoperto che il maggior contributo alla rigenerazione glomerulare viene da un gruppo di cellule staminali/progenitori renali localizzato al polo urinario della capsula di Bowman.^{110,111} Queste cellule sono caratterizzate dall'espressione dei marcatori delle cellule staminali CD133 e CD24 e, nella capsula di Bowman, si trovano in una posizione di contiguità con le cellule tubulari prossimali da un lato e con i podociti dall'altro. Questa posizione strategica dei progenitori renali suggerisce la possibilità che queste cellule possano essere implicate sia nella rigenerazione tubulare che podocitaria. I progenitori renali CD133+ e CD24+ costituiscono una popolazione eterogenea e gerarchica di cellule più o meno differenziate disposte in una precisa sequenza all'interno della capsula di Bowman: generano nuovi podociti attraverso una progressiva migrazione e

differenziazione verso il polo vascolare della capsula di Bowman. Tuttavia, fattori intrinseci, come l'età o fattori estrinseci possono limitare la capacità rigenerativa del glomerulo in caso di danno, determinando una progressiva perdita podocitaria e lo sviluppo di glomerulosclerosi. Altro possibile limite di questo sistema 'renopoietico' è la possibilità che esso vada incontro a disregolazione con la comparsa di una proliferazione aberrante e lo sviluppo di lesioni iperplastiche, quali la variante di GSFS con collasso glomerulare (*collapsing glomerulopathy*).¹¹²

Capitolo 5

Scopo della tesi

L'ampia variabilità clinica e genetica, che caratterizza la SNSR, rende nella maggior parte dei casi la diagnosi ed il trattamento un compito complesso.

A ciò si aggiunge il fatto che la tecnologia di sequenziamento Sanger, così detta di prima generazione, nonostante rappresenti ancora il *gold-standard* ai fini dell'identificazione di alterazioni genetiche, risulta costosa e richiede tempi di esecuzione molto lunghi, dal momento che i geni candidati devono essere testati uno dopo l'altro.

Negli ultimi anni le tecnologie di sequenziamento *Next Generation Sequencing* (NGS), dette anche di terza generazione o massive parallele, si sono affiancate a quelle tradizionali, aprendo la possibilità di sequenziare contemporaneamente e in tempi molto brevi ingenti quantità di DNA.

Il nostro studio si è quindi proposto di testare questa tecnologia come una nuova, efficiente e conveniente strategia per definire il genotipo del paziente ed accelerare la diagnosi. A tale scopo, abbiamo disegnato un *sequencing array*, per analizzare tutti gli esoni e le sequenze fiancheggianti di 45 geni, causativi o potenzialmente implicati nella patogenesi della SNSR, che in seguito è stato utilizzato per il *Targeted resequencing* di una coorte di 15 pazienti pediatrici con diagnosi di SNSR sporadica e non sindromica.

Capitolo 6

Materiali e metodi

6.1 Soggetti studiati

In questo studio è stato analizzato il DNA di 15 pazienti affetti SNSR, seguiti dalla U.O. Nefrologia e Dialisi – Ospedale Pediatrico 'Anna Meyer' di Firenze dal 2000 ad oggi.

Tutte le analisi sono state compiute previo consenso informato e i campioni sono stati resi anonimi e contrassegnati ciascuno da un codice numerico progressivo.

Le informazioni cliniche sui pazienti sono state raccolte dalle cartelle cliniche della suddetta U.O (Tabella 6.1).

La remissione parziale (RP), remissione completa (RC) e assenza di remissione (AR) dalla SNSR sono state definite in base ai valori specificati nelle linee guida “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO).¹¹³

Paziente	Età all'esordio	Sesso	Pressione arteriosa (mmHg)	Proteinuria all'esodio (P/C)	Ematuria	Edema, oliguria	SCr (mg/dl)	ESRD (età ESRD)	Trapianto (età al trapianto)
Caso 1	6 a	M	137/84	8,6	μ	si	0,2	no	no
Caso 2	9 a	M	123/69	3,3	μ	si	0,2	no	no
Caso 3	4 a	F	115/65	43,5	μ	si	0,4	no	no
Caso 4	15 a	M	112/59	4,2	μ	si	0,4	no	no
Caso 5	3 a	M	90/60	5,8	μ	si	0,2	no	no
Caso 6	pochi mesi	F	140/92	58,9	μ	no	0,3	no	no
Caso 7	pochi mesi	M	108/76	5,8	μ	si	0,3	no	no
Caso 8	6 a, 4 m	M	110/80	7,6	μ	si	0,2	no	no
Caso 9	2 a, 6 m	F	135/78	9,3	μ, Ma	si	0,3	no	no
Caso 10	2 a, 8 m	M	109/74	28,4	μ	si, si	0,3	no	no
Caso 11	2 a, 6 m	F	105/65	15,5	μ	si	0,2	si (6 a, 4 m)	no
Caso 12	7 a, 7 m	F	120/60	14	μ	si	0,7	si (8 a, 9 m)	si (11 a, 11 m)
Caso 13	8 a	M	106/66	22,3	μ	si	0,4	no	no
Caso 14	3 a, 5 m	F	100/70	5,2	μ	si	0,5	si (5 a, 6 m)	si (5 a, 9 m)
Caso 15	5 a, 5 m	F	130/80	22,5	μ	si, si	0,7	si (16 a, 6 m)	si (19 a, 7 m)

Tabella 6.1 Schema riassuntivo delle caratteristiche cliniche dei probandi studiati. Nella tabella sono indicati, l'età all'esordio della SNSR (a, anni; m, mesi), il sesso (M, maschio; F, femmina), la pressione arteriosa, la proteinuria (P/C, rapporto proteinuria/creatininuria), la presenza di ematuria (μ, microematuria; Ma macroematuria), edema, oliguria, la creatinina sierica (SCr), l'età dell'eventuale esordio dell'insufficienza renale terminale (ESRD, *end stage renal disease*), e l'eventuale trapianto renale.

6.2 Estrazione del DNA

Il DNA dei campioni analizzati è stato estratto da linfociti ottenuti da prelievo di sangue venoso periferico; l'estrazione è stata eseguita tramite robot QIA Symphony®; successivamente, con Nanodrop™ 2000, sono state valutate concentrazione e purezza del DNA ottenuto.

6.3 Next Generation Sequencing

La *Next Generation Sequencing* (NGS) rappresenta una tecnologia di sequenziamento del DNA che si è andata sviluppando negli ultimi anni e che si è imposta come successiva rispetto al tradizionale metodo Sanger o metodo dei dideossiterminatori. Sono attualmente in commercio le piattaforme Roche 454, Illumina/Solexa, Applied Biosystem/SOLiD, Polonator G.007, Helicos Biosciences e Pacific Biosciences. Queste tecnologie condividono il concetto di 'parallelismo massivo', per cui numerosissime reazioni possono avvenire in contemporanea, generando una quantità di dati decisamente superiore alla tecnica tradizionale, in tempi ristretti. Questo risultato è ottenuto attraverso la miniaturizzazione e compartimentalizzazione delle reazioni biochimiche di amplificazione e sequenziamento. La potenza di questa tecnologia è presto chiara se si considera che sono stati necessari circa 3 miliardi di dollari e 13 anni per il completamento del sequenziamento di un intero genoma umano con metodo Sanger (Progetto Genoma Umano), mentre per sequenziare il genoma di James Watson con una piattaforma NGS sono stati necessari solo cinque mesi con un costo cento volte inferiore a quello che sarebbe stato necessario con la metodica di Sanger e l'impiego di sequenziatori a capillari.¹¹⁴

6.4 Targeted resequencing di 45 geni podocitari

Il *Targeted resequencing* è una delle numerose applicazioni del *Next Generation Sequencing* e consiste nella selezione, tramite ibridazione in fase solida o liquida, di specifiche regioni genomiche o geni o porzioni di geni, in modo da sequenziare soltanto le porzioni d'interesse. Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato la metodica *NimbleGen SeqCap EZ choice Library* per la selezione delle regioni d'interesse; mentre per il sequenziamento abbiamo utilizzato la piattaforma di nuova

generazione *GS FLX Titanium 454 Roche*.

6.4.1 Selezione dei geni e *array design*

Abbiamo selezionato 45 geni (Tabella 6.2) il cui ruolo patogenetico nella SNSR risultasse, sulla base di ricerche nella letteratura scientifica, certo (15 geni noti, causativi della SNSR) o altamente probabile, anche in relazione a studi su modelli murini (30 geni candidati).

Le sequenze target sono state estratte come coordinate genomiche dal database *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>), utilizzando come riferimento l'assemblaggio genomico hg19, per un totale di 103.216 *base pairs* .

Tabella 6.2 Geni selezionati per il *Targeted resequencing*. Nella tabella sono indicati: il gene, la proteina codificata, la posizione cromosomica, il numero di esoni e la refSeq.

Gene	Proteina	Locus	Esoni	RefSeq
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1 isoform D	chr11:32409325-32457087	10	NM_024426
<i>WTIP</i>	Wilms tumor 1 interacting protein	chr19:34972880-34992084	10	NM_001080436
<i>BASP1</i>	brain abundant, membrane attached signal protein	chr5:17217750-17276935	2	NM_006317
<i>PAX2</i>	paired box protein 2 isoform e	chr10:102505468-102589697	10	NM_003990
<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription factor 1, beta	chr9:129376748-129463311	8	NM_002316
<i>LDB1</i>	LIM domain binding 1 isoform 1	chr10:103867327-103880210	11	NM_001113407
<i>POD1/TCF21</i>	transcription factor 21	chr6:134210259-134213391	2	NM_003206
<i>MAFB</i>	transcription factor MAFB	chr20:39314519-39317876	1	NM_005461
<i>NPHS1</i>	nephrin precursor	chr19:36316274-36342739	29	NM_004646
<i>NPHS2</i>	podocin	chr1:179519677-179545084	8	NM_014625
<i>CD2AP</i>	CD2-associated protein	chr6:47445525-47594994	18	NM_012120
<i>FOXC2</i>	forkhead box C2	chr16:86600857-86602535	1	NM_005251
<i>CITED2</i>	Cbp/p300-interacting transactivator, with	chr6:139693397-139695785	2	NM_006079
<i>NF-Kb1</i>	nuclear factor kappa-B, subunit 1 isoform 1	chr4:103422486-103538458	24	NM_003998
<i>SMAD7</i>	SMAD family member 7	chr18:46446224-46477081	4	NM_005904
<i>TGFB</i>	transforming growth factor, beta 1 precursor	chr19:41836651-41859816	7	NM_000660
<i>ZHX1</i>	zinc fingers and homeoboxes 1	chr8:124260697-124286547	4	NM_007222
<i>ZHX2</i>	zinc fingers and homeoboxes 2	chr8:123793901-123986755	4	NM_014943

<i>ZHX3</i>	zinc fingers and homeoboxes 3	chr20:39807089-39928739	4	NM_015035
<i>RBPJ-K</i>	recombining binding protein suppressor of	chr4:26322448-26433278	11	NM_203284
<i>SYNPO</i>	synaptopodin isoform A	chr5:150020220-150038792	3	NM_007286
<i>ACTN4</i>	actinin, alpha 4	chr19:39138327-39221170	21	NM_004924
<i>INF2</i>	inverted formin 2 isoform 1	chr14:105155943-105185947	23	NM_022489
<i>PALLD</i>	palladin isoform 2	chr4:169418217-169849607	21	NM_016081
<i>ITGA3</i>	integrin alpha 3 isoform b precursor	chr17:48133340-48167848	26	NM_002204
<i>ITG1BP1</i>	integrin cytoplasmic domain-associated protein 1	chr2:9545823-9563643	7	NM_004763
<i>CTSL1</i>	cathepsin L1 preproprotein	chr9:90340974-90346382	8	NM_145918
<i>TRPC6</i>	transient receptor potential cation channel,	chr11:101322296-101454659	13	NM_004621
<i>KIRREL</i>	kin of IRRE like precursor	chr1:157963063-158065842	15	NM_018240
<i>KIRREL3</i>	kin of IRRE like 3 isoform	chr11:126293397-126870766	16	NM_032531
<i>LAMB2</i>	laminin, beta 2 precursor	chr3:49158548-49170599	33	NM_002292
<i>PODXL</i>	podocalyxin-like isoform 2 precursor	chr7:131185023-131241376	8	NM_005397
<i>PLCE1</i>	phospholipase C, epsilon 1 isoform 1	chr10:95753746-96088146	32	NM_016341
<i>SCARB2</i>	scavenger receptor class B, member 2	chr4:77079894-77135035	12	NM_005506
<i>CoQ10A</i>	coenzyme Q10 homolog A isoform a	chr12:56660642-56664748	5	NM_144576
<i>CoQ10B</i>	coenzyme Q10 homolog B precursor	chr2:198318231-198339851	5	NM_025147
<i>CoQ2</i>	para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase,	chr4:84184979-84205964	7	NM_015697
<i>PDSS2</i>	prenyl diphosphate synthase, subunit 2	chr6:107473761-107780779	8	NM_020381
<i>SMARCAL1</i>	SWI/SNF-related matrix-associated	chr2:217277473-217347772	18	NM_001127207
<i>CD151</i>	CD151 antigen	chr11:832952-838834	9	NM_004357
<i>LMNA</i>	lamin A/C isoform 1 precursor	chr1:156084461-156109878	12	NM_170707
<i>ZMPSTE24</i>	zinc metalloproteinase STE24	chr1:40723733-40759855	10	NM_005857
<i>MYH9</i>	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	chr22:36677324-36784063	42	NM_002473
<i>PTPRO</i>	receptor-type protein tyrosine phosphatase O	chr12:15475487-15750335	27	NM_030667
<i>MYO1E</i>	myosin IE	chr15:59428564-59665071	28	NM_004998
Total	45		576	

Per poter catturare tutte le porzioni codificanti di questi 45 geni, corrispondenti a 576 esoni, sono state utilizzate sonde oligonucleotidiche in fase liquida lunghe 54-99 nucleotidi (Roche NimbleGen, Inc.). Queste sono state disegnate per ottenere

un'ibridazione isoterma con segmenti di ssDNA. Le regioni altamente ripetute sono state escluse dalle sonde in modo da evitare una cattura non specifica delle regioni genomiche.

6.4.2 Preparazione *library* di DNA ed amplificazione pre-capture

Per ogni campione di DNA abbiamo costruito una libreria di frammenti, seguendo il protocollo *Rapid Library Preparation Method Manual* ottimizzato per il sequenziatore GS FLX Titanium 454 Roche. Per garantire un buon sequenziamento, il DNA deve possedere i seguenti requisiti: dsDNA; rapporto $A_{260/280}$ maggiore o uguale a 1,8; concentrazione maggiore di 5ng/ μ L; dimensione frammenti maggiore di 1,5 kb.

