



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: **Università degli Studi di Padova**

**Dipartimento di *Salute della Donna e del Bambino***

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE DELLA  
PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO: MALATTIE RARE; GENETICA, BIOLOGIA E BIOCHIMICA  
CICLO XXV

## **LE PODOCITOPATIE: ANALISI DI VARIANTI GENETICHE IN FORME FAMILIARI E SPORADICHE**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

**Supervisore:** Dott.ssa Luisa Murer

**Dottoranda:** Dott.ssa Elisa Benetti



## INDICE

Riassunto	pag. 5
<i>Summary</i>	pag. 6
Introduzione	pag. 7
Obiettivi	pag. 14
Pazienti e metodi	pag. 15
Risultati	pag. 18
Discussione	pag. 25
Conclusioni	pag. 33
Bibliografia	pag. 35
Figure e Tabelle	pag. 41



## RIASSUNTO

*Background e scopo.* I recenti avanzamenti delle metodologie nel campo della biologia molecolare hanno condotto all'identificazione di un numero crescente di geni associati alle glomerulopatie proteinuriche, ponendo al centro dell'attenzione il podocita e aprendo nuove prospettive nella conoscenza dei meccanismi patogenetici delle podocitopatie. Le podocitopatie rappresentano una condizione complessa, caratterizzata da un'ampia eterogeneità, pur essendo le manifestazioni cliniche relativamente omogenee. Sebbene lo sviluppo della glomerulopatia che determina la proteinuria non sia unicamente spiegato dalla presenza di un'anomalia genetica, una diagnosi di malattia genetica può risultare l'elemento di svolta nella definizione di un percorso terapeutico mirato (evitando farmaci inutili e potenzialmente dannose, come gli immunosoppressori) e di una prognosi anche a lungo termine (rischio di progressione ad insufficienza renale, probabilità di recidiva sul trapianto, necessità di terapie mirate post-trapianto, opportunità di eseguire un trapianto da donatore vivente).

*Pazienti e metodi.* In 40 bambini con podocitopatia sporadica o familiare, abbiamo eseguito un'analisi delle varianti genetiche sia tramite sequenziamento diretto dei geni più frequentemente associati alle podocitopatie (NPHS2, WT1, PLCE1, NPHS1) sia mediante *Next Generation Sequencing*, utilizzando una piattaforma comprendente 45 geni. Inoltre, sono state analizzate retrospettivamente e in senso prospettico le caratteristiche cliniche, il quadro istopatologico e l'*outcome*.

*Risultati.* Un'alterazione genomica è stata riscontrata in 20/40 pazienti (50%): 6/40 bambini (15%) presentavano un'alterazione del gene NPHS2 (associata in tutti i casi a quadro istologico di glomerulosclerosi focale e segmentale - FSGS); in 4/6 casi, la variazione di sequenza riscontrata era nuova. 11 pazienti (27.5%) presentavano una mutazione di WT1 (con istologia di FSGS in 6 e di sclerosi mesangiale diffusa – DMS - in 5); in 4/11 casi, la variazione di sequenza era nuova. 3 bambini presentavano delle nuove variazioni di sequenza del gene PLCE1 (con quadro istologico di FSGS in 2 e DMS in 1). Le alterazioni riscontrate si sono rivelate patogenetiche in 18/20 pazienti. L'analisi genetica è stata estesa ai genitori in 12/20 casi.

*Conclusioni.* L'elevata frequenza di mutazioni nella nostra casistica di bambini affetti da podocitopatia conferma la rilevanza dei difetti genetici nella patogenesi della podocitopatie, per cui un corretto iter diagnostico non può non prevedere uno screening genetico, almeno per i geni più frequentemente associati a proteinuria e sindrome nefrosica (in particolare, NPHS2, WT1 e PLCE1). Nella pratica clinica, la definizione eziologica della diagnosi permette un accurato *work up* del paziente (con ricadute dirette sulle scelte terapeutiche e la formulazione prognostica) e, di conseguenza, l'ottimizzazione delle risorse sanitarie.

## SUMMARY

*Background and aims.* The understanding of proteinuric glomerular diseases has greatly expanded in recent years, thanks to the advances in the field of molecular biology. An increased number of podocyte-expressed genes have been identified, placing glomerular epithelial cell (podocyte) at the centre of the disease mechanisms of podocitopathies. Podocitopathies include a variety of causes and histopathologic findings, despite similar clinical presentation. Even though the development of the glomerulopathy that leads to proteinuria may not only be explained by a genetic alteration, the identification of a genetic disease may be essential to define a patient-tailored therapy (aimed to avoid unnecessary and potentially detrimental drugs, as immunosuppressants) and long-term prognosis (progression to end stage renal disease, risk of post-transplantation recurrence and necessity of specific therapy, possibility of living-related transplantation).

*Patients and methods.* Genetic testing by direct sequencing of the genes more frequently associated with podocitopathies (NPHS2, WT1, PLCE1, NPHS1) and *Next Generation Sequencing* (including 46 genes) were carried out in 40 children affected by familial or sporadic podocitopathy. Clinical and histopathological features, as well as outcomes, were also retrospectively and prospectively analysed.

*Results.* A genomic alteration was found in 20/40 patients (50%): 6/40 children (15%) had a variation in NPHS2 gene (associated with focal segmental glomerulosclerosis - FSGS); in 4/6 cases, the detected sequence variant was novel. 11 patients (27.5%) carried a mutation in WT1 gene (associated with FSGS in 6 and with diffuse mesangial sclerosis – DMS - in 5 children); in 4/11 cases, the detected variation was novel. 3 children had novel sequence variations in PLCE1 gene (the histological picture was FSGS in 2 and DMS in 1). The detected alterations were found to be pathogenetic in 18/20 patients. Genetic analysis was extended to parents in 12/20 cases.

*Conclusions.* The high frequency of mutation in our series of children affected by podocitopathies confirms the importance of genetic alterations in the pathogenesis of these diseases. Therefore, a correct diagnostic pathway cannot exclude a genetic screening, at least for genes more frequently associated with proteinuria and nephrotic syndrome (namely, NPHS2, WT1 e PLCE1). In clinical practice, the ethiological diagnosis is essential to an accurate work up of the patient (with direct outcomes on therapeutic strategies and prognosis) and may contribute to the optimization of health resources.

## INTRODUZIONE

Il glomerulo è una struttura unica, costituita da un ciuffo di capillari altamente perfusi, circondato da cellule mesangiali. La barriera di filtrazione glomerulare è un'unità altamente specializzata, costituita da tre strati: l'endotelio fenestrato, la membrana basale glomerulare (GBM) ed i podociti. La GBM è particolarmente ricca in glicosaminoglicani, che le conferiscono una carica negativa, fondamentale per l'azione di repulsione delle proteine plasmatiche attraverso le forze elettrostatiche. I podociti sono le cellule epiteliali che ricoprono la superficie esterna della MBG. Essi sono cellule altamente differenziate e con un'architettura unica, costituita da un corpo principale, dei processi maggiori e dei prolungamenti basali, dotati di un apparato contrattile, la cui componente fondamentale è l'actina. I podociti originano dal blastema metanefrico durante lo sviluppo renale e sono le prime cellule distinguibili, formando uno strato discoidale di cellule epiteliali. Successivamente, durante i processi maturativi che prevedono la perdita della pluripotenza e della capacità proliferativa, i podociti sviluppano i loro prolungamenti basali, i pedicelli, che si interdigitano tra loro, formando pori di circa 40 nm di diametro e sono connessi da un particolare tipo di giunzione stretta, lo *slit diaphragm* (SD). Lo SD rappresenta la struttura centrale della barriera di filtrazione glomerulare. Alla permeabilità della barriera contribuiscono anche altri due strati: la superficie endoteliale e lo spazio subpodocitario (1-2). Il mantenimento dell'architettura della barriera di filtrazione è fondamentale per la sua integrità e per il suo funzionamento, per cui un'alterazione strutturale o funzionale ne determina una disfunzione, con conseguente perdita della permeabilità e sviluppo di proteinuria (1-2). La componente proteica principale dello SD è la nefrina, che, attraverso una struttura a cerniera ed un dominio extracellulare, interagisce con un'altra proteina di membrana, la podocina, e con la proteina adattatrice CD2AP (*CD2-associated protein*), per connettersi al citoscheletro podocitario. Un'altra proteina che colocalizza con la nefrina, la podocina e CD2AP è TRPC6 (*transient receptor potential cation channel, homolog 6*), un canale cationico non selettivo che regola l'omeostasi intracellulare del calcio, stabilizzando il complesso *network* funzionale dello SD. Altre proteine podocitarie, tra cui ACTN4 (alfa-actinina 4), INF2 (*inverted formin 2*) e LAMB2 (laminina beta 2), stabilizzano il citoscheletro ed ancorano il podocita alla GBM. Altre ancora, tra cui WT1 (Wilm's tumor 1) e PLCE1 (fosfolipasi C epsilon 1), sono coinvolte nei processi di *signaling* e differenziazione podocitaria (3).

