

22. Owda A, Elbwairis H, Narra S et al. Secondary hyperparathyroidism in chronic hemodialysis patients: prevalence and race. *Ren Fail* 2003; 25: 595–602.

23. Pecovnik Balon B, Hojs R, Zavrtnik A, Kos M. Bone mineral density in patients beginning hemodialysis treatment. *Am J Nephrol* 2002; 22 (1): 14–17.

24. Silver J, Kilav R, Naveb-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol* 2002; 283: 367–376.

25. Slatopolsky E, Gonzalez E, Martin K. Pathogenesis and treatment of renal osteodystrophy. *Blood Purif* 2003; 21: 318–326.

26. Taal M.W, Roe S, Masud T. et al. Total hip bone mass predicts survival in chronic haemodialysis patients. *Kidney Int* 2003; 63: 1116–1120.

27. Urena P, Bernard-Poenaru O, Ostertag A. et al. Bone mineral density, biochemical markers and skeletal fractures in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2325–2331.

Скрининг мутаций в гене подоцина (*NPHS2*) у детей со спорадическим стероид-резистентным нефротическим синдромом

Л.С. Приходина¹, Н.В. Полтавец², Н.М. Галеева², Е.В. Заклязьминская², А.В. Поляков², В.В. Длин¹, М.С. Игнатова¹

¹ ФГУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии Росмедтехнологий»,

² ГУ «Медико-генетический научный центр РАМН», г. Москва

Screening for podocin gene (*NPHS2*) mutations in children with sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome

L.S. Prikhodina, N.V. Poltavets, N.M. Galeeva, E.V. Zaklyazminskaya, A.V. Polykov, V.V. Dlin, M.S. Ignatova

Ключевые слова: дети, стероид-резистентный нефротический синдром, ген подоцина, мутации.

В представленной статье приводятся результаты поиска мутаций в гене подоцина (*NPHS2*) у 50 детей со спорадическим стероид-резистентным нефротическим синдромом из различных регионов России и 50 детей группы контроля (популяционная выборка). Впервые выявлена ранее не описанная гетерозиготная нонсенс-мутация с.259 G>T (*p.87Glu>X*) в экзоне 1 *NPHS2* гена у одного ребенка со стероид-резистентным нефротическим синдромом и фокально-сегментарным гломерулосклерозом. Установлена единственная, ранее не описанная, нуклеотидная замена A>G в интроне 7 (с.872+7A>G) гена *NPHS2* у трех пациентов со СРНС и 5 детей контрольной группы (6 и 10% соответственно, $p > 0,05$). Полученные результаты исследования свидетельствуют о низкой частоте мутаций в гене *NPHS2* у детей со спорадическим СРНС. Данный факт свидетельствует в пользу генетической гетерогенности СРНС у российских детей.

This article presents the results of identification of mutations in the podocin gene (*NPHS2*) in 50 Russian children with sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) and in the control group of 50 healthy children. One novel heterozygous nonsense mutation of c.259 G>T (*p.87Glu>X*) was identified in the exon 1 of the *NPHS2* gene in a SRNS child with FSGS. We also found one kind of single nucleotide polymorphism c.872+7A>G in the intron 7 of the *NPHS2* gene in 3/50 SRNS patients and in 5/50 children in control (6% and 10%, respectively, $p > 0,05$). Our results indicate that mutation-detected rate in the *NPHS2* gene in Russian children with sporadic SRNS was low. Preliminary data suggest that there is a genetic heterogeneity of SRNS in Russian children.

Спорадический нефротический синдром (НС) встречается среди детей в Европе с частотой 2:100 000 [8, 20, 22]. Стероид-резистентный НС (СРНС) наблюдается у 10–20% детей с НС и характеризуется прогрессирующим течением с формированием хронической

почечной недостаточности (ХПН) более чем у 50% пациентов [3, 7, 17].

Исследования в области молекулярной генетики показали генетическую гетерогенность СРНС, обусловленную рядом мутаций в различных генах, кодирую-

Адрес для переписки: г. Москва, 125412, ул. Талдомская, д. 2. ФГУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии Росздрава». Приходина Л.С.