La costruzione della libreria prevede cinque passaggi:

1. Frammentazione del DNA (500ng) tramite nebulizzazione con azoto ad alta pressione (40psi per 1 minuto), così da ottenere frammenti di DNA di 400-1000 bp.
2. Dal momento che la nebulizzazione del DNA produce alcuni frammenti con estremità rovinata, queste vengono riparate utilizzando una specifica *End Repair mix*.
3. Ad ogni campione viene aggiunto 1 μ L di *Rapid Library MID Adaptors* che si legano alle due estremità di ogni frammento di DNA. Ogni adattatore consiste in una coppia di oligonucleotidi a doppio filamento: un adattatore A ed un adattatore B con sequenze complementari a quelle dei primers di amplificazione e sequenziamento (Fig. 6.1). Inoltre ogni adattatore, al 3', contiene una *key region*, ovvero una regione a 4 basi non palindromica, indispensabile per la verifica della qualità della reazione di sequenziamento, seguita da una regione di 11 nucleotidi, disegnata in modo che 12 librerie, ovvero 12 diversi DNA, possano essere sequenziati insieme. Ad ogni campione abbiamo quindi associato un *RL MID adaptor* diverso.
4. I frammenti sono stati selezionati per lunghezza attraverso il sistema di AMPure beads, per rimuovere piccole specie molecolari e artefatti quali i dimeri di adattatori (Fig. 6.2).
5. La libreria così preparata è poi valutata per quantità attraverso un'analisi fluorimetrica con TBS 380 Fluorometer® (Turner Biosystem) e per qualità e dimensione dei frammenti con Agilent 2100 BioAnalyzer®.

La quantità totale di una libreria dovrebbe essere di almeno $7,3 \cdot 10^9$ molecole, che corrisponde ad una concentrazione di almeno $1,46 \cdot 10^8$ mol/ μ L; sono caratteristiche di qualità una lunghezza media dei frammenti tra 600 e 900 bp e la presenza di non

più del 10% di frammenti al di sotto dei 350 bp (Fig. 6.3).

Superato il controllo di qualità ogni libreria di DNA è amplificata tramite una *Ligation Mediated-PCR* (LM-PCR) (secondo il protocollo *NimbleGen SeqCap EZ Library LR User's Guide Version 2.0*).

La libreria amplificata *pre-capture* è poi purificata con *Qiaquick PCR Purification Kit column*. L'amplificato ottenuto, valutato con Nanodrop™2000, deve essere in quantità maggiore di 2,5 µg ed avere frammenti che, analizzati con BioAnalyzer®, risultano di dimensioni comprese tra 350 e 1000bp, con una media di 600-900bp.

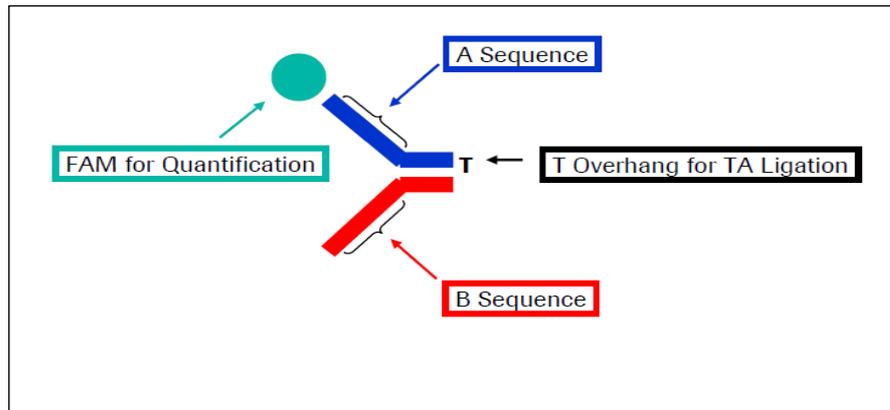


Fig. 6.1 Schema struttura di un adaptor: alla sequenza A è attaccato un fluoroforo FAM per la successiva valutazione della libreria con l'indagine fluorimetrica.

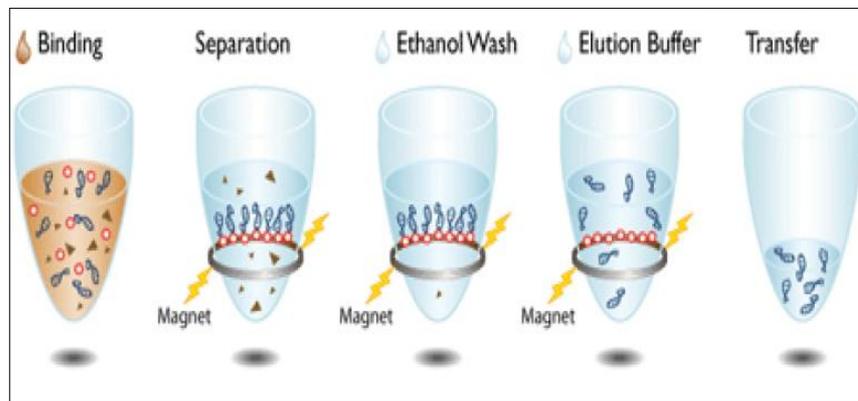


Fig. 6.2. Rimozione piccoli frammenti con sistema AMPure beads.

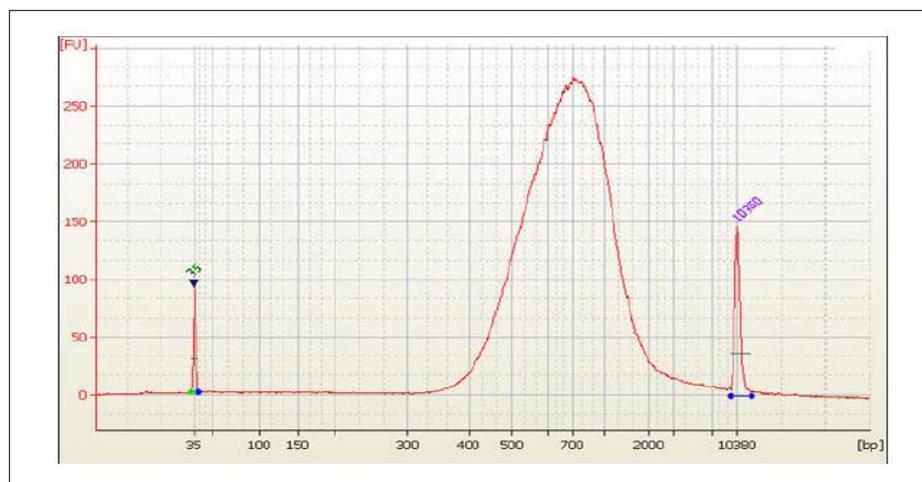


Fig. 6.3 Esempio della corsa di una libreria di DNA su un Bioanalyzer HighSensitivity Chip.

6.4.3 *Sequence capture* del DNA genomico: ibridazione in fase liquida con tecnica *NimbleGen*

E' questa la fase di cattura delle specifiche regioni di interesse del DNA genomico con l'utilizzo del *NimbleGen SeqCap EZ Library*.

Questa fase si compone di:

1. Ibridazione del ssDNA genomico con le sonde oligonucleotidiche posizionate in fase liquida. Il sistema di ibridazione deve essere mantenuto a 47° C per almeno 64 ore e non più di 72.
2. Lavaggio dei campioni ibridati con le sonde specifiche ed eluizione del DNA catturato.
3. LM-PCR dei campioni catturati.

La libreria *post-capture* così amplificata è poi purificata con *Qiaquick PCR Purification Kit column*. La quantità dell'amplificato, valutata con Nanodrop™ 2000, deve essere maggiore di 1,0 µg. Inoltre, l'analisi con Agilent 2100 BioAnalyzer® deve indicare che la maggior parte della libreria ha frammenti di dimensioni comprese tra 500 e 1500 bp.

4. Per controllare la riuscita dell'ibridazione e della cattura delle regioni genomiche d'interesse si effettua una PCR quantitativa. La differenza tra il valore medio dei cicli soglia del campione pre-cattura post-LM-PCR ed il valore medio di cicli soglia del campione post-cattura post-LM-PCR deve essere circa 10.

6.4.4 emPCR: amplificazione clonale in emulsione

La tecnica di sequenziamento Roche 454 prevede l'amplificazione dei frammenti da sequenziare tramite una PCR in emulsione. La libreria di ssDNA è ibridata a biglie contenenti sequenze complementari agli oligonucleotidi adattatori. Le biglie sono poi compartimentalizzate in microvescicole di una soluzione oleosa emulsionata, all'interno delle quali avviene la reazione di PCR. Successivamente l'emulsione viene rotta e le biglie che contengono amplificato vengono arricchite. (Fig. 6.4)

Perchè si abbia la massima efficienza di amplificazione è necessario che una biglia leghi una sola molecola di ssDNA. La quantità di DNA che produrrà un rapporto 1biglia:1 frammento di DNA dipende da qualità e composizione del DNA e da altri fattori non ancora identificati. La condizione ottimale è una percentuale di biglie arricchite dopo emPCR pari all'8%. Per calcolare la quantità di DNA, che permette di raggiungere questo obiettivo, si effettua una titolazione preparando quattro diverse

reazioni per emPCR caratterizzate da un costante numero di *Capture Beads* di partenza ($2,4 \cdot 10^6$ *Capture beads* per tubo di emulsione) e da una quantità crescente di copie di DNA per biglia. Il protocollo seguito è quello descritto nel manuale *emPCR Method Manual – Lib-L SV*.

Al termine dell'emPCR le *Capture beads* vengono recuperate con rottura dell'emulsione e successivi lavaggi; di queste un'aliquota di $3 \mu\text{L}$ è analizzata al Casy® strumento che conta il numero di biglie. La percentuale di biglie recuperate deve essere maggiore del 65%.

Le biglie recuperate sono sottoposte ad arricchimento con biglie magnetiche, processo che permette di selezionare sole quelle biglie alle quali sono legati i frammenti di DNA amplificati. Ai frammenti di DNA amplificati vengono aggiunti dei primer di arricchimento contenenti una molecola di biotina, che successivamente si attacca alla molecola di streptavidina presente sulle biglie magnetiche. (Fig. 6.5). Con un concentratore magnetico vengono recuperate soltanto le *Capture Beads* con DNA amplificato, mentre le biglie 'vuote' sono eliminate con numerosi lavaggi (Fig. 6.6). Si preleva, quindi, un'aliquota di $3 \mu\text{L}$ da questa sospensione e la si analizza al Casy®.

La % di biglie arricchite è data dal rapporto tra il numero di biglie arricchite e il numero di biglie iniziali. Si completa così la fase di titolazione: in base alle % di arricchimento ottenute nei 4 diversi tubi della *Small Volume* (SV), si decide quale concentrazione molecola/biglia è ottimale, ovvero quale dà un arricchimento più vicino all'8%, e si utilizza quella concentrazione per calcolare la quantità di μL di libreria da utilizzare per la successiva emPCR in *Large Volume* (LV), le cui biglie arricchite saranno poi usate per il sequenziamento.

La metodica per la emPCR LV è la stessa, ma si lavora su volumi più grandi. Il protocollo seguito è quello descritto nel manuale *emPCR Method Manual – Lib-L LV* che prevede l'utilizzo di una quantità di biglie totali di 70 milioni. Si procede poi alla rottura dell'emulsione ed all'arricchimento secondo la procedura descritta per la SV. Al termine della procedura di arricchimento, dal momento che all'emPCR LV segue la reazione di sequenziamento, si aggiungono i *Sequencing Primer* ($50 \mu\text{L}$ per ogni tubo).

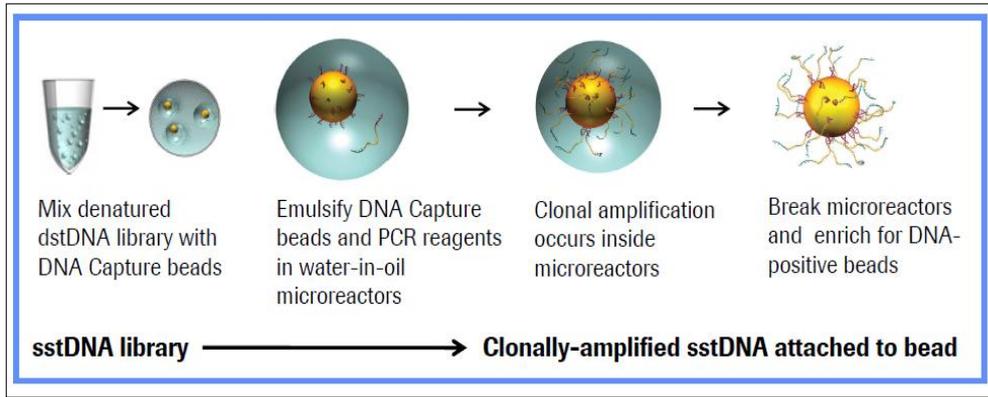


Fig 6.4 Schema di emPCR.

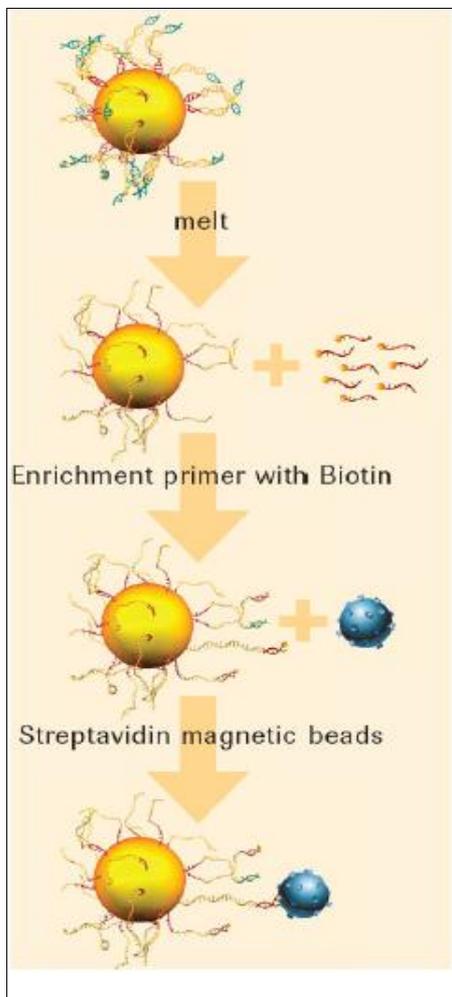


Fig 6.5 Arricchimento biglie (1° fase).