Mutazioni nei geni codificanti per le suddette proteine determinano un'alterazione di questo complesso *network*, conducendo al fenomeno morfologico della fusione dei pedicelli, con perdita dello SD e sviluppo di proteinuria. A seconda della proteina mutata, il danno podocitario può essere determinato da un'alterazione dell'integrità del podocita o della sua funzione, oppure da un'alterata espressione delle proteine podocitarie. Inoltre, poiché il podocita partecipa alla sintesi della GBM e alla fenestrazione delle cellule endoteliali (via VEGFa), un danno podocitario si può

riflettere non solo sul podocita stesso, ma anche sulle strutture adiacenti, con conseguente alterazione funzionale della barriera di filtrazione. Il podocita svolge pertanto un ruolo fondamentale, anche se vi sono evidenze crescenti che alla fisiopatologia della proteinuria contribuisca non il solo podocita, ma l'interazione (*crosstalk*) tra tutti gli strati della barriera di filtrazione (3). La risposta podocitaria ad un danno, sia esso primitivo o secondario, è stereotipata, con fenomeni di fusione dei pedicelli, apoptosi, arresto maturativo e dedifferenziazione. Ciascuno di questi processi si manifesta con specifiche alterazioni morfologiche, che conducono a quadri istologici differenti, recentemente riclassificati (4).

### **Quadri istopatologici**

I quadri istologici di più frequente riscontro sono la glomerulosclerosi focale e segmentale e la sclerosi mesangiale diffusa.

La glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS) è definita dalla presenza di lesioni di sclerosi del tuft glomerulare, con aumento della matrice, adesione del *tuft* capillare alla capsula di Bowmann (sinechie), possibile presenza di *foam cells* e ialinosi nelle fasi avanzate. All'immunofluorescenza, vi può essere una positività aspecifica di C3 e IgM nelle aree di sclerosi. Alla microscopia elettronica, si osservano un'estensiva distruzione dei pedicelli ed un aumento della matrice mesangiale nelle aree sclerotiche, senza depositi immuni (5). In tempi relativamente recenti, è stata proposta una classificazione patologica della FSGS, che distingue cinque varianti: *collapsing*, *tip lesion*, cellulare, perilare, variante a lesioni non altrimenti specificate (6).

L'incidenza annuale della FSGS è stimata di 1.4/1000000 in Asia, 2.3-12/1000000 in Europa e 21/1000000 in Oceania. Essa rappresenta una causa rilevante di insufficienza renale terminale (ESRD), rendendo conto del 2-3% dei casi di ESRD negli USA (7).

E' da tenere in considerazione che l'11-18% dei bambini e degli adulti con FSGS presenta una proteinuria lieve, in assenza delle manifestazioni cliniche della sindrome nefrosica, per cui la reale frequenza della FSGS è probabilmente sottostimata. Inoltre, anche la malattia a lesioni minime (MCD), caratterizzata da glomeruli sono normali, immunofluorescenza negativa ma diffusa distruzione dei pedicelli al microscopio elettronico, può rappresentare lo stadio iniziale della FSGS (8-11), aumentandone la frequenza.

La sclerosi mesangiale diffusa (DMS) è caratterizzata da un'espansione mesangiale dovuta ad un diffuso aumento di fibrille nella matrice mesangiale in assenza di proliferazione cellulare mesangiale, ipertrofia dei podociti ed invasione fibrillare dei ciuffi capillari, fino all'obliterazione. L'immunofluorescenza è generalmente negativa, ma vi può anche essere una variabile ed aspecifica positività mesangiale di IgM, C1q e C3. La microscopia elettronica è caratterizzata dall'ipertrofia delle cellule mesangiali, che appaiono circondate da un abbondante accumulo di matrice contenente fibrille di collagene, podociti ipertrofici con irregolare fusione dei pedicelli ed ispessimento della membrana basale glomerulare (12).



### ***Orchestrating genes***

Il gene NPHS2 (NCBI-MIM#604766) mappa sul cromosoma 1q25-q31 e codifica per podocina, una proteina integrale di membrana costituita da 383 aminoacidi ed appartenente alla famiglia delle stomatine (13). La podocina è essenziale per l'assemblaggio dello SD e per l'attivazione del signalling intracellulare del podocita. Essa infatti si accumula in forma oligomerica in microdomini lipidici (lipid-rafts) all'inserzione dello SD, dove interagisce con altre proteine podocitarie, come nefrina e CD2AP. L'integrità della podocina è quindi un prerequisito fondamentale per il corretto funzionamento dello SD (14). Mutazioni di NPHS2 sono state inizialmente identificate in famiglie con forme di FSGS a trasmissione AR (20). In seguito, mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composta di NPHS2 sono state riportate in soggetti con sindrome nefrosica sporadica corticoresistente e NPHS2 è ora considerato il gene più frequentemente associato a sindrome nefrosica a trasmissione AR in Europa. Ad oggi, sono state riportate circa 50 mutazioni in omozigosi o eterozigoti composta, che comprendono delezioni, mutazioni missenso e nonsenso e mutazioni del sito di *splicing*, che possono localizzarsi lungo l'intera sequenza del gene (15). Il quadro istologico associato è di FSGS, anche se sono stati riportati casi di MCD, DMS ed alcuni quadri istologici non ben definiti, per cui la variabilità del fenotipo istopatologico associato a mutazioni di NPHS2 può complicare l'approccio molecolare, limitando la possibilità di una diagnosi basata solamente su due indagini diagnostiche, ossia la biopsia renale e l'analisi molecolare di NPHS2.

WT1 (*Wilm's tumor-suppressor gene-1*) codifica per un fattore di trascrizione che gioca un ruolo critico durante lo sviluppo renale e gonadico e svolge un'importante funzione nel mantenimento dello stato differenziativo del podocita durante la vita adulta (12). WT1 si localizza sul cromosoma 11p13, è costituito da 10 esoni e codifica per una proteina *zinc-finger* di 449 aminoacidi. Due *splicing* alternativi determinano la presenza/assenza di 17 aminoacidi codificati dall'esone 5 e la presenza/assenza di 3 aminoacidi (KTS, ossia Lys-Thr-Ser) codificati dall'esone 9, per un totale di 4 isoforme proteiche, il corretto rapporto tra le quali è fondamentale per il normale funzionamento del gene sia durante la nefrogenesi sia nella vita adulta. A seconda dell'isoforma e del contesto cellulare, WT1 può infatti funzionare come fattore di trascrizione, cofattore di trascrizione o regolatore post-trascrizionale (16). Mutazioni costituzionali missenso di WT1 sono la causa della sindrome di Denys-Drash (DDS) (OMIM#194080), caratterizzata, nella forma classica, da quadro istologico di DMS con proteinuria ed insufficienza renale ad esordio precoce, pseudoermafroditismo XY ed elevato rischio di sviluppo di tumore di Wilm's (90% dei casi). L'associazione di DMS e tumore di Wilms senza pseudoermafroditismo configura invece il quadro di DDS incompleta. La DDS è determinata più frequentemente da mutazioni localizzate negli esoni 8 e 9 (*hot spots*), che sembrano esplicarsi in maniera dominante negativa, per cui la proteina WT1 alterata compromette l'attività cellulare della forma *wild type* (17). Mutazioni del gene WT1 sono

anche la causa della sindrome di Frasier (OMIM#136680) (FS), caratterizzata da FSGS a lenta progressione, pseudoermafroditismo e gonadoblastoma.