Телефон: (495) 483-36-53

E-mail: prikhodina@aport2000.ru

Генетическая гетерогенность СРНС

Тип наследования	Тип НС	Манифестация НС	Локус (№ ОМIM)	Ген	Продукт гена	Ссылка
Аутосомно-доминантный	ФСГС1	Взрослые	19q13 (№ 604638)	ACTN4	α-актинин-4	Kaplan J.M., 2000
	ФСГС2	Взрослые	11q21–q22 (№ 603652)	TRPC6	Неселективный катионный трансмембранный канал	Winn M.P., 2005
	ФСГС3	Взрослые	6p12 (№ 604241)	CD2AP	CD2-ассоциированный протеин	Kim J.M., 2003
Аутосомно-рецессивный	Врожденный НС финского типа	Врожденный	19q13 (№ 602716)	NPHS1	Нефрин	Kestila M., 1998
	СРНС	Дети	1q25–31 (№ 604766)	NPHS2	Подоцин	Boute N., 2000

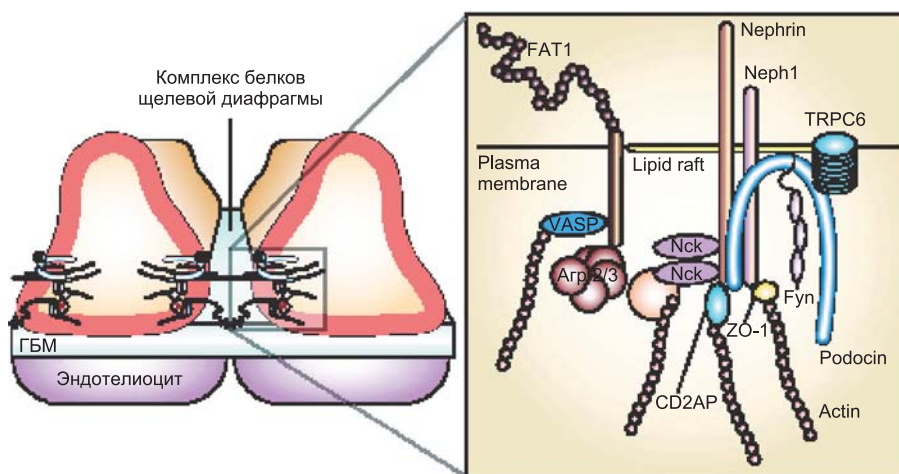


Рис. 1. Структура комплекса протеинов щелевой диафрагмы [Johnstone D.B., 2006]

В настоящее время известно более 30 различных мутаций в гене подоцина у больных с семейным и спорадическим СРНС [6, 13, 25]. Большинство из них представлено миссенс-мутациями (57,7%), а также мутациями со сдвигом рамки считывания (frame-shifting) (26,9%), делециями без сдвига рамки считывания (in-frame) (3,9%), нонсенс-мутациями (7,7%) и мутациями сплайсинга (3,9%) (рис. 2).

Отмечено, что характер мутаций в гене подоцина связан с возрастом манифестации СРНС [25]. У больных с мутациями со сдвигом рамки считывания выявлен более ранний дебют НС. Мутация R138Q в гомозиготном состоянии ассоциирована с манифестацией заболевания до 5-летнего возраста. Более поздний дебют СРНС отмечен у больных с V180M- и R238S-мутациями в гене подоцина.

щих белки, которые участвуют в образовании структур и функции фильтрационного барьера (табл. 1).

Пристальное внимание исследователей в последнее время обращено на изучение гена подоцина (*NPHS2*) (ОМIM □ 604766), который локализован на длинном плече 1-й хромосомы в регионе 1q25–q31. Ген *NPHS2* включает 8 экзонов и кодирует мембранный белок (M = 42 кДа), состоящий из 383 аминокислотных остатков. Подоцин экспрессируется исключительно в подоцитах и взаимодействует с рядом других белков (нефрин, CD2AP, TRPC6, α-actinin 4), участвующих в обеспечении структурной целостности щелевой диафрагмы и селективной проницаемости гломерулярной базальной мембраны (ГБМ) (рис. 1) [11, 23].