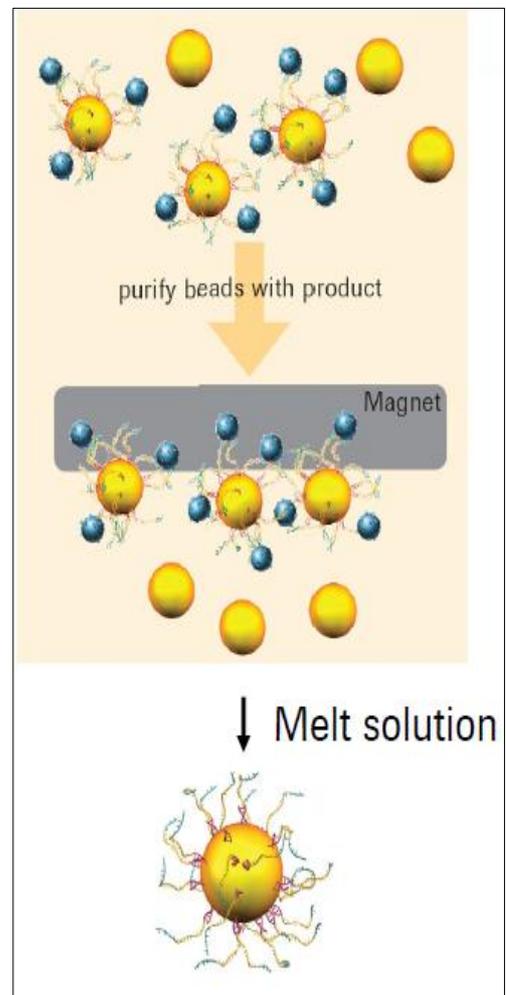


Fig. 6.6 Arricchimento biglie (2° fase).

6.4.5 Sequenziamento con GS FLX Titanium 454 Roche

Il DNA, amplificato e legato alle biglie, è quindi pronto per il sequenziamento. Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato il sequenziatore *Next Generation* GS FLX Titanium 454 Roche. Il protocollo seguito fa riferimento al manuale *Sequencing Method Manual*.

Le biglie di DNA arricchite dopo la PCR in emulsione vengono trasferite in una piastra Pico-Titer-Plate™ (PTP) che contiene 3.400.000 pozzetti, ciascuno con un diametro di 29µm. In ogni pozzetto viene caricata una biglia di DNA e successivi strati di biglie contenenti i reagenti necessari per la reazione di sequenziamento (Fig. 6.7 e 6.8).

Ciascun gruppo di biglie deve essere preparato. Le biglie di DNA ottenute dalla PCR vengono mescolate a biglie contenenti DNA di controllo, che servono come controllo interno per la reazione di sequenziamento. Il gruppo delle *Enzyme Beads* contiene gli enzimi sulfonilasi e luciferasi, necessari per la reazione di sequenziamento. Gli altri reagenti sono invece direttamente caricati nella cassetta dei reagenti. Una volta che i quattro strati di biglie sono stati caricati sulla PTP, questa può essere posizionata nel sequenziatore e la reazione di sequenziamento può cominciare.

La piattaforma GS FLX Titanium 454 Roche funziona con una reazione di pirosequenziamento (Fig. 6.9). E' un tipo di sequenziamento che si ottiene per sintesi: durante la reazione si ha un flusso sequenziale di nucleotidi, sempre nello stesso ordine (TACG), attraverso la PTP. Quando arriva il nucleotide complementare alla base presente sul filamento legato alla biglia la polimerasi lo incorpora e libera un pirofosfato (PPi). La sulfonilasi libera poi una molecola di ATP dal PPi; la luciferasi, a sua volta, idrolizza l'ATP e usa la luciferina per creare un segnale luminoso, registrato da una CCD (charge-coupled device) camera. La potenza del segnale è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati. Per il nostro esperimento abbiamo utilizzato 200 cicli di flusso nucleotidico per ottenere delle sequenze di lunghezza pari a 400bp.

Abbiamo effettuato due corse di sequenziamento per 15 pazienti, per un totale di 1.266.816 reads e 491.292.615 bp.

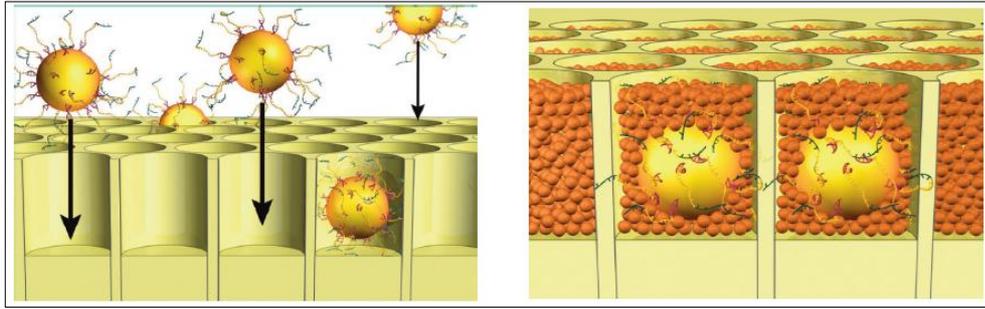


Fig. 6.7 Deposizione delle biglie di DNA nei pozzetti della PTP. La PTP è divisa in due regioni da un gasket. Si caricano 2.000.000 di DNA beads per regione.

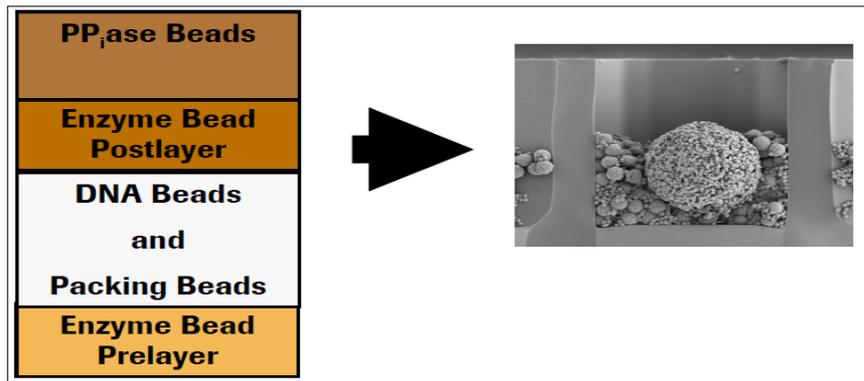


Fig. 6.8 Nella PTP sono caricati quattro diversi strati, ripartiti come nella tabella. L'immagine sulla destra mostra l'aspetto del pozzetto quando tutte le biglie sono state caricate. Le *packing beads* non hanno un ruolo enzimatico ma fungono da stabilizzatori degli altri componenti del sistema.

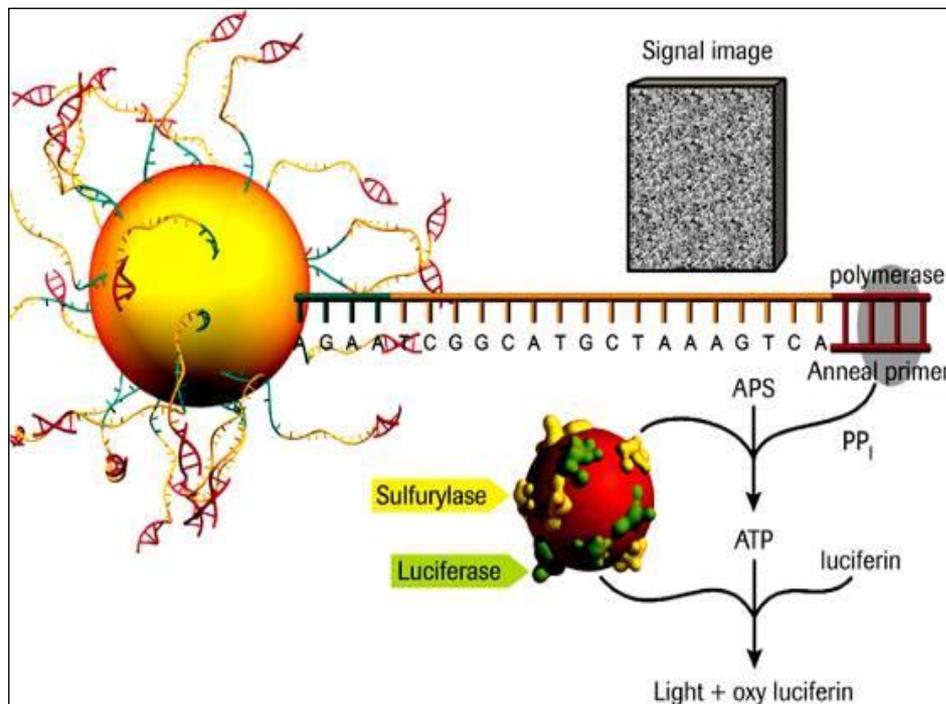


Fig. 6.9 Pirosequenziamento: l'incorporazione di un nucleotide risulta nel rilascio di un pirofosfato che, per successive azioni enzimatiche, porta all'emissione, pozzetto-specifica, di un segnale luminoso.

6.4.6 Analisi dei dati

L'analisi bioinformatica è un momento fondamentale della tecnologia *Next Generation*, ed avviene a più livelli. I dati grezzi, ovvero i segnali luminosi prodotti nel corso del pirosequenziamento, sono processati a livello del *cluster* del sequenziatore. A questo punto si può procedere all'analisi della *run* di sequenziamento, attraverso il software *GS Run Browser* (Roche). Inizialmente si valuta il valore di *raw wells*, che rappresenta il numero di pozzetti che sono stati processati, e quello di *key pass wells*, che ci dice quante delle *raw wells* sono state riconosciute attraverso la *key region* presente a livello dell'adattatore; sono indici di qualità un valore di *raw wells* pari a circa il 50% del numero di biglie caricate, ed un valore di *key pass wells* che sia circa il 90% delle *raw wells*. Altri parametri di qualità della *run* sono la percentuale di *passed filter wells*, ovvero la percentuale di letture che hanno passato tutti i filtri, la quale deve essere maggiore del 50%, ed il valore di *mixed + dot key pass*, che esprime il numero di letture scartate per bassa qualità e deve essere inferiore al 25%. Da questa prima analisi si ottiene anche indicazione sulla lunghezza media, in bp, delle letture, ed è possibile visualizzare il segnale emesso dalla PTP ed anche il *flowgram* di ogni singolo pozzetto.

La *sequence capture* è stata valutata tramite analisi di *coverage* delle sequenze target ad una profondità pari a 1 (almeno una lettura per base); un *coverage* del 95%, per cui la sequenza target è letta interamente almeno una volta, è stato considerato indice di successo della cattura. Per ogni campione sono stati, inoltre, valutati, il numero totale di letture, il numero totale di basi lette, la moda della lunghezza dei frammenti e la profondità media del sequenziamento (valore ottimale > 40). Il *coverage* e la profondità media sono stati estratti utilizzando scripts.

L'analisi delle varianti è stata effettuata tramite il software *GS Reference Mapper* (Roche): ogni sequenza letta è così controllata con la sequenza genomica di riferimento (assemblaggio hg19); da questa analisi si genera una lista di varianti ad alta confidenza, le quali sono inizialmente controllate come possibili SNPs attraverso il dbSNP build 135. Di ogni variante nucleotidica identificata dal *GS Reference Mapper* sono state annotate le coordinate cromosomiche, il gene, il nucleotide *wild-type* e quello mutato, l'eventuale cambio aminoacidico, la profondità di lettura per quella base e la percentuale di letture che contengono la variante.

Per l'identificazione di possibili varianti ai siti di splicing è stata calcolata la distanza di ogni variante dalla più vicina giunzione introne-esone: sono state selezionate le varianti di *splicing* entro i 10 nucleotidi dalla giunzione.

6.4.7 Validazione varianti

La validazione dei dati ottenuti mediante l'analisi bioinformatica, è stata effettuata con amplificazione PCR e successiva reazione di sequenziamento. In Tabella 6.3 sono riportate le sequenze dei *primers* utilizzati.

In seguito, di ogni variante aminoacidica validata con metodo Sanger e non descritta nel database HGMD professional <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, nel quale sono depositate tutte le mutazioni patogenetiche descritte in letteratura, è stata effettuata l'analisi in silico con i programmi di predizione:

SIFT-<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>,

PolyPhen-<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> *edu/pph2/* e

pMUT-<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/PMut.jsp>.

per distinguere le varianti potenzialmente dannose da quelle con effetto neutrale.

E' stato inoltre valutato il grado di conservazione dell'aminoacido *wild type* nelle diverse specie.

Le varianti non sinomine sono state inoltre ricercate nei genitori dei probandi attraverso sequenziamento Sanger.

Per quanto riguarda le varianti introniche sono state analizzate con siti di predizione quali Netgene2-<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> e

BDGP-http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html web.

Tabella 6.3 Sequenze dei primers utilizzati per la validazione delle varianti.