Il gene PLCE1 o NPHS3 (NCBI-MIM#608414) si localizza sul cromosoma 10q23 e codifica per la fosfolipasi C epsilon 1, un enzima citoplasmatico ubiquitario, che catalizza l'idrolisi dei fosfoinositoli per generare secondi messaggeri, come l'inositolo trifosfato e il diacilglicerolo, coinvolti nel *signalling* intracellulare, necessario per la crescita e la differenziazione cellulare (18). A livello renale, il gene PLCE1 è espresso nel podocita, già nelle fasi precoci dello sviluppo (19). Mutazioni di PLCE1 che danno origine ad una proteina tronca, trasmesse con modalità AR, sono state inizialmente identificate in casi familiari di sindrome nefrosica congenita a rapida progressione ed in seguito in un numero crescente di soggetti con sindrome nefrosica ad esordio nel primo anno di vita ed associata a DMS isolata (19-20). Nei modelli animali, è stato osservato che il deficit di PLCE1 dovuto a *knockout* del gene si associa ad arresto maturativo del podocita, con conseguente alterazione della barriera di filtrazione nello stadio di pronefro (19). Il meccanismo attraverso il quale le mutazioni di PLCE1 determinino la DMS non sono ancora chiari, tuttavia sembra che PLCE1 costituisca lo scheletro per l'assemblaggio di un complesso molecolare coinvolto nello sviluppo glomerulare durante lo stadio di *capillary loop*. PLCE1 infatti interagisce con la IQGAP1 (GTPase-activating protein 1), che si trova nella porzione basale del podocita in via di sviluppo (ove si formano i pedicelli) ed interagisce con nefrina e podocina (19).

### **Altri geni**

Il gene NPHS1 si localizza sul cromosoma 19q13.1 ed è costituito da 29 esoni (21). La sindrome nefrosica finlandese, caratterizzata da un fenotipo clinico e istologico peculiare, è molto comune in Finlandia (1/10000 nati), ma anche in Europa (1/50000 nati), dove le mutazioni di NPHS1 rappresentano la causa più frequente di sindrome nefrosica ad esordio nel primo anno di vita (22.5% dei casi) dopo quelle di NPHS2. Ad oggi, sono state identificate circa 100 mutazioni di NPHS1, che comprendono mutazioni missenso, nonsense, di splicing, delezioni e inserzioni (22). In Finlandia, le mutazioni più frequenti sono la Finmajor (80% dei casi) e la Finminor, che si localizzano nell'esone 2 e 26, rispettivamente, e determinano la produzione di una proteina tronca (di 90 aminoacidi nella Finmajor e di 1109 aminoacidi nella Finminor), che si accumula nel reticolo endoplasmatico e di conseguenza non viene correttamente espressa a livello dello SD (23).

Il gene TRPC6 (transient receptor potential cation channel, homolog 6) (NCBI-MIM#603965) mappa sul cromosoma 11q21-22 e codifica per un canale ionico, implicato principalmente nel mantenimento dell'omeostasi ionica intracellulare e nella regolazione dell'ingresso di calcio nella cellula (24). A livello renale, esso è associato allo SD ed il suo corretto funzionamento è fondamentale per la normale funzione renale (25). Mutazioni di TRPC6, trasmesse con modalità autosomica dominante (AD), sono state descritte in alcune famiglie con proteinuria severa

invariabilmente associata a FSGS, ad esordio nell'età adulta (3°-4° decade) e con progressione a ESRD nel 50% dei casi (24-25).

Il gene ACTN4 (NCBI-MIM#603278), localizzato sul cromosoma 19q13, codifica per alfa-actinina 4, una proteina del citoscheletro podocitario, che ha la funzione di legare i filamenti di actina e connetterli alla GBM. Mutazioni di ACTN4 sono state descritte in alcune famiglie con FSGS a trasmissione AD a penetranza incompleta, e, molto raramente, anche in casi sporadici (uno dei quali presentava la variante collapsing della FSGS). Tutti i soggetti presentavano una proteinuria modesta e ad esordio nell'adolescenza o nella prima età adulta e solo in alcuni si osservava una lenta progressione verso l'ESRD. In tutti i casi, la mutazione si localizzava nell'esone 8 - che rappresenta quindi un *hot spot* - e determinava una sostituzione aminoacidica nel dominio di legame con l'actina (26-28).

CD2AP (CD2-associated protein) (NCBI-MIM#607832) è una molecola adattatrice originariamente identificata come ligando dell'antigene di adesione dei linfociti T CD2. CD2AP è una proteina citoplasmatica, espressa in tutti i tessuti, tranne il cervello; nel rene, CD2AP si localizza nel podocita. Il topo *knockout* per CD2AP sviluppa un fenotipo severo, a differenza dell'eterozigote, che mostra un fenotipo renale lieve, senza proteinuria (29). In letteratura, è descritto un solo paziente con una mutazione in omozigosi (che determinava l'inserzione di un segnale di stop prematuro) ed una sindrome nefrosica ad esordio precoce associata ad un quadro istologico con caratteristiche indefinite tra FSGS e DMS (30). Gli altri casi descritti sono di mutazioni in eterozigosi, associate a FSGS e ad un quadro clinico caratterizzato da proteinuria nefrosica con esordio ad età variabile (infanzia o età adulta) (31-32). Nonostante un'evidente associazione tra alterazioni di CD2AP e glomerulopatia nei modelli animali, il fenotipo e la modalità di trasmissione delle mutazioni di CD2AP ed il suo reale ruolo nella patogenesi delle glomerulopatie nell'uomo resta ancora da chiarire, anche a causa della scarsità dei casi riportati.

### **Manifestazioni cliniche**

Indipendentemente dal gene mutato o dall'assenza di mutazioni, le manifestazioni cliniche delle podocitopatie sono simili tra tutte le forme e comprendono proteinuria (nefrosica o non nefrosica) o sindrome nefrosica conclamata, con edemi diffusi (cl clinicamente evidenti quando la ritenzione idrica è >3-5% del peso corporeo), segni e sintomi secondari ad ipovolemia relativa, aumentata suscettibilità ad eventi trombotici e ad infezioni. A più lungo termine, si possono osservare scarsa crescita e stati di malnutrizione secondari alla perdita urinaria di proteine, ed ipotiroidismo.