Впервые мутации в гене подоцина были выявлены у больных с семейным аутосомно-рецессивным СРНС, который манифестировал в раннем детстве и гистологически был представлен фокально-сегментарным гломерулосклерозом (ФСГС) [2]. В последующем мутации в гене *NPHS2* были идентифицированы при спорадических случаях СРНС [4, 5, 13] и у пациентов с поздним дебютом ФСГС [24].

Идентификация двух патологических мутаций в гене *NPHS2*, особенно сдвига рамки считывания и миссенс-мутации R138Q, является предиктором тяжелого течения СРНС с ранней манифестацией и низкой вероятностью рецидива заболевания после трансплантации почки. При наличии одной патологической

считывания выявлен более ранний дебют НС. Мутация R138Q в гомозиготном состоянии ассоциирована с манифестацией заболевания до 5-летнего возраста. Более поздний дебют СРНС отмечен у больных с V180M- и R238S-мутациями в гене подоцина.

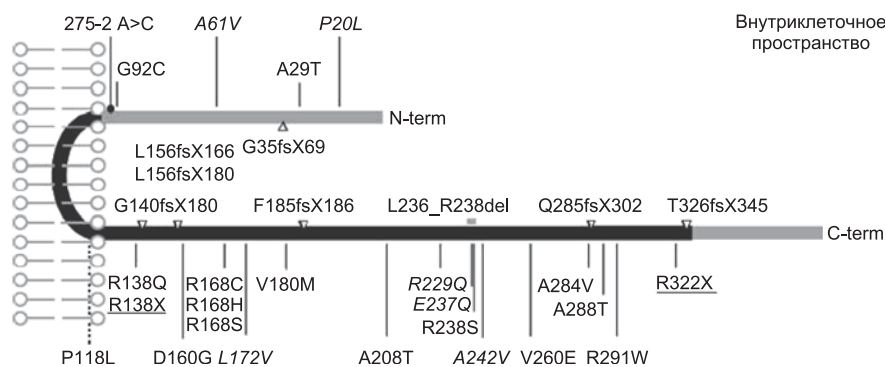


Рис. 2. Структура подоцина и распределение мутаций в гене *NPHS2* [Weber S., 2004]. Условные обозначения: нонсенс-мутации подчеркнуты, небольшие инсерции-делеции отмечены стрелками, полиморфизмы выделены курсивом

кой мутации в гене *NPHS2* наблюдается более позднее начало заболевания и выше вероятность рецидива патологии после трансплантации. Менее выраженные фенотипы были выявлены в семейных случаях ФСГС с патологической мутацией в одном аллеле и полиморфизмом R229Q в другом [24].

Выраженность СРНС может быть модулирована присутствием дополнительных мутаций в генах, кодирующих белки, которые взаимодействуют с подоцином. Описаны случаи ассоциаций *NPHS2*-мутаций с *NPHS1*-вариантами [5, 16] и гетерозиготных *de novo* сплайс-мутаций в *NPHS1* и гомозиготной *NPHS2* R138Q мутацией.

В случаях спорадического СРНС идентификация мутации подоцина имеет огромное клиническое значение для подтверждения диагноза до назначения иммуносупрессивной терапии. При выявлении мутации *NPHS2* у больного со СРНС, как правило, имеет место резистентность к иммуносупрессивной терапии, что исключает использование иммуносупрессантов, и отсутствие возврата заболевания после трансплантации почки у большинства больных. По данным R.G. Ruf (2004), возврат ФСГС в почечном трансплантате отмечался у 35% больных без мутации подоцина и лишь у 8% пациентов с мутациями в этом гене [21]. По данным S. Weber (2004), возврат СРНС и ФСГС после трансплантации маловероятен у больных с двумя *NPHS2*-мутациями и составляет только 3,1%. Однако проведенные исследования R. Bertelli (2003) показали, что у 38,5% с гомозиготными и гетерозиготными мутациями *NPHS2* отмечен возврат ФСГС после трансплантации почки, что согласуется с наблюдениями при приобретенном ФСГС при СРНС (37,5%) [1, 18].

В настоящее время предполагают, что мутации или полиморфизм гена подоцина могут играть роль в модулировании скорости прогрессирования заболевания почек до терминальной ХПН.