Gene	Forward	Reverse
<i>ACTN4 ex8</i>	5'-TCACTCTGCAGGTCCCTCTC-3'	5'-CGTCTGCAAGAGAAATGAGG-3'
<i>PLCE1 ex9</i>	5'-TGTGTTCACCATGTGGCTCT-3'	5'-TGTCTTTTCCCTGGTGTTC-3'
<i>MYO1E ex23</i>	5'-AAAGCAGATTCAGCAATTTCA-3'	5'-GTGCGATCAAGACCCCTTT-3'
<i>PLCE1 ex8</i>	5'-CGACTCTCATGGTTCAGAGGA-3'	5'-GAGGCAGTTGTGGGCTTTAC-3'
<i>PODXL ex2</i>	5'-ACCCCTCACCTACAAGTCC-3'	5'-CAAGGCATGAGCCTTTTCAG-3'
<i>LMX1B ex6</i>	5'-GCCAGAAGACTACGGTCCAG-3'	5'-CTTGGTGGAAGGCTTTTGAG-3'
<i>ITGA3 ex2</i>	5'-CCTGGCACCAAGAATCTGTA-3'	5'-TTCATCCGCTCACAGTCATC-3'
<i>PTPRO ex13</i>	5'-CCCAAATCACTCTTCGCAGT-3'	5'-TTTTGCCAGATAATTAGCCTTA-3'
<i>KIRREL3 ex10</i>	5'-AGACCCTGACCCTCAAATCC-3'	5'-GTCCTTCTCCCTCCCTCAG-3'
<i>NPHS2 ex1</i>	5'-GCAGCGACTCCACAGGGACT-3'	5'-GAACCTGAGCATCCAGCAAT-3'
<i>NPHS2 ex3</i>	5'-TCTTATGCCAAGGCCTTTG-3'	5'-CCAATTCTCTCTTTGGCTACC-3'
<i>NPHS2 ex4</i>	5'-CCCAGTTTGTGGGATAATC-3'	5'-CCCTAGATTGCCTTTGCACT-3'
<i>NPHS2 ex8A</i>	5'-GTCTCCCCAGCTCAAGACC-3'	5'-GGATGGTGCATTGTGACTTC-3'
<i>CITED2 ex2</i>	5'-TGGGCGAGCACATACTAC-3'	5'-GGTAGGGGTGATGGTTGAAA-3'
<i>SMARCAL1 ex3</i>	5'-CCAAAATTTCCAAGGGAGT-3'	5'-GTGCCAAGGGAGGAGAGATT-3'

6.5 Array Comparative Genomic Hybridization

L'array Comparative Genomic Hybridization (CGH) è stato eseguito utilizzando un *microarray* custom 180K, secondo quanto previsto dal protocollo di utilizzo della piattaforma Agilent Human Genome CGH Microarray. In particolare il nostro *array* ad alta densità è stato disegnato tramite il software <http://earray.chem.agilent.com/> in modo tale da avere un numero elevato di sonde, ogni 100-200bp, nei 45 geni analizzati tramite NGS. La piattaforma da noi utilizzata consiste in un *microarray* ad alta risoluzione che permette l'analisi *genome wide* e la visualizzazione del profilo molecolare di riarrangiamenti genomici con una risoluzione media di 100 kb. Il protocollo seguito prevede 7 passaggi (Fig. 6.10). La fase preliminare consiste nell'estrazione del DNA dal campione di sangue periferico, in seguito 500 ng di DNA purificato del paziente e di un controllo dello stesso sesso (Agilent) sono digeriti separatamente con gli enzimi Alu e RsaI per 2 ore a 37°C. Questo passaggio consente di ottenere frammenti di DNA di dimensioni comprese tra 200 e 500 bp. I frammenti così ottenuti sono poi denaturati mediante l'aggiunta di 5 µl di Random Primers per 3' a 95°C e marcati con due cianine di colore diverso; rispettivamente cianina 5-dUTP (Cy5) per il campione e cianina 3-dUTP (Cy3) per il controllo; ed incubati per 2 ore a 37°C. Il DNA così marcato viene poi purificato in colonnine (Amicon Ultra, Millipore), per eliminare i frammenti troppo piccoli, e letto al NanoDrop per determinare la concentrazione finale e l'incorporazione del fluoroforo, parametri necessari per calcolare l'attività specifica. A questo punto 18 µg del DNA marcato del campione e del controllo sono mescolati e uniti a Human Cot-1 DNA (necessario per la saturazione delle sequenze ripetute presenti nel genoma e quindi per ridurre i segnali aspecifici). I campioni così preparati sono denaturati a 95°C per 3 minuti ed ibridati sull'*array* per 24 ore a 65°C in un termostato a rotazione (20rpm). Al termine dell'ibridazione seguono due lavaggi per eliminare l'eccesso del DNA non ibridato ed il vetrino è poi rapidamente asciugato e posto nello *scanner* Agilent C. Lo strumento, tramite l'utilizzo di laser, raccoglie l'intensità del segnale luminoso emesso dalle cianine; il rapporto dell'intensità di fluorescenza fra i due fluorofori è proporzionale al rapporto della quantità del materiale genomico del campione e del controllo. Se, quindi, le intensità dei fluorofori sono uguali, la regione analizzata non presenta alterazioni, se, invece, il rapporto Cy5/Cy3 è alterato, si è in presenza di amplificazioni o delezioni. I dati così ottenuti sono poi elaborati con il software Agilent Feature Extraction 10.5 e poi importati nel Genomic Workbench Standard

Edition 5.0 software (Agilent Technologies). I dati ottenuti vengono inoltre confrontati con quelli registrati nei database delle varianti genomiche e UCSC.

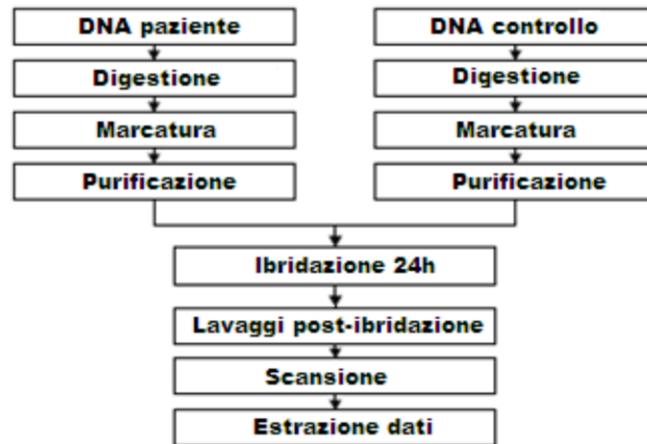


Fig. 6.10. *Workflow Array CGH.*

Capitolo 7

Risultati

7.1 Targeted resequencing di 45 geni podocitari

7.1.1 Analisi della *Run* di sequenziamento e della *Sequence Capture*

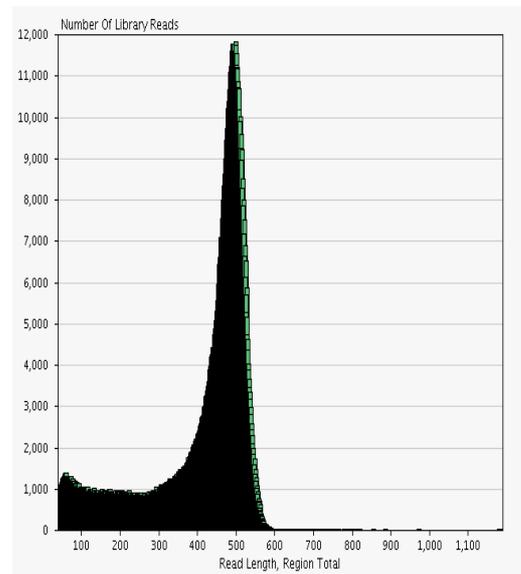
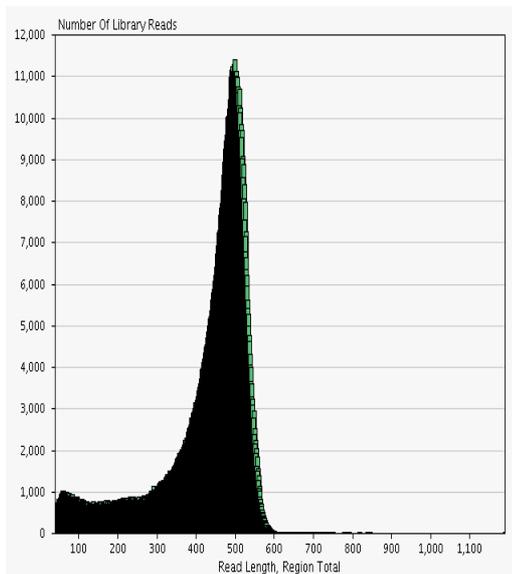
L'analisi della *Run* di sequenziamento tramite il software *GS Run Browser* ha fornito i risultati per la valutazione della qualità dei due sequenziamenti (Tabella 7.1). In entrambi il numero dei pozzetti processati (*raw wells*) rispetto alla quantità di biglie caricate, sia la quantità di *Key Pass wells* rispetto al numero di *raw wells* che la quantità di *Passed Filter wells* soddisfano i rispettivi indici di qualità.

Per ogni campione sono stati inoltre valutati il numero totale di letture, il numero totale di basi lette, la moda della lunghezza dei frammenti, la profondità media del sequenziamento ed il *coverage* delle sequenze target ad una profondità pari a 1 (almeno una lettura per base), 5 e 10 (Tabella 7.2).

Per quanto riguarda la lunghezza dei frammenti letti, la moda è compresa fra 474 e 490 bp (Fig. 7.1), la media delle sequenze mappabili per campione è stata di 82.579 bp distribuite con una profondità media del 67X. La *sequence capture* è stata buona in quanto in media il 91% di tutte le basi presentano un *coverage* di 10X; tra i 576 esoni catturati solo 23 esoni, il 4%, è stato poco coperto a causa dell'alto contenuto in GC o della presenza di sequenze ripetute.

Tabella 7.1 Analisi *Run* di sequenziamento.

		Corsa 1	Corsa 2
<i>Beads</i>		4.000.000	4.000.000
<i>Raw wells</i>		2.310.453	2.351.786
<i>Key Pass Wells</i>		2.206.042	2.255.925
<i>Failed</i>	<i>Dot</i>	42.364	57.509
	<i>Mixed</i>	266.326	293.567
	<i>Short Quality</i>	432.472	552.682
	<i>Short Primer</i>	77	74
<i>Passed Filter Wells</i>		1.462.996	1.351.188
<i>%Dot+Mixed</i>		13.99	15.56
<i>% Short</i>		19.61	24.53
<i>% Passed Filter</i>		66.32	59.90

**Fig. 7.1** Curve di distribuzione della lunghezza delle letture delle due corse.

Campione	Letture Mappate	Basi Mappate	Coverage 1X	Coverage 5X	Coverage 10X	Moda della lunghezza delle letture(bp)	Profondità
Caso 1	114734, 97%	42741097, 99%	97%	95%	93%	490	64X
Caso 2	70833, 99%	30098039, 99%	96%	95%	92%	489	77X
Caso 3	139288, 97%	51851370, 99%	96%	95%	93%	486	77X
Caso 4	56821, 99%	24083727, 99%	95%	93%	90%	475	60X
Caso 5	40220, 99%	17043671,99%	95%	91%	87%	474	42X
Caso 6	57675, 99%	24404788, 99%	95%	93%	90%	487	66X
Caso 7	52432, 99%	22265519, 99%	95%	92%	90%	479	55X
Caso 8	30409, 99%	1293033, 99%	95%	92%	84%	480	32X
Caso 9	70704, 99%	29825739, 99%	96%	94%	92%	488	74X
Caso 10	86091, 97%	31774546, 99%	95%	93%	91%	485	54X
Caso 11	133799, 97%	49290095, 99%	96%	94%	93%	486	75X
Caso 12	125341, 97%	46440606, 99%	97%	95%	94%	485	74X
Caso 13	112106, 99%	47357050, 99%	97%	96%	94%	483	124X
Caso14	71907, 99%	30475133, 99%	97%	95%	93%	482	79X
Caso 15	76324, 97%	28049477, 99%	96%	94%	91%	486	49X

Tabella 7.2 Tabella riassuntiva dell'analisi della run di sequenziamento e del *coverage*.

7.1.2 Interpretazione delle varianti geniche identificate

Per definire la patogenicità delle nuove varianti individuate abbiamo applicato i seguenti criteri di selezione:

- le varianti devono essere o missenso o alterare siti di splicing;
- le varianti non devono essere incluse del dbSNP135 e non devono essere riportate in HGMD (www.hgmd.cf.ac.uk);
- le varianti non devono essere presenti con una frequenza più alta del 5% tra i controlli sani del database “1000 Genomes Project” (www.1000genomes.org);
- le varianti non devono essere presenti, con una frequenza più alta del 5%, nel database Kaviar-hg19 (<http://db.systemsbio.net/kaviar/>);
- le varianti non devono essere presenti con una frequenza maggiore del 15% tra i pazienti affetti da SNSR inclusi nel nostro studio;
- le varianti devono essere localizzate in domini proteici altamente conservati tra le specie (almeno tra 6 specie filogeneticamente distanti);
- le varianti non devono essere presenti “Exome Variant Server” del “NHLBI Exome Sequencing Project (ESP)” (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, release version: v.0.0.10).

Inoltre, per determinare se le varianti fossero patogenetiche abbiamo utilizzato programmi di predizione quali *Polyphen*, *Sift* e *pMut*.

Sulla base di questi criteri 10 dei 15 soggetti analizzati presentano varianti causative o potenzialmente casuative. (Tabella 7.3)

Campione	Varianti	Dominio proteico (Uniprot database)	PolyPhen	SIFT	pMut	Madre	Padre	Sequenziamento Sanger
Caso 1	Negativo							
Caso 2	Negativo							
Caso 3	Negativo							
Caso 4	Negativo							
Caso 5	<p>KIRREL3 c.(1166G>A)+(=); p.(Arg389His)+(=)</p> <p>NPHS2 c.(-52C>G)</p> <p>SMARCAL1 c.(243T>C)+(=); p.(Asn81Asn)+(=)</p>	<p>Dominio Extracellulare <i>IG-like C2 Type4</i></p> <p>Compreso tra un dominio Coiled-coil e un dominio HARP1</p>	Probabilmente dannosa	Non tollerata	Patologica	wt	mut	Confermata
Caso 6	<p>NPHS2 c.(419delG)+(419delG) p.(Gly140Aspfs*41)(Gly140Aspfs*41)</p>	Dominio citoplasmatico				mut	mut	Confermata
Caso 7	<p>NPHS2 c.(413G>A) + (467_468insT); p.(Arg138Gln) +(Leu156Phefs*11)</p>	Entrambe nel dominio citoplasmatico				mut	mut	Confermata
Caso 8	<p>NPHS2 c.(104insG)+(1143delC) p.(Gly35Glyfs*35)+(Pro381Profs*5)</p> <p>CITED2 c.(222G>A)+(=); p. (Gly222Gly)+(=)</p>	<p>Entrambe nel dominio citoplasmatico</p> <p>Dominio ricco di acido aspartico e glutammico</p>				mut	mut	Confermata

Caso 9	ITGA3 c.(259C>T)+(=); p.(Arg87Trp)+(=)	Dominio extracellulare FG-GAP1	Probabilmente dannosa	Non tollerata	Patologica	wt	mut	Confermata
Caso 10	MYOIE c.(2597A>G)+(=); p.(Gln866Arg)+(=)	Compresa tra un dominio IQ e un dominio SH3	Benigna	Tollerata	Neutrale	wt	mut	Confermata
Caso 11	PLCE1 c.(3197A>G)+(=); p.(Lys1066Arg)+(=)	Compresa tra un dominio Ras-GEF e un dominio PI-PLC X	Benigna	Non tollerata	Neutrale	wt	mut	Confermata
Caso 12	ACTN4 c.(782C>A)+(=); p.(Val261Glu)+(=)	Dominio CH2	Probabilmente dannosa	Non tollerata	Patologica	wt	wt	Confermata
Caso 13	LMX1B c.(833C>T)+(=); p.(Ala278Val)+(=)	Porzione C-terminale	Probabilmente dannosa	Tollerata	Patologica	wt	mut	Confermata
Caso 14	PTPRO c.(2279G>A)+(=); p.(Gly760Asp)+(=)	Dominio extracellulare fibronectina Type III-8	Benigna	Non tollerata	Patologica	nd	nd	Confermata
Caso 15	PODXL c.(690C>A)+(=); p.(Gly230Gly)+(=) PLCE1 c.(2599G>C)+(=); p. (Thr866Thr)+(=)	Dominio ricco in treonina Compresa tra il dominio Ras-GEF e PI-PLC X-box						Confermata Confermata

Tabella 7.3 Tabella riassuntiva delle varianti identificate nei 15 soggetti inclusi nello studio. nd, non disponibile; mut, mutato; wt, wild type.