La proteinuria si può presentare come una condizione sintomatica (sindrome nefrosica) oppure come un reperto accidentale, riscontrato nel corso della valutazione clinica di una patologia nefrologica o non nefrologica, oppure in occasione di un esame urine in benessere. Nell'ambito delle proteinurie, la distinzione fondamentale è tra proteinuria a basso peso molecolare, segno di una disfunzione tubulare, e proteinuria ad alto peso molecolare (prevalentemente albumina), che

può rappresentare la spia di diverse nefropatie. Una proteinuria ad alto peso molecolare in un singolo campione è comune in età pediatrica, con una prevalenza riportata dell'1-10%. Nel 30-50% dei bambini, tale proteinuria è transitoria e legata a fattori intercorrenti (stati febbrili, sforzo fisico, ecc.) e non si osserva in campioni urinari di controllo a distanza di 1-2 settimane. Nel 60% dei bambini e ragazzi con proteinuria isolata e asintomatica, la proteinuria è ortostatica, ossia di modesta entità (<1 g/die o <200 mg/mq/12 ore) e posturale. Una proteinuria ad alto peso molecolare persistente è invece molto meno comune ed è considerata un marcatore di patologia renale severa, specie se associata ad altre manifestazioni di malattia renale (quali ematuria o ipertensione), ma anche se isolata (1). Qualsiasi malattia glomerulare può determinare una proteinuria di varia entità come unica manifestazione, per cui una proteinuria persistente richiede una valutazione clinica e biomorale approfondita. Una volta escluse forme secondarie (infezioni, patologie sistemiche, malattie non nefrologiche), nella valutazione di una proteinuria idiopatica può essere spesso necessaria l'esecuzione di una biopsia renale per orientare la diagnosi.

In età pediatrica, la proteinuria si accompagna più spesso ai segni e sintomi della sindrome nefrosica (NS), entità clinica caratterizzata dalla presenza di: proteinuria (> 50 mg/kg/die o > 40 mg/mq/h), ipoprotidemia (< 60 g/L), ipoalbuminemia (< 25 g/L) ed edema (33).

La sindrome nefrosica rappresenta la patologia glomerulare prevalente in età pediatrica, con un'incidenza annua di 1.9-7/100000 bambini ed una prevalenza cumulativa di 12-16/100000 bambini negli USA, in Nuova Zelanda ed in Europa (34).

Dal punto di vista epidemiologico, si distinguono principalmente due forme:

1. sindrome nefrosica idiopatica, che rappresenta la forma più frequente in età pediatrica (95% dei casi) nella popolazione caucasica. L'età d'esordio è generalmente compresa tra 2 e 6 anni. La responsività agli steroidi (sindrome nefrosica corticosensibile, SSNS) si osserva nell'80-90% dei casi; nel 57% dei casi, si verifica tuttavia una ricaduta nel primo anno di follow up o lo sviluppo di corticodipendenza. Nel 10-20% dei casi, non vi è risposta alla terapia steroidea (sindrome nefrosica corticoresistente, SRNS) (35).

2. Sindrome nefrosica secondaria, che rappresenta solo il 5% delle forme nell'infanzia, mentre ha un'incidenza maggiore nell'adolescente, nell'adulto e nelle popolazioni non caucasiche. Essa può essere dovuta a vasculiti (LES, Wegener, Goodpasture, Schoenlein-Henoch), infezioni (HBV, HCV, HIV, ParvoB19, CMV, EBV, BK virus, pneumococco, salmonella, sifilide, malaria, parassitosi, mycoplasma), farmaci (tiopronina, sali d'oro, penicillamina...) e diabete (35).

A fronte dell'omogeneità delle manifestazioni cliniche iniziali, la sindrome nefrosica appare estremamente eterogenea per quanto riguarda le caratteristiche istologiche, i meccanismi patogenetici, il decorso clinico e la prognosi.

Infatti, al di là della classificazione epidemiologica, dati crescenti suggeriscono che la sindrome nefrosica comprenda un gruppo eterogeneo di disordini, suddivisibili in tre categorie:

1. forme idiopatiche corticosensibili (SSNS) ed alcune forme corticoresistenti (SRNS), sostenute da un meccanismo immunomediato acquisito. Esse possono rispondere alla terapia immunosoppressiva (steroidi, inibitori della calcineurina, micofenolato, anticorpi monoclonali antiCD20), ma evolvere verso l'insufficienza renale terminale (ESRD) e ricadere sul rene trapiantato. La risposta all'immunosoppressione e la possibilità di ricaduta su rene trapiantato supportano il ruolo di un o più fattori di permeabilità circolanti, in grado di alterare la selettività della barriera di filtrazione, determinando proteinuria (36). Tali fattori non sono stati ad oggi identificati con certezza, tuttavia sembra che uno di essi sia il suPAR (*Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor*), che può essere dosato direttamente in campioni di plasma dei pazienti. La presenza di fattori permeabilità può essere inoltre dimostrata indirettamente attraverso il test di permeabilità glomerulare all'albumina (37-38);

2. forme dovute ad un difetto genetico primitivo ed isolato, che conduce ad una disfunzione podocitaria e conseguentemente ad un'alterazione della barriera di filtrazione glomerulare. Si tratta di SRNS e di forme familiari che non rispondono alla terapia immunosoppressiva, evolvono quasi invariabilmente verso l'insufficienza renale (il rischio è del 50% entro 5 anni), ma generalmente non ricadono dopo il trapianto (39);

3. forme dovute a difetti genetici che determinano quadri sindromici complessi, in cui vi è un coinvolgimento extra-renale e l'alterazione della barriera di filtrazione con sviluppo di proteinuria rappresenta la manifestazione nefrologica.

Le forme genetiche possono associarsi a quadri istologici diversi, rappresentati più frequentemente dalla glomerulosclerosi focale e segmentale e dalla sclerosi mesangiale diffusa (22, 39).

La varietà delle forme descritte e la molteplicità delle cause sottostanti dimostrano come le podocitopatie rappresentino un gruppo molto eterogeneo di malattie. Una precisa definizione delle caratteristiche istopatologiche è cruciale ai fini di un corretto approccio diagnostico, poiché la correlazione genotipo-fenotipo potrebbe indirizzare verso il difetto molecolare sottostante. Tuttavia, vi è un'ampia sovrapposizione tra le diverse forme e non sono infrequenti le associazioni non comuni, per cui in molti casi le correlazioni genotipo-fenotipo non sono facilmente individuabili. Tale variabilità rappresenta una sfida nella pratica clinica, limitando la possibilità di una diagnosi basata semplicemente sui dati clinici e su poche altre indagini. Tuttavia, la rilevanza di giungere ad una diagnosi eziologica di una proteinuria o sindrome nefrosica emerge con grande evidenza quando si tratta di stabilire un percorso terapeutico e di formulare una prognosi.

## OBIETTIVI

Le podocitopatie rappresentano una patologia complessa, caratterizzata da un'ampia eterogeneità. Tuttavia, la relativa omogeneità delle manifestazioni cliniche può generare confusione e limitare la possibilità di giungere alla diagnosi avvalendosi soltanto di criteri clinici.

Abbiamo eseguito un'analisi delle varianti genetiche in 40 bambini con podocitopatia sporadica o familiare ed analizzato retrospettivamente e in senso prospettico le loro caratteristiche cliniche, il quadro istopatologico e l'*outcome*, con i seguenti obiettivi:

1. Implementare lo spettro delle correlazioni genotipo-fenotipo, anche attraverso la caratterizzazione fenotipica di nuove mutazioni causa-malattia.
2. Aumentare le conoscenze riguardo ai meccanismi patogenetici di alcune forme isolate, mediante lo studio funzionale delle mutazioni causa-malattia ad esse associate.

Il precoce riconoscimento di una forma genetica potrebbe infatti consentire di definire:

- un percorso terapeutico mirato, che permetta di evitare al paziente il carico di terapie inutili (come ad esempio gli immunosoppressori);
- una prognosi ben definita anche a lungo termine, predicendo la possibilità di progressione ad insufficienza renale, la probabilità di recidiva sul trapianto e quindi la necessità di terapie mirate post-trapianto, nonché l'opportunità di proporre un trapianto da donatore vivente.

## MATERIALI E METODI

### Selezione dei pazienti

Nel presente progetto di ricerca sono stati inclusi, in modo retrospettivo e prospettico, bambini seguiti presso la Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto DAIs SDB di Padova, tra il 1992 e il 2012, affetti da proteinuria nefrosica/non nefrosica persistente, con o senza sindrome nefrosica, ad esordio prima o dopo il primo anno di vita.