Целью исследования явилось определение частоты и характера мутаций в гене подоцина у российских детей со спорадическим СРНС для установления возможных клиничко-генетических взаимосвязей развития патологии.

Материалы и методы

Обследована группа детей ($n = 50$) со спорадическим СРНС в возрасте от 9 до 17 лет (26 мальчиков и 24 девочки, средний возраст – $11,9 \pm 0,7$ года) из различных регионов России. Средний возраст манифестации заболевания у обследованных больных составлял $8,8 \pm 0,7$ года. При гистологическом исследовании нефробиоптатов пациентов установлены следующие морфологические варианты гломерулонефрита (ГН): мезангиопролиферативный ГН ($n = 21$), мембрано-пролиферативный ГН ($n = 13$), ФСГС ($n = 13$) и мембранозная нефропатия ($n = 3$). Средняя длительность заболевания составляла $3,95 \pm 0,53$ года. У 15 из 50 пациентов (30%) манифестация СРНС отмечалась до 5-летнего возраста. Катамнестическое наблюдение за пациентами осуществлялось в течение $2,49 \pm 0,28$ года. За период наблюдения у 12 из 50 больных (24%) развилась ХПН (СКФ < 60 мл/мин/1,73 м²). В качестве группы контроля исследование изменений нуклео-

тидной последовательности гена *NPHS2* проводилось в выборке детей ($n = 50$), проживающих в различных регионах России.

Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови пациентов с СРНС и детей группы контроля осуществлялось с помощью набора реагентов DNA Prep 200 DIAtom™. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», Россия) с использованием Taq-полимеразы («Биомастер», Россия).

Проводилась амплификация всех 8 экзонов и областей экзон-интронных соединений гена подоцина. Дизайн праймеров был проведен в лаборатории ДНК диагностики ГУ МГНЦ РАМН с использованием базы данных GeneBank. Исследование образцов ДНК на наличие точковых мутаций в гене *NPHS2* осуществляли методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (Single Strand Conformation Polymorphism – SSCP). Последующее определение нуклеотидной последовательности образцов ДНК, в которых были выявлены изменения электрофоретической подвижности при SSCP-анализе, проводили методом прямого автоматического секвенирования продукта ПЦР, как с прямого, так и с обратного праймера методом Сенгера (ABI Prism 310, Applied Biosystems). С целью последующего поиска наиболее частой мутации R138Q был использован метод анализа полиморфизма длины рестрикторных фрагментов (ПДРФ-анализ).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования у одного пациента со спорадическим СРНС была выявлена ранее неописанная нонсенс-мутация *c.259 G>T (p.87Glu>X)* в экзоне 1 гена *NPHS2* в гетерозиготном состоянии (рис. 3). Мы предполагаем, что данная мутация реализуется через механизм нонсенс-опосредованной дегградации мутантной мРНК, содержащей преждевременный стоп-кодон. Раннее разрушение мутантного транскрипта ведет к тому, что в качестве матрицы для синтеза белка используется только нормальный аллель. В результате экспрессируется только нормальный белок, но в недостаточном количестве. Снижение количества нормального подоцина ведет к функциональной недостаточности белкового комплекса щелевой диафрагмы и, как следствие, нарушению процессов фильтрации в гломерулах.

У больного с мутацией *p.87Glu>X* наблюдалась ранняя манифестация СРНС и ФСГС (в возрасте

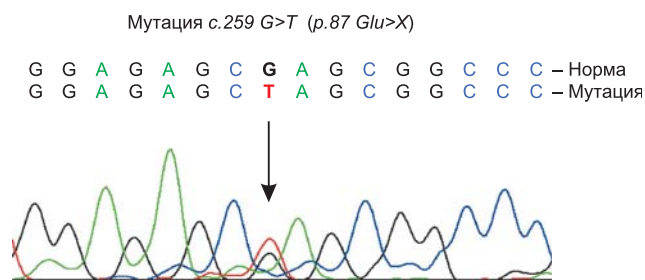


Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности гена *NPHS2*, фрагмент экзона 1

2 лет с повышением уровня креатинина в крови) с последующим прогрессирующим течением патологии и формированием терминальной ХПН в возрасте 4,5 года. После проведенной родственной трансплантации почки не отмечалось возврата ФСГС в трансплантате пациента при наблюдении в течение 1,5 года.