Caso 1

L'analisi bioinformatica dei dati prodotti dal sequenziamento con *GS FLX Titanium 454 Roche* non ha evidenziato alcuna variante di sequenza in questo paziente.

Caso 2

L'analisi bioinformatica dei dati prodotti dal sequenziamento con *GS FLX Titanium 454 Roche* non ha evidenziato alcuna variante di sequenza in questo paziente.

Caso 3

L'analisi bioinformatica dei dati prodotti dal sequenziamento con *GS FLX Titanium 454 Roche* non ha evidenziato alcuna variante di sequenza in questo paziente.

Caso 4

L'analisi bioinformatica dei dati prodotti dal sequenziamento con *GS FLX Titanium 454 Roche* non ha evidenziato alcuna variante di sequenza in questo paziente.

Caso 5

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454 Roche* ha individuato, nel paziente 5, tre diverse varianti nei geni *NPHS2*, *KIRREL* e *SMARCAL1* (Tabella 7.3) non precedentemente note come SNPs. La variante **c.-52C>G** nel promotore del gene *NPHS2* risultava presente nel 100% di 60 letture (65% di queste sul filamento *Forward* e 35% sul filamento *Reverse*) ed è stata successivamente confermata tramite sequenziamento Sanger. Essa, presente in omozigosi, determina la sostituzione di una Citosina in una Guanina nel promotore a -52 bp dall'ATG, variante già precedentemente associata a SNSR, Oleggini *et al*¹¹⁵. L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante in eterozigosi sia nel padre che nella madre del paziente.

Nella regione codificante del gene *KIRREL3* è stata individuata la variante nucleotidica **c.1166G>A**, presente nel 43% di 58 letture (47% sul filamento *Forward* e 43% sul filamento *Reverse*) ed è stata successivamente confermata dal sequenziamento Sanger. Essa determina la sostituzione, in eterozigosi, della Guanina in posizione 1166 con una Adenina, ed il cambio aminoacidico di una Arginina in un'Istidina in posizione 389 (p.Arg389His).

Il gene *KIRREL3*, tra i geni inclusi nel *sequencing array*, appartiene al gruppo dei geni candidati, in quanto nessuna variante in questo gene è stata ancora descritta come causativa di SNSR.

L'analisi bioinformatica del possibile effetto dannoso della variante è stato valutato con i programmi di predizione *PolyPhen*, *SIFT* e *pMUT*, i quali, rispettivamente, la

definiscono come probabilmente dannosa, non tollerata e patologica. L'analisi dell'allineamento proteico, importante per capire il grado di conservazione di un determinato aminoacido tra le specie, mostra un buon grado di conservazione, sia dell'aminoacido che del dominio proteico (Fig. 7.2). L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante nel padre del paziente.

Nel gene *SMARCAL1* l'analisi bioinformatica della *run* di sequenziamento ha individuato la variante nucleotidica **c.243T>C**, presente nel 53% di 41 letture, confermata dal sequenziamento Sanger. Questa determina la sostituzione, in eterozigosi, di una Timina con una Citosina in posizione 243 della sequenza codificante; si tratta di una variante silente p.Asn81Asn.

Caso 6

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454 Roche* ha individuato, nel paziente 6, una variante nel gene *NPHS2*. La variante **c.419delG** risultava presente nel 100% di 70 letture (63% di queste sul filamento *Forward* e 37% sul filamento *Reverse*) ed è stata successivamente confermata tramite sequenziamento Sanger. Essa, presente in omozigosi, determina la delezione di una Guanina in posizione 419 che determina un *fremeshift* e quindi l'introduzione di un codone di stop in posizione 181 (p.Gly140Aspfs*41), variante presente in HGMD come causativa di SNSR.¹¹⁶

L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante in eterozigosi sia nel padre che nella madre del paziente.

Caso 7

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454* ha individuato, nel paziente 7, due varianti nel gene *NPHS2*. La variante **c.413G>A** risultava presente nel 50% di 70 letture (55% di queste sul filamento *Forward* e 45% sul filamento *Reverse*) ed è stata successivamente confermata tramite sequenziamento Sanger. Essa, presente in eterozigosi, determina sostituzione di una Guanina con un'Adenina in posizione 413 ed il cambio aminoacidico di un Arginina con una Glutammina (p.Arg138Gln), variante presente in HGMD, come causativa di SNSR.¹¹⁶

L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante in eterozigosi nel padre del paziente.

La variante **c.467_468insT** risultava presente nel 61% di 50 letture (66% di queste sul filamento *Forward* e 34% sul filamento *Reverse*) ed è stata successivamente confermata tramite sequenziamento Sanger. Essa, presente in eterozigosi, determina

l'inserzione di una Timina in posizione 467 che determina un *fremeshift* e quindi l'introduzione di un codone di stop in posizione 167; p.Leu156Phefs*11. Anche questa variante è presente in HGMD, come causativa di SNSR.¹¹⁷ L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante in eterozigosi nella madre del paziente.

Caso 8

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454 Roche* ha individuato, nel paziente 8, due varianti nel gene *NPHS2* e una variante nel gene *CITED2*. La variante in *NPHS2*, **c.104insG** risultava presente nel 45% di 40 letture (30% di queste sul filamento *Forward* e 70% sul filamento *Reverse*) ed è stata successivamente confermata tramite sequenziamento Sanger. Essa, presente in eterozigosi, determina l'inserzione di una Guanina in posizione 104 che causa un *fremeshift* e quindi l'introduzione di un codone di stop in posizione 70 (p.Gly35Glyfs*35), variante presente in HGMD come causativa di SNSR.¹¹⁶ L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante in eterozigosi nel padre del paziente.

La variante in *NPHS2*, **c.1143delC** risultava presente nel 56% di 32 letture (65% di queste sul filamento *Forward* e 35% sul filamento *Reverse*) ed è stata successivamente confermata tramite sequenziamento Sanger. Essa, presente in eterozigosi, determina la delezione di una Citosina in posizione 1143 che causa un *fremeshift* e quindi l'introduzione di un codone di stop in posizione 386 (p.Pro381Profs*5), variante presente in HGMD come causativa di SNSR.¹¹⁸ L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante in eterozigosi nella madre del paziente.

Nel gene *CITED2* l'analisi bioinformatica della *run* di sequenziamento ha individuato la variante nucleotidica **c.222G>A**, presente nel 51% di 31 letture e confermata dal sequenziamento Sanger. Questa determina la sostituzione, in eterozigosi, di una Guanina con una Adenina in posizione 222 della sequenza codificante; si tratta tuttavia di una variante silente (p.Gly222Gly).

Caso 9

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454* ha individuato, nel paziente 9, una variante nel gene *ITGA3* non precedentemente nota come SNPs. La variante nucleotidica **c.259C>T** risultava presente nel 43% di 78 letture (47% sul filamento *Forward* e 43% sul filamento *Reverse*) e successivamente confermata dal sequenziamento Sanger. Essa determina la sostituzione, in eterozigosi, della Citosina in posizione 259 con una Timina ed il cambio aminoacidico di un'Arginina in Triptofano in posizione 87 (p.Arg87Trp).

L'analisi bioinformatica del possibile effetto dannoso della variante è stato valutato con i programmi di predizione *PolyPhen*, *SIFT* e *pMUT*, i quali, rispettivamente, la definiscono come probabilmente dannosa, non tollerata e patologica. L'analisi dell'allineamento proteico, importante per capire il grado di conservazione di un determinato aminoacido tra le specie, mostra un buon grado di conservazione, sia dell'aminoacido che del dominio proteico (Fig.7.2).

L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante nel padre del paziente .

Caso 10

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454* ha individuato, nel paziente 10, una variante nel gene *MYO1E* non precedentemente nota come SNPs. La variante nucleotidica **c.2597A>G** risultava presente nel 63% di 68 letture (57% sul filamento *Forward* e 43% sul filamento *Reverse*) e successivamente confermata dal sequenziamento Sanger. Essa determina la sostituzione, in eterozigosi, dell'Adenina in posizione 2597 con una Guanina ed il cambio aminoacidico di una Glutamina in Arginina in posizione 866 (p.Gln866Arg).

L'analisi bioinformatica del possibile effetto dannoso della variante è stato valutato con i programmi di predizione *PolyPhen*, *SIFT* e *pMUT*, i quali, rispettivamente, la definiscono come benigna, tollerata e neutrale. L'analisi dell'allineamento proteico, importante per capire il grado di conservazione di un determinato aminoacido tra le specie, mostra un buon grado di conservazione, sia dell'aminoacido che del dominio proteico (Fig.7.2).

L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante nel padre del paziente.

Caso 11

Nella paziente 11 l'analisi bioinformatica ha individuato una variante di sequenza, non nota come SNPs, nella regione codificante del gene *PLCE1*. La variante **c.3197 A>G**, è stata identificata nel 48% di 58 letture, determina la sostituzione, in eterozigosi, di Adenina in Guanina a livello del nucleotide 3197; a livello aminoacidico la Lisina in posizione 1066 è sostituita da un'Arginina (**p.Lys1066Arg**). La variante è stata validata tramite sequenziamento Sanger.

Non è mai stata riportata nella letteratura internazionale ed i programmi di predizione *PolyPhen*, *SIFT* e *pMUT* la definiscono, in relazione al suo possibile effetto dannoso come, rispettivamente, benigna, non tollerata e neutrale.

Non è stato possibile eseguire l'allineamento proteico in quanto questa proteina non è

ancora stata descritta in un numero sufficiente di specie filogeneticamente distanti.

L'analisi dei genitori del paziente ha individuato questa variante, in eterozigosi, nel padre.

Caso 12

Nella paziente 12 l'analisi bioinformatica ha individuato una variante nella regione codificante il gene *ACTN4* non precedentemente nota come SNPs. Nella regione codificante del gene *ACTN4* è stata individuata la variante nucleotidica **c.782C>A**, presente nel 43% di 78 letture (53% sul filamento *Forward* e 407% sul filamento *Reverse*) e successivamente confermata dal sequenziamento Sanger. Essa determina la sostituzione, in eterozigosi, della Citosina in posizione 782 con un'Adenina, ed il cambio aminoacidico di Valina in Glutammato in posizione 261 (**p.Val261Glu**).

Non è mai stata riportata nella letteratura scientifica, mentre altre varianti nel gene *ACTN4* sono state precedentemente descritte come causa di SNSR. L'analisi bioinformatica del possibile effetto dannoso della variante è stata effettuata con i programmi di predizione *PolyPhen*, *SIFT* e *pMUT*, i quali, rispettivamente, la definiscono come probabilmente dannosa, non tollerata e patologica.

L'allineamento proteico (Fig. 7.2) ha mostrato un altissimo grado di conservazione sia dell'amminoacido Valina, qui sostituito, che degli amminoacidi fiancheggianti.

La variante è risultata essere una variante *de novo*, in quanto non presente nei genitori.

Caso 13

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454* ha individuato, nel paziente 13, una variante nel gene *LMX1B* non precedentemente nota come SNPs. La variante nucleotidica **c.833C>T** risultava presente nel 65% di 120 letture (52% sul filamento *Forward* e 48% sul filamento *Reverse*) e successivamente confermata dal sequenziamento Sanger. Essa determina la sostituzione, in eterozigosi, della Citosina in posizione 833 con una Timina ed il cambio aminoacidico di un'Alanina in Valina in posizione 278 (**p.Ala278Val**).

L'analisi bioinformatica del possibile effetto dannoso della variante è stato valutato con i programmi di predizione *PolyPhen*, *SIFT* e *pMUT*, i quali, rispettivamente, la definiscono come probabilmente dannosa, tollerata e patologica. L'analisi dell'allineamento proteico mostra un buon grado di conservazione, sia dell'amminoacido che del dominio proteico (Fig. 7.2).

L'analisi dei genitori ha individuato la stessa variante nel padre del paziente.

Caso 14

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454* ha individuato, nel paziente 14, una variante nel gene ***PTPRO*** non precedentemente nota come SNPs. La variante nucleotidica **c.2279G>A** risultava presente nel 40% di 88 letture (40% sul filamento *Forward* e 60% sul filamento *Reverse*) e successivamente confermata dal sequenziamento Sanger. Essa determina la sostituzione, in eterozigosi, della Guanina in posizione 2279 con un'Adenina ed il cambio aminoacidico di una Glicina in Acido Aspartico in posizione 760 (p.Gly760Asp).

L'analisi bioinformatica del possibile effetto dannoso della variante è stato valutato con i programmi di predizione *PolyPhen*, *SIFT* e *pMUT*, i quali, rispettivamente, la definiscono come benigna, non tollerata e patologica. L'analisi dell'allineamento proteico mostra un buon grado di conservazione, sia dell'aminoacido che del dominio proteico (Fig. 7.2).

Non è stato possibile verificare la presenza della variante nei genitori in quanto non ci è pervenuto il DNA.

Caso 15

L'analisi bioinformatica del sequenziamento eseguito con *GS FLX Titanium 454* ha individuato, nel paziente 15, due varianti rispettivamente nei geni ***PODXL*** e ***PLCE1***. Nel gene ***PODXL*** l'analisi bioinformatica della *run* di sequenziamento ha individuato la variante nucleotidica **c.690C>A**, presente nel 52% di 51 letture e confermata dal sequenziamento Sanger. Questa determina la sostituzione, in eterozigosi, di una Citosina con un'Adenina in posizione 690 della sequenza codificante; si tratta tuttavia di una variante silente p.Gly230Gly.

Nel gene ***PLCE1*** l'analisi bioinformatica della *run* di sequenziamento ha individuato la variante nucleotidica **c.2599G>C**, presente nel 56% di 62 letture e confermata dal sequenziamento Sanger. Questa determina la sostituzione, in eterozigosi, di una Guanina con una Citosina in posizione 2599 della sequenza codificante; anche in questo caso si tratta di una variante silente p.Thr866Thr.

Nei casi, in cui abbiamo identificato varianti in assetto eterozigote (casi 9, 10, 11 e 14), abbiamo effettuato, inoltre, un Array CGH per escludere la presenza di delezioni, duplicazioni o amplificaioni che potessero alterare l'espressione dell'allele *wild-type*. In nessuno dei quattro pazienti abbiamo identificato riarrangiamenti genomici che

possano contribuire al loro fenotipo clinico.