La proteinuria è stata definita patologica se  $>200$  mg/mq/die (o  $>4$  mg/mq/ora) e nefrosica se  $\geq 50$  mg/kg/die (o  $\geq 40$  mg/mq/h). La proteinuria nefrosica poteva associarsi o meno ad un quadro di sindrome nefrosica conclamata, definita dalla presenza di ipoprotidemia (proteine totali  $<60$  g/L), ipoalbuminemia (albumina  $< 25$  g/L) ed edema. Se l'esordio si era verificato dopo il primo anno di vita, il criterio di inclusione nello studio era la corticorestistenza, definita come mancata remissione dopo trattamento con prednisone  $60$  mg/m<sup>2</sup>/die (2 mg/Kg/die) per 4 settimane + 3 boli ev di metilprednisolone (500 mg/mq), oppure al trattamento con prednisone  $60$  mg/m<sup>2</sup>/die (2 mg/Kg/die) per 6 settimane.

Tutti i pazienti dovevano aver eseguito una biopsia renale per definire l'esatto quadro istologico.

### Dati clinici

I dati clinici e bioumorali raccolti comprendevano: età all'esordio e manifestazioni cliniche, funzionalità renale, proteinuria su raccolta delle 24 ore, trattamento, *outcome*. Tutti i bambini avevano eseguito una valutazione immunologica ed infettivologica completa per escludere forme secondarie (autoimmuni o virali). La funzionalità renale era definita in base ai valori di *clearance* della creatinina calcolata secondo la formula di Schwartz: la *clearance* della creatinina veniva definita normale se  $\geq 80$  ml/min/1.73 mq (40). Il grado di insufficienza renale è stato classificato secondo le linee guida NKF KDOQI (41).

### Biopsia renale

Tutti i bambini sono stati sottoposti a biopsia renale, previo consenso informato da parte dei genitori.

I criteri di esecuzione della biopsia renale comprendevano:

- esordio di proteinuria nefrosica o non nefrosica nel primo anno di vita o dopo i 10 anni;
- esordio tra il primo ed il decimo anno di vita, ma presenza di anamnesi familiare positiva per proteinuria, sindrome nefrosica o insufficienza renale cronica;
- esordio tra il primo ed il decimo anno di vita, ma quadro clinico di sindrome nefrosica corticoresistente.

I bambini di età  $\leq 1$  anno o con rischio emorragico (tempo di protrombina  $\leq 65\%$ ) sono stati sottoposti a biopsia chirurgica (con tecnica a cuneo e sutura del parenchima), mentre nei bambini

di età >1 anno e non a rischio veniva eseguita un'agobiopsia percutanea eco-guidata (con Tru-cut 16G).

La valutazione istologica è stata eseguita dopo fissazione in formalina al 4% tamponata, inclusione in paraffina, taglio al microtomo ed allestimento delle colorazioni standard (ematossilina-eosina, PAS, Silver-PAS, colorazione tricromica di Masson). L'immunofluorescenza diretta è stata eseguita su sezioni di tessuto congelato (congelamento per immersione del frammento in azoto liquido, conservazione a -80°C e taglio al criostato) con anticorpi FITC anti IgG, IgA, IgM, C3c, C4, C1q, fibrinogeno, HbsAg. Un frammento di tessuto è stato fissato in glutaraldeide ed incluso in resina per la valutazione al microscopio elettronico.

### **Analisi mutazionale**

A tutti i pazienti è stato eseguito un prelievo di sangue in EDTA, previo consenso informato dei genitori alla conservazione del campione biologico e all'esecuzione dell'analisi molecolare. Il DNA è stato estratto dal sangue periferico congelato con il kit "DNA EXTRACTION" (QIAGEN).

Le analisi molecolari per i geni più frequentemente coinvolti nella sindrome nefrosica sono state effettuate in collaborazione con l'Istituto Gaslini di Genova, il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Foggia e il Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale Meyer di Firenze.

I geni analizzati sono stati:

NPHS2 (podocina): l'analisi è stata condotta tramite sequenziamento diretto della regione codificante (42-43).

- WT1 (Wilm's tumor 1): l'analisi è stata eseguita dapprima tramite sequenziamento diretto della regione codificante (44).

- PLCE1 (fosfolipasi C epsilon 1): l'analisi è stata eseguita tramite il sequenziamento diretto dei 33 esoni del gene (19).

- NPHS1 (nefrina): l'analisi è stata condotta tramite sequenziamento diretto della regione codificante (42-43).

I suddetti geni sono stati analizzati secondo gli algoritmi in uso presso la nostra Struttura (Fig. 1 e 2).

I pazienti con analisi molecolare negativa per uno o più di questi geni, sono stati studiati tramite *Next Generation Sequencing* (NGS). I geni selezionati per l'*array* di analisi sono stati 46, tra i quali 15 geni di cui è nota la relazione con la sindrome nefrosica corticoreistente e 31 geni candidati, associati a proteinuria in modelli animali ed espressi nella barriera di filtrazione glomerulare (Tabella 1). Il DNA è stato estratto da sangue periferico e le librerie di DNA sono state preparate e ibridate con l'*array* per il sequenziamento esonico (in totale 610 esoni codificanti). Il sequenziamento è stato ottenuto mediante la piattaforma Roche 454 Sequencing FLX e i dati ottenuti sono stati analizzati con il software Gs Mapper version 2.6. Per l'identificazione di variazioni di sequenza di significato patologico, sono stati utilizzati numerosi *database* e



programmi di predizione, a seconda delle caratteristiche molecolari delle varianti. In questo modo, sono state identificate 16 variazioni di sequenza, che sono state poi confermate mediante sequenziamento Sanger. L'analisi molecolare delle alterazioni geniche confermate è stata estesa ai campioni di DNA dei genitori disponibili, per determinare l'ereditarietà della mutazione allelica.

### **Altre analisi**

Oltre alle analisi molecolari, in alcuni pazienti sono stati eseguiti il test di permeabilità glomerulare all'albumina (presso il Dipartimento di Medicina Clinica dell'Università di Trieste) o la ricerca del suPAR (*Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor*) (presso la Nefrologia e Dialisi dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma), secondo le modalità descritte in letteratura (37-38).

### **Trattamento**

La terapia era determinata dall'entità della proteinuria, dall'età d'esordio e dal grado di insufficienza renale.

Le opzioni di trattamento comprendevano:

- terapia sintomatica: anti-edemigena (restrizione idrica, dieta iposodica, diuretici, infusione di albumina); correzione di eventuali squilibri elettrolitici; acido acetilsalicilico come anti-aggregante (se PTLs  $\geq 600.000/\text{mmc}$ ); statine (se LDL  $>190 \text{ mg/dL}$ ) alle posologie riportate in letteratura (45);
- terapia steroidea nei bambini con sindrome nefrosica conclamata ad esordio dopo il primo anno di vita, secondo gli schemi classici della sindrome nefrosica (46);
- inibitori della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus) nei corticoresistenti, secondo gli schemi di trattamento riportati in letteratura (47-48);
- ACE-inibitore (Ramipril, alla dose di 0.2-0.6 mg/kg/die);
- terapia dialitica (emodialisi o dialisi peritoneale) nei bambini con ESRD (*clearance* della creatinina secondo Schwartz  $<10 \text{ ml/min/1.73 mq}$ );
- nefrectomia.

### **Outcome**

Il *follow up* è stato eseguito presso la S.S. di Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto. Sono stati considerati i seguenti *outcome*: terapia medica conservativa, insufficienza renale (stadio CKD KDOQI), dialisi, trapianto di rene, recidiva su rene trapiantato, perdita al *follow up*, morte.