Роль гетерозиготных мутаций подоцина, ассоциированных с НС, недостаточно ясна в настоящее время, так как ФСГС, ассоциированный с мутациями *NPHS2*, представляет собой заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, что заставляет ожидать идентификации мутаций в обоих аллелях гена. Выявление только одной мутации в гене *NPHS2* может свидетельствовать о возможном наличии генетических изменений в других генах, кодирующих белки щелевой диафрагмы. В настоящее время в литературе имеются описания дигенного наследования нефротического синдрома, обусловленного 2 мутациями в разных генах – *NPHS1* и *NPHS2* [16, 19]. Также нельзя с уверенностью исключить, что во втором аллеле имеющаяся мутация не была выявлена в связи с локализацией в интронных или регуляторных областях гена, которые не были исследованы, или в связи с неполной информативностью использованных молекулярно-генетических методов.

В результате проведенного анализа кодирующей последовательности и прилегающих регуляторных областей гена *NPHS2* была выявлена не описанная ранее нуклеотидная замена А>G в интроне 7 (с.872+7А>G) изучаемого гена у трех пациентов с СРНС и 5 детей контрольной группы. Аллельная частота полиморфизма гена *NPHS2* достоверно не отличалась между группой пациентов с СРНС и контролем (6 и 10% соответственно, $p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии самостоятельного клинического значения выявленного генетического изменения.

Нами не было найдено ни одного из наиболее распространенных в Европе видов полиморфизма гена *NPHS2* – гетерозигот R229Q – среди обследованных групп детей. Аналогичные данные были представлены в исследовании S.M. Karle (2002) у 25 детей со спорадическим СРНС [13].

Полученные результаты исследования свидетельствуют о невысокой частоте мутаций в гене *NPHS2*, составляющей 2% у детей российской популяции со спорадическим СРНС.

Сходные данные были получены в работе Z. Yu (2005), где гетерозиготная миссенс-мутация L361P в 8-м экзоне гена подоцина была найдена только у одного из 23 детей со спорадическим СРНС и частота мутаций составляла 4,4% [27]. Из 172 пациентов европейской и северо-африканской популяции со спорадическим СРНС только у 10,5% выявлены мутации (гомозиготные и компаунд-гетерозиготные) в гене *NPHS2* [25].

В других популяциях мутации в гене *NPHS2* были идентифицированы у 20–30% пациентов со спорадическим СРНС и 46% больных с семейными случаями СРНС [4, 9, 13]. В работе R. Ruf (2004) у 26% больных с семейным СРНС установлены мутации в гене подоцина, при этом ни один пациент со стероид-чувствительным НС не имел данной мутации [21].

Возможными причинами низкой частоты мутаций в гене *NPHS2* у обследованных российских детей со спорадическим СРНС могут рассматриваться как особенности популяционной выборки больных (с поздней манифестацией СРНС у большинства детей), так и небольшое количество пациентов, особенно с ФСГС. Данный факт может также рассматриваться в качестве подтверждения генетической гетерогенности СРНС у российских детей.

Скрининг на *NPHS2*-мутации при спорадическом СРНС, включавший 328 больных (264 ребенка и 64 взрослых), был недавно завершен в Италии, Германии и Турции [4–6, 13]. Мутации (гомозиготные или компаунд-гетерозиготные) в гене подоцина были выявлены у 14,6% больных. Основными клиническими особенностями спорадических случаев СРНС с гомозиготными или компаунд-гетерозиготными мутациями являлись: возраст появления протеинурии, преимущественно в первой декаде жизни; первичная стероидная резистентность и прогрессирование до ХПН. ФСГС был преимущественным морфологическим вариантом при СРНС. Пациенты с гетерозиготными мутациями имели, как правило, более благоприятное течение заболевания, и в ряде случаев отмечена чувствительность к стероидам и циклоспорину А [5].