7.1.3. Genotipo e fenotipo clinico

Il profilo clinico-patologico di ogni paziente è riportato nella Tabella 6.1. Per quanto concerne le caratteristiche cliniche all'esordio, tutti i bambini presentavano edemi periferici, funzionalità renale nella norma, una severa proteinuria e microematuria; e un solo caso (caso 9) ha avuto ematuria macroscopica intermittente seguita da microematuria persistente. Con l'esclusione di due pazienti in cui l'esordio della SNSR si collocava nel primo anno di vita, entrambi caratterizzati da severe mutazioni a carico del gene *NPHS2*^{115,116} che determinano o una completa delezione o una severa riduzione dell'espressione proteica (caso 6 e 7), gli altri bambini portatori di mutazioni patogenetiche non presentavano né un'età d'insorgenza più precoce (mediana 3 anni e 2 mesi (intervallo da 2 anni e 6 mesi-8anni) *versus* 6 anni (intervallo da 5 anni e 5 mesi-15 anni) Mann-Whitney test $P < 0.12$) né un fenotipo clinico diverso rispetto a quelli negativi al test genetico (Tabella 6.1). Inoltre dei 4 pazienti, che hanno già raggiunto ESRD (caso 11, 12, 14 e 15), in tre (caso 11, 12 e 14) abbiamo identificato anomalie genetiche. Mentre, solo uno dei cinque pazienti non mutati ha presentato progressivo deterioramento della funzione renale fino all'insufficienza terminale (caso 15) e quattro di loro sono andati incontro a remissione completa (caso 2, 3 e 4) o parziale (caso 1). Possiamo quindi concludere che sulla base del confronto dei dati clinici e del genotipo dei soggetti portatori di mutazioni e di quelli risultati negativi al test genetico, la presenza e il tipo di alterazione genetica non possono essere sospettati sulla base del solo fenotipo clinico del paziente.

7.1.4 Genotipo e risposta alla terapia farmacologica

L'analisi retrospettiva della storia clinica ha mostrato che a 12 dei nostri pazienti affetti da SNSR (80%) sono stati somministrati farmaci immunosoppressori (Tabella 7.4); 8 hanno ricevuto ciclosporina (CyA, casi 1-3, 11-15); 10 ciclofosfamide (CF, casi 1-5, 9, 10, 12, 14, 15); 3 micofenolato mofetile (MMF, casi 1, 10, 11), 2 tacrolimus (TK, casi 11, 14), 3 rituximab (Rtx, casi 1, 11, 15), 8 hanno ricevuto una combinazione di due o più immunosoppressori (casi 1-3, 10-12, 14, 15). Per quanto riguarda la risposta a questo tipo di terapia, solo 3 pazienti hanno mostrato una risposta significativa (CyA nel caso 2 e CF nei casi 3, 4). In tutti e tre la remissione è stata completa e nessuno di questi bambini ha presentato varianti genetiche all'analisi NGS; nel caso 4 che ha risposto a CF, l'analisi istologica ha rilevato un quadro di glomerulonefrite membranosa (MN, *membranous nephropathy*). Inoltre, 14 dei 15 pazienti inclusi in questo studio

sono stati trattati con farmaci inibitori del sistema renina-angiotensina (RAS); cioè con ACE-Inibitori (ACE-Is) e con antagonisti del recettore dell'angiotensina II (sartanici). Sei pazienti hanno ricevuto solo ACE-Is (casi 3, 5, 6, 11, 12, 15) e tra questi solo 2 (casi 3, 5) hanno mostrato una risposta al trattamento. E' da notare che 3 su 4 pazienti che non hanno mostrato nessuna risposta (casi 11, 12, 15), sviluppando un declino della funzionalità renale fino ad arrivare ad ESRD; non hanno risposto neppure al trattamento con immunosoppressori. Il quarto è, invece, un caso di sindrome nefrosica ad esordio precoce, dovuto alla completa assenza della proteina NPHS2 (caso 6). Entrambi i pazienti che hanno ricevuto solo sartanici, hanno raggiunto una remissione completa (RC) (casi 4, 9). Infine tra i bambini a cui è stato somministrato sia ACE-Is che sartanici (casi 1, 7, 8, 10, 13, 14), 4 hanno risposto al trattamento (casi 1, 8, 10, 13) ottenendo remissione parziale (RP) mentre gli altri due (casi 7, 14) hanno mostrato una riduzione della proteinuria non sufficiente a definire una RP, e, quindi, sono stati classificati come AR, assenza di remissione. Questo può essere dovuto al fatto che questi farmaci sono stati somministrati ai bambini o a basso dosaggio o sono stati introdotti solo in una fase avanzata della malattia per controllare l'ipertensione. Concludendo, nel gruppo di pazienti con RC o RP, 5 presentano una mutazione genetica (casi 5, 8, 9, 10, 13) e 4 no (casi 1-4). Sorprendentemente 3 dei 4 bambini senza mutazioni hanno mostrato una remissione completa dopo la terapia con immunosoppressori (casi 2, 3, 4). Nessuno dei 5 pazienti positivi alla ricerca di varianti eseguita con NGS ha risposto, invece, al trattamento con immunosoppressori, mentre ha raggiunto una remissione parziale o completa quando trattato con bloccanti RAS (casi 5, 8, 9, 10, 13). Infine tra i 6 pazienti che non hanno avuto nessuna remissione della malattia, 5 presentano delle anomalie genetiche (casi 6, 7, 11, 12, 14). Questo ci suggerisce che in pazienti affetti da SNSR, una risposta negativa al nostro *screening*, tramite NGS predice, in maniera robusta, la risposta agli immunosoppressori. Il trattamento con questi farmaci non è al contrario indicato quando la SNSR è associata ad un'anomalia genetica. In questi pazienti è, invece, indicato un trattamento antiproteinurico con inibitori RAS, che devono essere possibilmente somministrati in combinazione, ACE-Is e sartanici alle più alte dosi tollerate dal paziente.

7.1.5 Genotipo e quadro istopatologico della biopsia renale

A 14 dei 15 pazienti, inclusi nel nostro studio è stata effettuata la biopsia renale ed il quadro istologico più comune è risultato quello di GSFS (casi 1, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 14,

15; 60%, Tabella 7.4). Nei casi 2, 5, 11 e 13 (26,7%) il quadro istologico rilevato è stato invece quello di MCD; e nel caso 4 (7%) di una MN. E' interessante notare che uno dei pazienti a cui è stata posta la diagnosi di GSFS (caso 10), mostra una variante *collapsing* caratterizzata da lesioni massive iperplastiche intraglomerulari.^{119, 120} Questo bambino è affetto da nefropatia C1q (C1qN, C1q *Nephropaty*) che ha esordito due settimane dopo l'insorgenza della varicella, inoltre, presenta un fenotipo clinico atipico caratterizzato da una severa SNSR, che non risponde nè al trattamento con CF nè con MMF. É da notare che la glomerulopatia *collapsing* (CG, *collapsing glomerulopathy*) è raramente descritta nel contesto di C1qN¹²⁰. Questo bambino presenta inoltre una mutazione in eterozigosi in *MYOIE*, che sebbene noi sia causativa di *per se*, potrebbe aver contribuito al determinarsi di un fenotipo clinico così aggressivo e alla perdita di risposta al trattamento con gli immunosoppressori.

Tra i 4 pazienti con un quadro istologico di MCD, uno ha già raggiunto l'ESRD (caso 11), uno ha raggiunto una RP (caso 13) e due hanno avuto una RC. Per quanto riguarda i 9 pazienti con quadro istologico GSFS, 3 presentano ESRD (casi 12, 14, 15), 5 hanno avuto una RP (casi 1, 8, 10) o una RC (casi 3, 9) e 1 non ha avuto remissione (caso 7). Concludendo nella nostra coorte di pazienti, la progressione verso l'ESRD si è verificata solo nei bambini che non hanno avuto risposta a nessun tipo di trattamento, indipendentemente dal quadro istologico rilevato al momento della biopsia. La remissione completa c'è stata solo nei pazienti privi di anomalie genetiche, che hanno risposto completamente alla terapia immunosoppressiva o in pazienti con mutazioni che hanno risposto agli inibitori RAS, indipendentemente dal quadro istopatologico (2 MCD, 2 GSFS and 1 MN). Nei bambini affetti da SNSR, quindi, lo *screening* NGS rappresenta il miglior predittore della risposta agli immunosoppressori, a prescindere dal quadro istopatologico della biopsia.

Paziente	Gene	Istol	CyA	Resp	CF	Resp	MMF	Resp	TK	Resp	Rtx	Resp	ACE-Is	Resp	Sar	Resp	Rem
Caso 1	nessuno	GSFS	si	no	si	no	<u>si</u> [†]	non val [†]	no	/	si	no	<u>ram</u>	resp. inc	<u>irb</u>	si	RP
Caso 2	nessuno	MCD	si	si	si	no	no	/	no	/	no	/	no	/	no	/	RC
Caso 3	nessuno	GSFS	si [§]	non val [§]	si	si	no	/	no	/	no	/	ram	si	no	/	RC
Caso 4	nessuno	MN	no	/	si	si	no	/	no	/	no	/	no	/	can	si	RC
Caso 5	<i>NPHS2</i>	MCD	no	/	si	no	no	/	no	/	no	/	<u>ram</u>	si	no	/	RC
Caso 6	<i>NPHS2</i>	no	no	/	no	/	no	/	no	/	no	/	<u>ram</u>	no	no	/	AR
Caso 7	<i>NPHS2</i>	GSFS	no	/	no	/	no	/	no	/	no	/	<u>ram</u>	no	<u>los</u>	no	AR
Caso 8	<i>NPHS2</i>	GSFS	no	/	no	/	no	/	no	/	no	/	<u>ram</u>	si	<u>los</u>	no	RP
Caso 9	<i>ITGA3</i>	GSFS	no	/	si	no	no	/	no	/	no	/	no	/	<u>irb</u>	si	RC
Caso 10	<i>MYO1E</i>	CG, C1qN	no	/	si	no	si	no	no	/	no	/	<u>ram</u>	si	<u>irb</u>	si	RP
Caso 11	<i>PLCE1</i>	MCD	si	no	no	/	si	no	si	no	si	no	<u>ram</u>	no	no	/	AR
Caso 12	<i>ACTN4</i>	GSFS	si	no	si	no	no	/	no	/	no	/	ram	no	no	/	AR
Caso 13	<i>LMX1B</i>	MCD	si	no	no	/	no	/	no	/	no	/	<u>ram</u>	si	<u>los</u>	si	RP
Caso 14	<i>PTPRO</i>	GSFS	si	no	si	no	no	/	si	no	no	/	ram	no	los	no	AR
Caso 15	nessuno	GSFS	si	no	si	no	no	/	no	/	si	no	ram	no	no	/	AR

Tabella 7.4 Genotipo confrontato con la risposta alla terapia farmacologica e con il quadro istopatologico.

Istol, quadro istologico della biopsia renale; Resp, risposta a; CyA, ciclosporina; CF, ciclofosfamide; MMF, micofenolato mofetile; TK, tacrolimus; Rtx, rituximab; ACE-Is, ACE-inibitori; Sar, sartanici; Rem, remissione; GSFS, glomerulosclerosi focale e segmentale; MCD, *minimal change disease*; MN, *membranous nephropathy*; CG, *collapsing glomerulopathy*; C1q N, *C1q nephropathy*; ram, ramipril; irb, irbesartan; can, candesartan; los, losartan; yes, ram, irb, los, il farmaco è ancora utilizzato; /, la risposta non è stata valutata in quanto il farmaco non è mai stato somministrato al paziente; RC, remissione completa; RP, remissione parziale; AR, assenza di remissione; non val, non valutabile; §, per errore il farmaco è stato interrotto dopo poche settimane; †, il farmaco è stato somministrato da poche settimane; resp. inc, risposta incostante.

Capitolo 8

Discussione

Negli ultimi anni numerosi geni sono stati associati alla patogenesi della sindrome nefrosica steroide-resistente (SNSR) sia nei bambini che negli adulti. Questi geni codificano per proteine essenziali per l'integrità ed il funzionamento della barriera di filtrazione glomerulare: si tratta soprattutto di geni a specifica espressione podocitaria, che hanno reso il podocita la cellula chiave nella patogenesi delle glomerulopatie.³⁹

Essendo la SNSR una malattia così geneticamente eterogenea e quindi difficile da studiare con le tradizionali tecniche della biologia molecolare, lo scopo di questo lavoro è stato quello di applicare la tecnologia di *high throughput sequencing* per una più appropriata diagnosi dei soggetti affetti. Infatti numerosi geni dovrebbero essere analizzati uno dopo l'altro per poter raggiungere un'appropriate diagnosi molecolare, cosa spesso non fattibile in termini di costi e di tempi. Il quadro clinico di questa condizione è inoltre variabile, sia per gravità e prognosi, che per età d'esordio, e ciò rende spesso difficile la selezione dei geni da analizzare.

A queste difficoltà si associa la crescente consapevolezza che il quadro clinico possa essere il risultato di un genotipo composto, caratterizzato dalla presenza di più mutazioni in geni diversi.⁴⁰ L'analisi molecolare di questi pazienti non può quindi soddisfarsi nell'individuare una singola mutazione in uno dei geni malattia, ma si deve applicare uno sforzo più estensivo.

La recente introduzione della tecnologia *Next Generation Sequencing* nel campo della biologia molecolare, basata sulla possibilità di eseguire in parallelo numerosissime sequenze, ha decisamente cambiato l'approccio della ricerca scientifica in ambito genetico, permettendo di analizzare la sequenza di grandi quantità di DNA in una singola *run* di sequenziamento.¹¹⁴

Questa tecnologia è rapidamente applicabile all'analisi di specifiche sequenze *target*, consentendo di sequenziare contemporaneamente un ampio e selezionato numero di geni in

diversi pazienti (*Targeted resequencing*).

Il nostro studio è stato effettuato mediante l'utilizzo dello strumento GS FLX Titanium 454 Roche; abbiamo effettuato il *Targeted resequencing* di 45 geni podocitari in 15 soggetti pediatrici affetti da SNSR sporadica e non sindromica. I geni inclusi nello studio sono rappresentati da tutti i geni malattia noti e da possibili geni candidati, sulla base di studi su modelli animali.

Per ogni paziente sono stati selettivamente sequenziati 576 esoni, per un totale di 103.216 *base pairs*.