## RISULTATI

### Pazienti

La popolazione di questo studio è costituita da 40 bambini appartenenti a 38 famiglie. Le caratteristiche cliniche, la diagnosi istopatologica, il genotipo e l'*outcome* di ciascun paziente sono riportati in Tabella 2 e 3.

L'età di esordio era  $\leq 12$  mesi in 10 bambini (25%), mentre gli altri 30 avevano esordito ad un'età  $> 1$  anno.

Dal punto di vista clinico, l'esordio era stato caratterizzato da una proteinuria nefrosica o non nefrosica in 11/40 bambini, mentre i restanti 29 avevano presentato un quadro conclamato di sindrome nefrosica. Inoltre, 8 bambini presentavano insufficienza renale terminale (ESRD, stadio 5 KDOQI classification) già all'esordio, mentre in altri 10 la funzionalità renale era normale o solo moderatamente ridotta all'esordio, con successivo peggioramento fino all'ESRD. Nei restanti 22 casi, la funzionalità renale era normale all'esordio e si è mantenuta tale fino al termine del *follow up*.

### Analisi istologica

La diagnosi istologica era di glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS) in 31/40 bambini (77.5%) e di sclerosi mesangiale diffusa (DMS) in 9/40 (22.5%). Dei 9 bambini con DMS, 8 erano di età  $\leq 12$  mesi e 1 di età  $> 1$  anno all'esordio, mentre tra i 31 con FSGS, 3 avevano  $\leq 12$  mesi ed i restanti 28 avevano  $> 1$  anno al momento dell'esordio.

### Analisi molecolare

Un'alterazione genomica è stata riscontrata in 20/40 pazienti (50%):

- 6/40 bambini (15%) presentavano un'alterazione del gene NPHS2 (in tutti i casi, il quadro istologico era di FSGS). In 4/6 casi, la variazione di sequenza riscontrata non era precedentemente riportata in letteratura;
- in 11 pazienti (27.5%) è stata identificata una mutazione del gene WT1, con istologia di FSGS in 6 e DMS in 5. In 4/11 casi, la variazione di sequenza era nuova (sempre in associazione a FSGS);
- in 3 bambini sono state identificate 3 nuove variazioni di sequenza del gene PLCE1 (con quadro istologico di FSGS in 2 e DMS in 1);
- L'analisi molecolare è risultata negativa negli altri 20/40 (50%) pazienti: 17 con FSGS (di cui 2 ad esordio nel primo anno di vita) e 3 con DMS ad esordio  $\leq 12$  mesi.

### Analisi molecolare nei familiari

L'analisi genetica è stata estesa ai familiari nel caso in cui nel probando fossero state individuate variazioni di sequenza non precedentemente riportate nei *database* e non riscontrate in controlli

sani, per valutarne il possibile effetto patogenetico; in tre casi, l'analisi è stata estesa ai genitori su richiesta della famiglia stessa.

Le variazioni di sequenza riscontrate nel probando e analizzate anche nei familiari sono state le seguenti:

1. c.1208G>A (p.Arg403Lys), esone 9 del gene WT1: la mutazione, identificata in un ragazzo di 16 anni con riscontro casuale di proteinuria non nefrosica isolata, associata a FSGS, non è stata osservata in un campione di 336 cromosomi di controllo e non era mai stata riportata in letteratura. L'anamnesi familiare era positiva per: nonno paterno (nato nel 1934) sottoposto a trapianto di rene all'età di 70 anni, in seguito al riscontro di proteinuria a 59 anni e sviluppo di ESRD a 69 anni. Una biopsia renale eseguita a 64 anni aveva dimostrato una FSGS; padre (nato nel 1961) e zia paterna (nata nel 1963), entrambi in trattamento emodialitico per ESRD dall'età di 46 e 44 anni, rispettivamente, in seguito al riscontro di ipertensione e proteinuria a 43 e 40 anni, rispettivamente; cugina di 18 anni (figlia della zia affetta), con proteinuria non nefrosica isolata. L'analisi molecolare ha dimostrato la stessa mutazione in tutti i membri affetti della famiglia.
2. c.1186G>A (p.Asp396Asn), esone 9 del gene WT1: la mutazione, riscontrata in una bambina (cariotipo 46,XX) con esordio di sindrome nefrosica (quadro istologico di DMS) nel contesto della sindrome di Denys Drash (incompleta) a 8 mesi, era già nota dalla letteratura. L'analisi è stata eseguita sui genitori per richiesta degli stessi ed è risultata negativa.
3. c.1096C>T (p.Arg366Cys), esone 8 del gene WT1: la mutazione, riscontrata in un bambino (cariotipo 46,XY) con esordio di sindrome nefrosica (quadro istologico di DMS) nel contesto della sindrome di Denys Drash (incompleta) a 2 mesi, era già nota dalla letteratura. L'analisi è stata eseguita sui genitori per richiesta degli stessi ed è risultata negativa.
4. c.451+3A>T in omozigosi, esone 3 del gene NPHS2: la variazione di sequenza, mai riportata in letteratura, è stata riscontrata in una bambina con sindrome nefrosica corticoresistente (quadro istologico di FSGS) ad esordio all'età di 7 anni. La variazione si associava al polimorfismo c.686G>A (p.Arg229Gln) nell'esone 5, anch'esso in omozigosi. L'analisi genetica, estesa ai genitori, ha dimostrato lo stato di portatori eterozigoti della mutazione e della variazione di sequenza, mentre la sorella di 4 anni (non affetta) è risultata negativa.
5. -52C>G (esone 1) in eterozigosi + c.452-31T>C (esone 4) in eterozigosi del gene NPHS2: entrambe le variazioni di sequenza, non precedentemente descritte e a significato biologico sconosciuto, sono state identificate in una bambina con disturbo generalizzato dello sviluppo psicomotorio, angiomatosi cutanea diffusa, glicosuria normoglicemica e sindrome nefrosica (associata a FSGS) ad esordio a 13 anni. L'analisi è stata estesa ai genitori ed il padre, sano, è risultato portatore di entrambe le variazioni di sequenza.