Таким образом, низкая частота *NPHS2*-мутаций среди российских детей со спорадическим СРНС не позволяет в настоящее время установить возможные клинико-генетические взаимосвязи с развитием патологии. Данный факт указывает на необходимость дальнейшего исследования мутаций в гене подоцина в более многочисленной группе больных со спорадическим СРНС. Целесообразно продолжение дальнейшего исследования генетического профиля белков щелевой диафрагмы у детей с СРНС с целью совершенствования классификации заболевания и терапевтических подходов.

Литература

1. Bertelli R, Ginevri F, Caridi G. et al. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in patients with mutations of podocin. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 1314–1321.
2. Boue N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F. et al. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genet* 2000; 25: 125.
3. Cameron J.S., Turner D.R., Ogg C.S., Chantler C., Williams D.G. The long-term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* 1978; 10: 213–218.
4. Caridi G, Bertelli R, Carrea A. et al. Prevalence, genetics and clinical features of patients carrying podocin mutations in steroid-resistant non-familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2742–2746.
5. Caridi G, Bertelli R, Di Duca M. et al. Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (5): 1278–1286.
6. Caridi G, Bertelli R, Scolari F. et al. Podocin mutations in sporadic focal segmental glomerulosclerosis occurring in adulthood. *Kidney Int* 2003; 64: 365.
7. Cattran D.C., Rao P. Long-term outcome in children and adults with classic focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: 72–79.
8. Clark A.G., Barratt T.M. Steroid-responsive nephrotic syndrome. In Barratt T.M., Avner E.D., Harmon W.E. (eds) *Pediatr Nephrol*, 4th edn. Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, 1999: 731–747.

9. *Fuchsbuber A, Gribouval O, Ronner V* et al. Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 374–378.
10. *Gbiggeri G.M., Carraro M., Vincenti F.* Recurrent focal segmental glomerulosclerosis in the era of genetics of podocyte proteins: theory and therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1036–1040.
11. *Jobstone D.B., Holzman L.B.* Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nature Clinical Practice Nephrology* 2006; 2; 5: 271–283.
12. *Kaplan J.M., Kim S.H., North K.N., Rennke H.* et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genet* 2000; 24: 251–256.
13. *Karle S.M., Uetz B., Ronner V.* et al. Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 388–393.
14. *Kestila M., Lenkkeri U., Mannikko M., Lamerdin J.* et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molec Cell* 1998; 1: 575–582.
15. *Kim J.M., Wu H., Green G., Winkler C.A.* et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003; 300: 1298–1300.
16. *Koziell A., Grech V., Hussain S.* et al. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 379–388.
17. *Martinelli R., Okumura A.S., Pereira L.J., Rocha H.* Primary focal segmental glomerulosclerosis in children: prognostic factors. *Pediatr Nephrol* 2001; 16: 656–661.
18. *Niaudet P.* Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. In: *Niaudet P, Avner ED, Harmon WE*, eds. *Pediatric nephrology*. Philadelphia, Blackwell, 2004; 28: 557–573.
19. *Obeidova H., Merta M., Reiterova J.* et al. Genetic basis of nephrotic syndrome – review. *Prague Med Rep* 2006; 107 (1): 5–16.
20. *Rothenberg M.B., Heymann W.* The incidence of the nephrotic syndrome in children. *Pediatrics* 1957; 19: 446–452.
21. *Ruf R.G., Litschenberger A., Karle S.M.* et al. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 722.
22. *Schlesinger E.R., Sultz H.A., Mosber W.E., Feldman J.G.* The nephrotic syndrome: Its incidence and implications for the community. *Am J Dis Child* 1968; 116: 623–632.
23. *Schwarz K., Simons M., Reiser J.* et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108 (11): 1621–1629.
24. *Tsukaguchi H., Sudbakar A., Le T.C.* et al. NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002; 110: 1659–1666.
25. *Weber S., Gribouval O., Esquivel E.* et al. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004; 66 (2): 571–579.
26. *Winn M.P., Conlon P.J., Lynn K.L., Farrington M.K.* et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005; 308: 1801–1804.
27. *Yu Z., Ding J., Huang J.* et al. Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children. *Nephrol Dial Transplant* 2005 March 15; [Epub ahead of print].