L'analisi bioinformatica dei dati prodotti dal sequenziamento ha identificato in 10 dei 15 soggetti analizzati mutazioni causative o potenzialmente patogenetiche.

In quattro bambini abbiamo identificato mutazioni nel gene *NPHS2*, già descritte in HGMD come causative di SNSR¹¹⁵⁻¹¹⁸, in assetto omozigote (casi 5 and 6) e in assetto eterozigote composto (cases 7 and 8). In particolare il caso 5 presenta una variante nel promotore della *NPHS2*, già descritta in una larga coorte di pazienti affetti da SNSR con una frequenza <1%¹¹⁵, ed associata ad un *outcome* sfavorevole ed ESRD. Sebbene questa mutazione non sia sufficiente di *per se* a causare SNSR, rappresenta un “modificatore” per la gravità e la progressione della malattia. Il probando, inoltre, presenta una variante verosimilmente dannosa a carico del gene *KIRREL3*, questo codifica una proteina che appartiene alla famiglia delle proteine nefrin-like, il cui dominio citoplasmatico interagisce con la porzione C-terminale della *NPHS2*. Ad oggi questo gene non è mai stato associato con SNSR, ma è possibile, considerando la sua stretta interazione con altre proteine podocitarie, che la variante identificata a carico di questo gene possa avere un ruolo nella malattia e contribuire alla sua evoluzione.

Nei rimanenti casi abbiamo identificato varianti in assetto eterozigote in differenti geni, che abbiamo proposto come patogenetiche sulla base di analisi effettuate con programmi di predizione, analisi del grado di conservazione dei domini proteici tra le specie e dati di frequenza. Nel caso 9 abbiamo identificato una mutazione missenso nel gene *ITGA3* (c.259C>T); questo codifica una subunità transmembrana del recettore dell'integrina essenziale nella segnalazione tra le cellule ed il loro microambiente. Recentemente per la prima volta è stato descritto un fenotipo complesso, in pazienti con mutazione in omozigosi a carico del gene

ITGA3^{91,92}, caratterizzato da distruzione della membrana basale e compromissione della funzione di barriera, a livello renale, polmonare e della cute. In tutti i pazienti inoltre è presente una grave SNSR. Sebbene nel caso in oggetto non siano state riportate informazioni cliniche relative ai genitori eterozigoti, questo assetto genomico potrebbe essere associato con un fenotipo intermedio (con esclusiva estrinsecazione renale). In letteratura infatti ci sono molti esempi di mutazioni che in omozigosi danno fenotipi molto gravi, mentre in eterozigosi segni clinici più lievi della stessa malattia.^{121,122}

Le stesse considerazioni possono essere effettuate anche per il caso 10, dove abbiamo identificato una mutazione missenso nel gene *MYOIE* (c.2597A>G). Il bambino presenta una C1qN con un quadro istopatologico di glomerulopatia *collapsing*, un'associazione che è stata raramente descritta^{119,120}. Sebbene la mutazione non sia causativa di *per se*, potrebbe contribuire all'instaurarsi di un fenotipo aggressivo e alla perdita della risposta al trattamento del paziente con immunosoppressori.

Nel caso 11 abbiamo identificato una nuova variante nel gene *PLCE1* (c.3197A>G); questo bambino ha avuto un esordio precoce della SNSR, a due anni, con quadro istopatologico di MCD e rapida progressione verso l'ESRD. Il gene *PLCE1* codifica per una proteina che appartiene alla famiglia delle fosfolipasi che catalizza nei podociti l'idrolisi del Fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2), in inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo.¹²³ Mutazioni in omozigosi, eterozigosi composta e eterozigosi sono state identificate in circa il 33% di soggetti con sclerosi mesangiale diffusa e nell' 8% di casi GSFS, in assenza di mutazioni a carico di *NPHS2*. In questi soggetti non è stata osservata una chiara correlazione genotipo-fenotipo; sono state infatti identificate sia mutazioni troncanti che missenso che hanno determinato un'evoluzione della malattia comparabile. Sorprendentemente soggetti sani e non correlati presentano mutazioni in omozigosi identificate nelle loro rispettive famiglie affette¹²⁴⁻¹²⁶. Molto probabilmente, l'effetto di non penetranza, visto in soggetti asintomatici, ma portatori di mutazioni a carico di *PLCE1*, è dovuto ad una compensazione esercitata da altri membri della famiglia delle fosfolipasi-C¹²² o più probabilmente a fattori ambientali che interagiscono con la progressione della malattia. Nel caso 12 sorprendentemente, in relazione all'età del paziente abbiamo identificato una variante *de novo* in *ACTN4* (c.782C>A). Mutazioni a carico di questo gene, con eredità autosomica dominante, possono causare GSFS che tipicamente si manifesta durante l'età adulta^{71,72}; fino ad oggi un solo studio ha descritto una famiglia con due fratelli con GSFS che hanno manifestato sindrome nefrosica durante la prima infanzia.¹²⁷ Nel nostro paziente la SN è esordita all'età di 7 anni e mezzo, e si è mostrata

sin dall'inizio resistente a terapia con steroidi e ad altri trattamenti immunosoppressivi. La progressione verso l'ESRD è stata rapida, e ad un anno e mezzo dalla diagnosi il bambino è stato costretto a ricorrere a trattamento dialitico.

Nel caso 14 abbiamo identificato una mutazione nel gene *PTPRO* (c.2279G>A), che codifica una proteina simil recettore protein tirosin fosfasi appartenente alla famiglia del sottotipo R3. L'importanza di *PTPRO* nella regolazione della pressione e permeabilità glomerulare è stata già dimostrata in base al fenotipo del modello murino *knockout* e in studi basati sull'utilizzo di anticorpi neutralizzanti la proteina¹²⁸. Inoltre, mutazioni in assetto omozigote, a carico di questo gene, sono state associate a sindrome nefrosica con esordio durante la fanciullezza, anche se solo in due famiglie consanguinee. In base ai nostri dati possiamo supporre che anche mutazioni in assetto eterozigote possono essere associate a quadri di SNSR.

Infine abbiamo identificato nel caso 13 una nuova mutazione in assetto eterozigote nel gene *LMX1B* (c.833C>T). Mutazioni a carico di questo gene causano la sindrome di Nail-patella (NPS), una malattia pleiotropica, autosomica dominante nella quale una delle più serie manifestazioni è il danno renale, che è presente in più del 40% dei soggetti affetti.¹²⁹ Come descritto in letteratura, parenti d'individui affetti apparentemente sani o con manifestazioni cliniche molto sfumate, possono sfuggire alla diagnosi per generazioni, determinando quindi tassi molto bassi di accertamento dei casi. Il classico quadro clinico è caratterizzato da displasia delle strutture derivanti dal mesenchima dorsale: assenza o ipoplasia delle unghie delle mani e piedi; assenza o ipoplasia delle rotule; displasia del gomito che spesso comporta una sublussazione posteriore della testa radiale ed iliaca. Sebbene i corni iliaci siano patognomonic della NPS, non sono tuttavia presenti in tutti i soggetti affetti.¹³⁰ La nefropatia nella NPS è caratterizzata da un'estrema variabilità fenotipica; la maggior parte (90–95%) di soggetti affetti hanno una lenta e progressiva perdita della funzionalità renale con l'età, approssimativamente il doppio del valore rilevato in soggetti sani durante l'invecchiamento. Questo è probabilmente dovuto a un progressivo ispessimento e disorganizzazione della membrana di filtrazione glomerulare, che determina una diminuzione della permeabilità idraulica della parete del capillare glomerulare.¹³⁰ Una piccola parte di pazienti (5–10%) presenta, invece, valori di proteinuria più elevati e tende ad avere un progressivo, anche se variabile, percorso verso l'ESRD.

Il padre del nostro paziente, che ha la stessa mutazione presenta microematuria persistente ma senza altri segni clinci. Il bambino, dopo un'accurata osservazione clinica, ha mostrato l'assenza della lunula in tutte le unghie delle mani e assenza del nucleo di ossificazione del

radio prossimale bilateralmente, fenotipo che fino ad oggi non è mai stato descritto in associazione a NPS, ma che chiaramente appare anormale.

Nel caso 15 abbiamo individuato due mutazioni sinonime nei geni *PODXL* (c.690C>A) e *PLCE1* (c.2599G>C). Sebbene queste due varianti non siano considerate patogenetiche sulla base dei criteri utilizzati in questo lavoro, molti studi riportati in letteratura suggeriscono che anche le mutazioni sinonime possano essere patogenetiche determinando *splicing* aberranti dell'mRNA, alterazioni della stabilità dell'mRNA e quindi dell'espressione proteica.¹³¹⁻¹³⁴ Non possiamo così escludere completamente il ruolo causativo di queste varianti nell'insorgenza della SNSR nel bambino.

L'utilizzo della tecnologia NGS, in questo studio ha quindi consentito l'identificazione di mutazioni causative o potenzialmente patogenetiche nel 67% dei pazienti analizzati. Inoltre abbiamo identificato 6 nuove varianti in geni che raramente sono associati a SNSR nei bambini.

In seguito, abbiamo ricercato correlazioni tra il genotipo del paziente e il fenotipo clinico, la risposta alla terapia farmacologica ed il quadro istopatologico della biopsia renale.

L'analisi retrospettiva dei dati anamnestici ci suggerisce che non è possibile stabilire correlazioni tra il fenotipo clinico-patologico e presenza o tipo di mutazione; i pazienti risultati portatori di mutazioni non presentano infatti né un'età d'insorgenza più precoce né un fenotipo clinico-laboratoristico diverso rispetto a quelli negativi allo *screening*, mentre è stato possibile stabilire una correlazione tra il genotipo e la risposta alla terapia farmacologica.

Dodici dei pazienti inclusi nello studio sono stati trattati con farmaci immunosoppressori, e la risposta a questi è stata riscontrata solo in 3 pazienti, nessuno dei quali è risultato affetto da mutazione a carico dei geni analizzati. Quattordici pazienti sono stati inoltre trattati con inibitori RAS, sia in associazione ad immunosoppressori che non: una risposta, pur quantitativamente diversa, al farmaco è stata documentata in 8 dei pazienti trattati, 5 dei quali mutati, mentre 6 non hanno ottenuto alcun miglioramento. E' interessante, tuttavia sottolineare, come tra i bambini che non hanno risposto siano compresi 4 che hanno mostrato rapida evoluzione verso ESRD e i 2 con mutazioni severe nel gene della podocina. Dato ancor più interessante, se si considera l'*outcome* finale, nel gruppo dei pazienti che hanno ottenuto una remissione, sia questa parziale o completa, 5 sono risultati mutati e 4 no. Tra questi ultimi, 3 hanno mostrato una risposta significativa all'immunosoppressore, mentre i 5 pazienti portatori di mutazione hanno ottenuto una remissione parziale o completa quando trattati con ACE-Is e sartanici.

Infine, in 14 dei 15 pazienti è stato possibile allineare i dati genetici con il quadro biotico. Il *pattern* istologico più frequente è stato quello di GSFS, in 9 casi (60%), in 4 pazienti (26,7%) è stato riscontrato invece MCD ed in uno MN; non è stata tuttavia evidenziata alcuna correlazione tra diagnosi istologica e presenza di mutazioni.

Concludendo, in pazienti affetti da SNSR, una risposta negativa al nostro *screening*, tramite NGS, predice in maniera robusta la risposta agli immunosoppressori, a prescindere dal quadro biotico, e ci impone un trattamento immediato con questi farmaci. Il test genetico con NGS risulta, quindi, uno strumento indispensabile per stabilire approcci terapeutici corretti (terapia immunosoppressiva, antiproteinurica) nei pazienti resistenti ai corticosteroidi e per l'identificazione di casi sfumati di sindromi complesse.

La tecnologia NGS consente ad oggi di analizzare l'intero genoma di un paziente, in tempi e con costi sostenibili. Quindi per le attuali conoscenze e, come punto di partenza, crediamo che il sequenziamento dell'esoma, cioè solo delle porzioni codificanti, possa essere la strada da seguire per quei casi risultati negativi al *Targeted resequencing* di 45 geni podocitari. Il sequenziamento dell'esoma ha, ad esempio, recentemente permesso di identificare in due fratelli figli di genitori consanguinei affetti da una proteinuria intermittente, una mutazione omozigote *frameshift* nel gene *CUBN*, che codifica per la cubulina. Mutazioni in questo gene causano una forma ereditaria di anemia megaloblastica associata a deficit di vitamina B12 e proteinuria nel 50% dei casi.¹³⁵

Inoltre, il nostro futuro obiettivo sarà quello di ampliare la coorte di pazienti analizzati ed utilizzare la tecnologia Next Generation (in particolare *Targeted resequencing*) come strumento diagnostico precoce. Questo permetterà di effettuare nei bambini con SN non responsiva alla terapia steroidea, una diagnosi genetica rapida e accurata ed una scelta corretta del trattamento da adottare, riducendo così gli effetti collaterali di farmaci inappropriati ed inefficaci.

Bibliografia

1. Patrakka J, Tryggvason K. (2010). Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 21;396(1):164-9.
2. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. (2008). Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88(2):451-87.
3. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M. (2003) Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med.* 348(25):2543-56.
4. Zenker M, Aigner T, Wendler O. (2004). Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet.* 13(21):2625-32.
5. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83(1):253-307.
6. Jefferson JA, Alpers CE, Shankland SJ. (2011). Podocyte Biology for the Bedside. *Am J Kidney Dis.*
7. Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL. (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development.* 122(11):3537-47.
8. Sachs N, Kreft M, van den Bergh Weerman MA. (2006). Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J Cell Biol.* 175(1):33-9.
9. Nielsen JS, McNagny KM. (2009). The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol.* 20(8):1669-76.
10. Michaud JL, Lemieux LI, Dubé M. (2000). Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J Am Soc Nephrol.* 14(5):1200-11.
11. Asanuma K, Kim K, Oh J. (2005). Synaptopodin regulates the actin- bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest.* 115(5):1188-98.
12. Rodewald R, Karnovsky MJ. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol.* 60(2):423-33.
13. Patrakka J, Tryggvason K. (2009). New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nat Rev Nephrol.* 5(8):463-8.
14. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1(4):575-82.