6. c.938C>T (p.Ser313Leu) in eterozigosi, esone 8 del gene NPHS2: la variazione di sequenza, mai riportata in letteratura, è stata riscontrata in una bambina con proteinuria non nefrosica (quadro istologico di FSGS) ad esordio all'età di 3 mesi e si associava alla variante c.686G>A (p.Arg229Gln) nell'esone 5. L'analisi genetica è stata estesa ai genitori ed ha dimostrato che entrambe le varianti sono state ereditate: il padre è risultato eterozigote per la variante c.938 C>T (p.Ser313Leu) e la madre è risultata eterozigote per la variante c.686 G>A (p.Arg229Gln). L'analisi con il programma di predizione funzionale di varianti non sinonimo Polyphen2 riporta che la sostituzione possa essere dannosa con un punteggio di 0.703 (sensibilità 0.78; specificità: 0.85) (su una scala da 0 a 1). E' stata inoltre condotta anche l'analisi di NPHS1, risultata negativa.
7. c.911C>T (p.Ser304Phe), esone 8 del gene NPHS2: la variazione di sequenza, mai riportata in letteratura, è stata riscontrata in una bambina con sindrome nefrosica (quadro istologico di FSGS) ad esordio all'età di 4 anni e si associava alla variante c.686G>A (p.Arg229Gln) nell'esone 5. L'analisi genetica nei genitori ha rilevato la variante c.911C>T (p.Ser304Phe) nel padre (sano) e la variante c.686G>A (p.Arg229Gln) nella madre (sana).
8. c.506T>C (p.Leu169Pro), esone 4 del gene NPHS2: la mutazione, già riportata in letteratura come patogenetica, è stata riscontrata in due fratelli di origine marocchina, figli di genitori consanguinei, con esordio rispettivamente di sindrome nefrosica e proteinuria non nefrosica (quadro istologico di FSGS) a 6 e 4 anni, rispettivamente. L'anamnesi familiare era positiva per insufficienza renale cronica nel nonno paterno, residente in Marocco. L'analisi è stata eseguita sui genitori e sugli altri 2 fratelli per richiesta degli stessi: entrambi i genitori sono risultati portatori della mutazione in eterozigosi, mentre i fratelli (non affetti) sono risultati uno portatore eterozigote della mutazione e l'altra negativa.
9. 4327G>A (p.Gly1443Arg) (esone 17) + c.2038C>T (p.Gln680X) (esone 6) del gene PLCE1: le variazioni di sequenza, mai riportate in letteratura e nei database (HGMD, dbSNP135, 1000Genomes), sono state identificate in una ragazza di 14 anni, portatrice di trapianto di rene, che aveva avuto l'esordio di sindrome nefrosica (con ESRD all'esordio e quadro istologico di DMS) all'età di 3 anni, ma non era stata studiata dal punto di vista molecolare. Dall'estensione dell'analisi molecolare ai genitori, è risultato che il padre è portatore della c.4327G>A (p.Gly1443Arg), mentre la madre porta la c.2038C>T (p.Gln680X). Il programma di predizione bioinformatica Polyphen indica tali varianti come probabilmente dannose e patologiche.
10. c.4570\_4571delAT (p.Met1524Alafs\*5), esone 19 del gene PLCE: la variante è stata riscontrata, in eterozigosi, in due fratelli, figli di genitori non consanguinei. La variante, mai riportata in letteratura e nei database (HGMD, dbSNP135, 1000Genomes), è probabilmente dannosa secondo Polyphen. La primogenita aveva presentato una sindrome nefrosica corticoresistente (con quadro di FSGS), esordita all'età di 18 mesi, con rapida

evoluzione a ESRD. A 3 anni, la bambina aveva ricevuto un trapianto di rene da donatore vivente (padre), con successiva recidiva di malattia e perdita del rene trapiantato. A 8 anni, è stato eseguito trapianto renale da donatore non vivente. Il decorso post-trapianto era stato complicato da un episodio di rigetto acuto e da infezioni urinarie secondarie a reflusso vescico-ureterale sul rene trapiantato, ma non si è ripresentata recidiva della malattia di base. La paziente è stata riferita ad una Nefrologia dell'adulto per superamento dell'età pediatrica, con CKD stadio 3 per nefropatia cronica del trapianto. Nel fratello minore, affetto da piede torto congenito bilaterale e distrofia muscolare congenita merosina positiva (forma lieve), era stata riscontrata casualmente una proteinuria non nefrosica all'età di 13 anni (quadro istologico di FSGS), con successiva rapida evoluzione a ESRD (emodialisi) e trapianto di rene da donatore non vivente, senza recidiva sul rene trapiantato. Entrambi i fratelli sono risultati portatori anche della variante c.59C>T (p.Pro20Leu) del gene NPHS2. L'analisi sui genitori ha dimostrato che sia la variazione di sequenza di PLCE1 sia quella di NPHS2 sono state ereditate dalla madre (sana). In entrambi i pazienti, è stato analizzato anche il gene NPHS1, risultato negativo.

### **Altre analisi**

La variazione di sequenza c.451+3A>T nell'esone 3 del gene NPHS2 non era mai stata riportata in letteratura ed è stata studiata attraverso estrazione dell'RNA da un frammento bioptico della paziente, retro-trascrizione a cDNA ed analisi del trascritto tramite sequenziamento diretto: la sostituzione nucleotidica identificata comporta un'alterazione dello *splicing*, che determina l'esclusione totale dell'esone 3. L'analisi bioinformatica (ExpASy Proteomics Server. <http://www.expasy.ch>) ha permesso di predire l'effetto di questa alterazione sulla proteina, ossia uno scivolamento del modulo di lettura, con creazione di un codone di stop prematuro e traduzione di una proteina tronca.

La variazione di sequenza c.1208G>A (p.Arg403Lys) nell'esone 9 del gene WT1, mai riportata in letteratura, è stata studiata attraverso analisi bioinformatica per predire l'effetto della sostituzione aminoacidica sulla struttura della proteina: la sostituzione aminoacidica cambia un'arginina in una posizione strategica e filogeneticamente molto conservata del terzo zinc finger-domain con una lisina, provocando uno scivolamento del terzo zinc finger-domain fuori dalla propria posizione corretta e determinando un'alterazione sterica della proteina WT1. Sebbene conservativa, questo tipo di sostituzione è ritenuta di significato biologico, in quanto coinvolgente un residuo di importanza critica (104-105). Infatti, il residuo interessato (Arg4003) è localizzato nell'alfa-elica dello Zf3 e forma un ponte salino con il residuo Glu408, che si trova nella regione linker tra Zf3 e Zf4, proprio in prossimità del sito di inserzione "KTS", le cui alterazioni modificano significativamente l'interazione con il DNA (DNA vs. RNA preference). Tale ponte salino ancora la regione linker, consentendo il corretto posizionamento dello Zf4 sulla molecola di DNA. Alterazioni,

anche lievi, di questa conformazione geometrica determinano verosimilmente uno scivolamento dello Zf4 fuori dalla propria posizione corretta, riducendo l'affinità di legame con il DNA. Pertanto, ci si attende che la variazione di sequenza riscontrata alteri l'interazione Zf-DNA, risultando in un'alterata trascrizione dei geni target di WT1.

La variazione c.988T>C nell'esone 7 del gene WT1, riscontrata in una ragazza con esordio a 12 anni, quadro istologico di FSGS ed assenza di manifestazioni cliniche extrarenali, non era presente in una popolazione di controllo (100 campioni di DNA da sangue di cordone ombelicale) né riportata in letteratura. Essa determina la sostituzione di un aminoacido neutro/polare con uno basico (p.Cys330Arg) nel dominio zinc-finger 1 della proteina WT1. L'analisi bioinformatica con PoliPhen2 e SIFT conferma la patogenicità di tale mutazione, dovuta probabilmente alla distruzione del sito di legame con il DNA.

La variazione c.1115G>A (p.Arg372Lys) nell'esone 8 del gene WT1 interessa un aminoacido altamente conservato e non è mai stata riportata nei *database*. L'analisi bioinformatica con PoliPhen2 ne ha evidenziato la probabile patogenicità, con uno score di 0.909 (da 0 a 1).

La variazione di sequenza (c.1228+2T>G) nell'esone 9 del gene WT1, riscontrata in una bambina di nazionalità cinese, con sindrome nefrosica corticoresistente ad esordio a 3 anni e quadro istologico di FSGS rappresenta una nuova *splice donor variant* (sostituzione nucleotidica sul sito canonico di splicing a +2 basi dalla fine dell'esone 9). Nei database (HGMD), è riportata la sostituzione T>C (IVS9+2T>) nella stessa posizione, associata a sindrome di Frasier e considerata pertanto patogenetica (49). Il cariotipo della paziente è risultato 46,XY.