15. Patrakka J, Tryggvason K. (2007). Nephrin—a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med.* 13(9):396-403.
16. Boute N, Gribouval O, Roselli S. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 24(4):349-54.
17. Schwarz K, Simons M, Reiser J. (2001). Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest.* 108(11):1621-9.
18. Shih NY, Li J, Karpitskii V. (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science.* 286(5438):312-5.
19. Barletta GM, Kovari IA, Verma RK. (2003). Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem.* 278(21):19266-71.
20. Ciani L, Patel A, Allen ND. (2003) Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol.* 3(10):3575-82.
21. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med.* 354(13):1387-401.
22. Reiser J, Polu KR, Möller CC. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 37(7):739-44.
23. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science.* 308(5729):1801-4.
24. Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A. (2010). Targeting podocyte-associated diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 62(14):1325-36.
25. Zenker M, Machuca E, Antignac C. (2009). Genetics of nephrotic syndrome: new insights into molecules acting at the glomerular filtration barrier. *J Mol Med (Berl).* 87(9):849-57.
26. Löwik MM, Groenen PJ, Levtchenko EN. (2009). Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review. *Eur J Pediatr.* 168(11):1291-304.
27. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. (2007). A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2(3):529-42.
28. Kriz W. (2003). The pathogenesis of 'classic' focal segmental

- glomerulosclerosis-lessons from rat models. *Nephrol Dial Transplant*. 18 Suppl 6:vi39-44.
29. Ronconi E, Mazzinghi B, Sagrinati C. (2009). Ruolo del danno podocitario nella patogenesi della glomerulosclerosi e possibili meccanismi di riparazione. *G Ital Nefrol*. 26(6):660-9.
30. Gbadegesin R, Lavin P, Foreman J. (2011). Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update. *Pediatr Nephrol*. 26(7):1001-15.
31. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE. (2005). Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol*. 16(10):2941-52.
32. International Study on Kidney Disease in Children (1978). Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the international study on kidney disease in children. *Kidney Int* 13:159– 65
33. Mekahli D, Liutkus A, Ranchin B. (2009). Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study. *Pediatr Nephrol*. 24(8):1525-32.
34. Bruneau S, Dantal J. (2009). New insights into the pathophysiology of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Immunol*. 133(1):13-21.
35. Eddy AA, Symons JM. (2003). Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 362(9384):629-39.
36. Schachter AD, Harmon WE. (2001). Single-center analysis of early recurrence of nephrotic syndrome following renal transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 5(6):406-9.
37. Citak A, Emre S, Sâirin A. (2000). Hemostatic problems and thromboembolic complications in nephrotic children. *Pediatr Nephrol*. 14(2):138-42.
38. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN. (2007). Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1 and LAMB2) *Pediatrics*. 119(4):e907-19.
39. Machuca E, Benoit G, Antignac C. (2009). Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet*. 18(R2):R185-94.
40. Löwik M, Levtchenko E, Westra D. (2008). Bigenic heterozygosity and the development of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 10:3146-51

41. Quaggin SE. (2002) Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation. *Microsc Res Tech.* 57(4):208-11.
42. Rothenpieler UW, Dressler GR. (1993). Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development.* 119(3):711-20.
43. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF. (1995). Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development.* 121(3):867-75.
44. Chugh SS. (2007). Transcriptional regulation of podocyte disease. *Transl Res.* 149(5):237-42
45. Call KM, Glaser T, Ito CY. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 60(3):509-20.
46. Niaudet P, Gubler MC. (2006). WT1 and glomerular diseases. *Pediatr Nephrol.* 21(11):1653-60.
47. Mucha B, Ozaltin F, Hinkes BG (2006). Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res.* 59:325-331
48. Barboux S, Niaudet P, Gubler MC. (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet.* 17(4):467-70.
49. Palmer RE, Kotsianti A, Cadman B. (2001). WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr Biol.* 11(22):1805-9.
50. Wagner N, Wagner KD, Xing Y. (2004). The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol.* 15(12):3044-51.
51. Yang Y, Jeanpierre C, Dressler GR. (1999). WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *Am J Pathol.* 154(1):181-92.
52. Srichai MB, Konieczkowski M, Padiyar A. (2004). A WT1 co-regulator controls podocyte phenotype by shuttling between adhesion structures and nucleus. *J Biol Chem.* 279(14):14398-408.
53. Green LM, Wagner KJ, Campbell HA. (2009). Dynamic interaction between WT1 and BASP1 in transcriptional regulation during differentiation. *Nucleic Acids Res.* 37(2):431-40.
54. Dreyer SD, Zhou G, Baldini A. (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet.* 19(1):47-

- 50.
55. Del Pozo E, Lapp H. (1970). Ultrastructure of the kidney in the nephropathy of the nail-patella syndrome. *Am J Clin Pathol.* 54(6):845-51.
56. Miner JH, Morello R, Andrews KL. (2002). Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest.* 109(8):1065-72.
57. Rohr C, Prestel J, Heidet L. (2002). The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes. *J Clin Invest.* 109(8):1073-82
58. Heidet L, Bongers EM, Sich M. (2003). In vivo expression of putative LMX1B targets in nail-patella syndrome kidneys. *Am J Pathol.* 163(1):145-55
59. Patrakka J, Ruotsalainen V, Reponen P. (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.
60. Philippe A, Nevo F, Esquivel EL. (2008). Nephrin mutations can cause childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 19(10):1871-8
61. Santín S, García-Maset R, Ruíz P. (2009). Nephrin mutations cause childhood- and adult-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 76(12):1268-76
62. Laakkonen H, Lönnqvist T, Uusimaa J. (2006). Muscular dystonia and athetosis in six patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1). *Pediatr Nephrol.* 21(2):182-9.
63. Roselli S, Moutkine I, Gribouval O. (2004). Plasma membrane targeting of podocin through the classical exocytic pathway: effect of NPHS2 mutations. *Traffic.* 5(1):37-44.
64. Machuca E, Hummel A, Nevo F. (2009). Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int.* 75(7):727-35.
65. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC. (2002). NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest.* 110(11):1659-66.
66. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF. (2004). NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int.* 65(3):1026-30.
67. Kim JM, Wu H, Green G. (2003). CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science.* 300(5623):1298-300.

68. Löwik MM, Groenen PJ, Pronk I. (2007). Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation. *Kidney Int.* 72(10):1198-203.
69. Dryer SE, Reiser J. (2010). TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(4):F689-701.
70. Reiser J, Polu KR, Möller CC. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 37(7):739-44.
71. Kaplan JM, Kim SH, North KN. (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 24(3):251-6.
72. Weins A, Kenlan P, Herbert S. (2005). Mutational and Biological Analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 16(12):3694-701.
73. Winkler CA, Nelson G, Oleksyk TK. (2010). Genetics of focal segmental glomerulosclerosis and human immunodeficiency virus-associated collapsing glomerulopathy: the role of MYH9 genetic variation. *Semin Nephrol.* 30(2):111-25.
74. Kopp JB, Winkler CA, Nelson GW. (2010). MYH9 genetic variants associated with glomerular disease: what is the role for genetic testing? *Semin Nephrol.* Jul;30(4):409-17.
75. Kopp JB, Smith MW, Nelson GW. (2008). MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 40(10):1175-84.
76. Saharon Rosset, Shay Tzur, Doron M. Behar. (2011). The population genetics of chronic kidney disease: insights from the MYH9–APOL1 locus. *Nat Rev Nephrol.* 7:313-26.
77. Brown EJ, Schlöndorff JS, Becker DJ. (2010). Mutations in the formin gene *INF2* cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 42(1):72-6.
78. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R. (2006). Positional cloning uncovers mutations in *PLCE1* responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet.* 38(12):1397-405.
79. Gbadegesin R, Hinkes BG, Hoskins BE. (2008). Mutations in *PLCE1* are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS). *Nephrol Dial Transplant.* 23(4):1291-7.
80. Boyer O, Benoit G, Gribouval O. (2010). Mutational analysis of the *PLCE1* gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *J Med Genet.* 47(7):445-52.
81. Balreira A, Gaspar P, Caiola D. (2008). A nonsense mutation in the *LIMP-2* gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Hum*

Mol Genet. 17(14):2238-43.

82. Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A. (2008). Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet.* 82(3):673-84.
83. Diomedi-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 18(10):2773-80.
84. López LC, Schuelke M, Quinzii CM. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet.* 79(6):1125-9.
85. Montini G, Malaventura C, Salviati L. (2008). Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med.* 360(26):2849-50.
86. Jansen JJ, Maassen JA, van der Woude FJ. (1997). Mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene associated with progressive kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 8(7):1118-24.
87. Matejas V, Hinkes B, Alkandari F. (2010). Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat.* 31(9):992-1002.
88. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ. (2011). Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet.* 89(1):139-47.
89. Mele C, Iatropoulos P, Donadelli R. (2011). MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med.* 365(4):295-306.
90. Chase SE, Encina CV, Stolzenburg LR. (2012). Podocyte-specific knockout of myosin 1e disrupts glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol.* 303(7): F1099-1106.
91. Has C, Spartà G, Kiritsi D. (2012). Integrin $\alpha 3$ mutations with kidney, lung, and skin disease. *N Engl J Med.* 366: 1508-14.
92. Nicolaou N, Margadant C, Kevelam SH. (2012). Gain of glycosylation in integrin $\alpha 3$ causes lung disease and nephrotic syndrome. *J Clin Invest.* DOI:10.1172/JCI64100.
93. Büscher AK, Kranz B, Büscher R. (2010). Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5(11):2075-84.
94. van Husen M, Kemper MJ. (2011). New therapies in steroid-sensitive and

- steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 26(6):881-92
95. Tune BM, Kirpekar R, Sibley RK. (1995). Intravenous methylprednisolone and oral alkylating agent therapy of prednisone-resistant pediatric focal segmental glomerulosclerosis: a long-term follow-up. *Clin Nephrol.* 43(2):84-8.
96. Gellermann J, Stefanidis CJ, Mitsioni A. (2010). Successful treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with WT1 mutations. *Pediatr Nephrol.* 25(7):1285-9.
97. Malina M, Cinek O, Janda J. (2009). Partial remission with cyclosporine A in a patient with nephrotic syndrome due to NPHS2 mutation. *Pediatr Nephrol.* 24(10):2051-3.
98. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S. (2008). The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med.* 14(9):931-8.
99. Schlöndorff J, Del Camino D, Carrasquillo R. (2009). TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296(3):C558-69.
100. Roberti I, Vyas S. (2010). Long-term outcome of children with steroid-resistant nephrotic syndrome treated with tacrolimus. *Pediatr Nephrol.* 25(6):1117-24.
101. Ziswiler R, Steinmann-Niggli K, Kappeler A. (1998). Mycophenolic acid: a new approach to the therapy of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 9(11):2055-66.
102. Cattran DC, Wang MM, Appel G. (2004). Mycophenolate mofetil in the treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol.* 62(6):405-11
103. Iijima K. (2011). Rituximab treatment for childhood refractory nephrotic syndrome. *Pediatr Int.* 53(5):617-21.
104. Plank C, Kalb V, Hinkes B. (2008). Cyclosporin A is superior to cyclophosphamide in children with steroid-resistant nephrotic syndrome—a randomized controlled multicentre trial by the Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie. *Pediatr Nephrol.* 23(9):1483-93.
105. Hodson EM, Willis NS, Craig JC. (2010). Interventions for idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome in children. *Cochrane Database Syst Rev* (11):CD003594.
106. Wühl E, Mehls O, Schaefer F. (2004). Antihypertensive and antiproteinuric efficacy of ramipril in children with chronic renal failure. *Kidney Int.* 66(2):768-76.
107. Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F. (2006). ACE inhibition reduces

glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease. *Kidney Int.* 69(7):1124-30.

108. Prodromidi EI, Poulosom R, Jeffery R. (2006). Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells.* 24(11):2448-55.

109. Kunter U, Rong S, Boor P. (2007). Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol.* 18(6):1754-64.

110. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B. (2006). Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 17(9):2443-56.

111. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML. (2009). Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol.* 20(2):322-32.

112. Lasagni L, Romagnani P. (2010). Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly. *J Am Soc Nephrol.* 21(10):1612-9.

113. Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B. (2011). Clinical Utility of Genetic Testing in Children and Adults with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 6: 1139-48.

114. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem.* 55(4):641-58.

115. Oleggini R, Bertelli R, Di Donato A. (2006). Rare functional variants of podocin (NPHS2) promoter in patients with nephrotic syndrome. *Gene Expr.* 13: 59-66.

116. Boute N, Gribouval O, Roselli S. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 24(4):349-54.

117. Caridi G, Bertelli R, Carrea A. (2001). Prevalence, genetics, and clinical features of patients carrying podocin mutations in steroid-resistant nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 12(12):2742-6.

118. Berdeli A, Mir S, Yavascan O. (2007). NPHS2 (podocin) mutations in Turkish children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 22(12):2031-40.

119. Gulati A, Sharma A, Hari P. (2008). Idiopathic collapsing glomerulopathy in children. *Clin Exp Nephrol.* 12(5): 348-53

120. Reeves-Daniel AM, Iskandar SS, Bowden DW. (2010). Is collapsing C1q nephropathy another MYH9-associated kidney disease? A case report. *Am J Kidney Dis.* 55(5): e21-24.

121. Smith SB, Qu HQ, Taleb N. (2010). Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature*. 463: 775-80.
122. Hughes AE, Meng W, Lotery AJ. (2012). A novel GUCY2D mutation, V933A, causes central areolar choroidal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53:4748-53.
123. Wing MR, Bourdon DM, Harden TK. (2003). PLC-epsilon: a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G alpha beta gamma-mediated signaling. *Mol Interv*. 3: 273-80.
124. Gbadegesin R, Hinkes BG, Hoskins BE. (2008). Mutations in PLCE1 are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS). *Nephrol Dial Transplant*. 23: 1291-97
125. Boyer O, Benoit G, Gribouval O. (2010). Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *J Med Genet*. 47: 445-52.
126. Benoit G, Machuca E, Heidet L. (2010). Hereditary kidney diseases: highlighting the importance of classical Mendelian phenotypes. *Ann NY Acad Sci*. 1214: 83-98.
127. Choi HJ, Lee BH, Cho HY. (2008). Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an ACTN4 mutation and paternal germline mosaicism. *Am J Kidney Dis*. 51(5):834-8.
128. Charba DS, Wiggins RC, Goyal M. (2009). Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb)). *Am J Physiol Renal Physiol*. 297: F138-F144.40.
129. Sweeney E, Hoover-Fong JE, McIntosh I. (1993). Nail-Patella Syndrome. In Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews*TM [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
130. Kevin VL. (2009). Kidney disease in nail–patella syndrome. *Pediatr Nephrol*. 24: 2345-54.
131. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. (2009). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 12: 683-91.
132. Plotkin JB, Kudla G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet*. 12(1):32-42.
133. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE. (2006). Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 314(5807):1930-3.
134. Czech A, Fedyunin I, Zhang G. (2010). Silent mutations in sight: co- variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations. *Mol Biosyst*.

6(10):1767-72.

135. Ovunc B, Otto EA, Vega-Warner V. (2011). Exome sequencing reveals cubilin mutation as a single-gene cause of proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 22(10):1815-20.