### **Outcome**

Tra i 20 bambini con forma genetica:

- 6 avevano presentato l'esordio ad un'età  $\leq 12$  mesi (5 con DMS e mutazione di WT1 e 1 con FSGS e mutazione di NPHS2);
- in 3 bambine, portatrici di variazioni di sequenza del gene NPHS2, la positività dell'analisi molecolare ha condotto alla sospensione della terapia immunosoppressiva, che era comunque risultata inefficace;
- 13 hanno ricevuto un trapianto di rene: 8 per ESRD già all'esordio e 5 per progressivo peggioramento fino all'ESRD, pur presentando una funzionalità renale normale all'esordio. Una recidiva di malattia su rene trapiantato si è osservata solo in 1 caso, in cui il rene era stato donato dal padre (variazione di sequenza di PLCE1). 9 bambini (3 con mutazione di WT1 associata a DMS, 3 con mutazione di WT1 associata a FSGS, 1 con mutazione di NPHS2 e FSGS, 1 con alterazione di PLCE1 e FSGS e 1 con variazione di PLCE1 associata a DMS), portatori di trapianto renale, hanno conservato l'organo trapiantato, seppur dopo rigetto acuto in 2 casi;
- 4 ragazze (2 con mutazione di WT1 in DMS, 1 con mutazione di WT1 in FSGS e 1 con variazione di PLCE1 in FSGS), portatrici di trapianto renale, sono state trasferite ad una

Nefrologia dell'adulto per superamento dell'età pediatrica: 2 mantenevano una buona funzione dell'organo trapiantato, mentre le altre due, entrambe portatrici di secondo trapianto (nella ragazza con variazione di PLCE1, la perdita del *graft* era stata determinata da recidiva della malattia di base sul rene donato dal padre), presentavano insufficienza renale cronica secondaria a nefropatia cronica del trapianto;

- Nessuno dei pazienti 6 con mutazione di WT1 associata a FSGS ha sviluppato neoplasia nel corso del *follow up*.
- Dei 5 bambini con mutazione di WT1 associata a DMS, 2 hanno presentato tumore di Wilm's (all'esordio in un caso, 2 anni dopo l'esordio della sindrome nefrosica nell'altro).

Tra i pazienti mutati per WT1, 4 appartenevano ad una coorte storica di 22 soggetti sottoposti a trapianto di rene per insufficienza renale terminale secondaria a sindrome nefrosica, ma non erano stati precedentemente studiati dal punto di vista molecolare:

- 3 pazienti avevano presentato l'esordio di sindrome nefrosica dopo il primo anno di vita ed erano stati sottoposti a biopsia renale per sindrome nefrosica corticoresistente. Il quadro istologico era di FSGS.
- 1 ragazza aveva presentato esordio di sindrome nefrosica nel primo anno di vita ed era pertanto stata sottoposta a biopsia renale, con reperto di DMS.
- Nessuno presentava patologia extrarenale associata alla sindrome nefrosica, salvo criptorchidismo in uno dei pazienti con FSGS.
- Tutti sono stati sottoposti a trapianto di rene e presentano tuttora una buona funzionalità del rene trapiantato.

Dei 20 pazienti con analisi molecolare negativa:

- 4 sono stati sottoposti a trapianto renale da donatore non vivente: una recidiva post-trapianto è stata osservata in 3 casi, di cui 2 con FSGS e 1 con DMS. Uno dei bambini con FSGS ha risposto alla terapia (plasmaferesi e Rituximab), mantenendo una buona funzione renale, ma è stato in seguito perso al *follow up*; l'altro ragazzo con recidiva di FSGS su rene trapiantato non ha risposto alla terapia ed ha perso il *graft* (test di permeabilità glomerulare all'albumina positivo e ricerca suPAR positiva). Il bambino affetto da DMS con recidiva su rene trapiantato ha risposto alla terapia con plasmaferesi e Rituximab, ma ha in seguito sviluppato un rigetto acuto umorale, rispondendo discretamente alla terapia con Eculizumab. Una ragazza con FSGS ha perso il *graft* in seguito a MOF secondaria ad episodio settico.
- 9 hanno risposto alla terapia immunosoppressiva con steroide e/o inibitore della calcineurina e mantenuto una funzione renale normale (tutti con FSGS);
- 1 bambino (con DMS ad esordio nel primo anno di vita) è andato incontro a remissione spontanea;

- 7 pazienti, tutti con FSGS, non hanno risposto ad alcuna terapia, pur mantenendo una funzionalità renale normale (salvo uno, che ha sviluppato CKD di grado moderato);
- 1 bambina con FSGS, di nazionalità straniera, è stata persa al *follow up* per rientro nel Paese d'origine.;
- in 5 pazienti con analisi genetica negativa, sono stati eseguiti il test di permeabilità glomerulare all'albumina o la ricerca del suPAR per valutare la possibile eziologia immunomediata della sindrome nefrosica: il test è risultato positivo in 3/5 bambini, nessuno dei quali ha risposto alla terapia immunosoppressiva.



## DISCUSSIONE

L'avanzamento delle metodologie nel campo della biologia molecolare ha permesso l'identificazione di un numero crescente di geni candidati per la proteinuria e la sindrome nefrosica, nonché una maggiore comprensione dei loro meccanismi patogenetici, aumentando notevolmente le conoscenze su una delle patologie nefrologiche più comuni in età pediatrica. Molti dei geni identificati codificano per proteine coinvolte nel mantenimento dell'architettura o della funzione dello *slit diaphragm* (SD), struttura fondamentale nella regolazione della permeabilità della barriera di filtrazione glomerulare. Il ruolo delle alterazioni dello SD e del podocita (suo elemento principale) nella patogenesi della proteinuria è emerso in modo prorompente negli ultimi anni, grazie alla caratterizzazione biologica delle proteine che li costituiscono. Mentre il coinvolgimento di alcune di queste proteine (come nefrina e podocina) nella patogenesi della proteinuria nell'uomo è ormai ben definito, molto resta ancora da capire sul ruolo di altre (come Neph 1 e 2, FAT 1 e 2, ZO-1, Nck1 e 2, RhoA, catepsina L, ILK) di più recente scoperta o identificate nei modelli animali (50). La funzione podocitaria è, infatti, mantenuta da un *network* dinamico di geni, la complessità del quale rende ragione dell'ampia variabilità fenotipica che caratterizza le podocitopatie. Tale variabilità rappresenta una sfida dal punto di vista clinico, limitando la possibilità di una diagnosi basata semplicemente sui dati clinici e su poche altre indagini. In aggiunta, la descrizione di associazioni non comuni può risultare ulteriormente confondente, rendendo necessaria la definizione di correlazioni genotipo-fenotipo, al fine di orientare la diagnosi. Alla definizione delle correlazioni genotipo-fenotipo può contribuire notevolmente il quadro istopatologico, per cui la biopsia renale, completa di microscopia ottica, immunofluorescenza e microscopia elettronica, rappresenta uno *step* fondamentale nell'approccio diagnostico a queste forme. Tuttavia, lo stesso quadro istologico può essere determinato da alterazioni di geni diversi (ad esempio la FSGS può essere associata a mutazioni di NPHS2, WT1 o altri geni), così come mutazioni dello stesso gene possono associarsi a quadri istologici diversi (come ad esempio avviene per WT1, che può associarsi sia a DMS sia a FSGS). Recentemente, la crescente applicazione delle tecniche di biologia molecolare ad un numero sempre più elevato di pazienti ha permesso di identificare nuove mutazioni nei geni noti (mutazioni in eterozigosi composta di geni recessivi o mutazioni *de novo* o a bassa penetranza di geni dominanti) e di proporre ed analizzare un numero crescente di nuovi geni candidati. Contemporaneamente, è emerso anche come una podocitopatia possa essere determinata dalla concomitanza di mutazioni di più geni (esempio, NPHS1 e NPHS2). In questo senso, lo sviluppo di metodiche come la *Next Generation Sequencing* (NGS), che consentono di analizzare più geni contemporaneamente, permette di sequenziare in modo rapido e simultaneo un enorme quantità di loci e geni in un elevato numero di pazienti, consentendo di studiare patologie complesse, a eziologia e prognosi variabile, come le podocitopatie (51).

Nella nostra popolazione, una mutazione è stata riscontrata nel 50% dei casi e in 8/20 pazienti (40%) si è trattato di una nuova mutazione causa-malattia. I bambini con esordio  $\leq 1$  anno, sono risultati portatori di una mutazione causa-malattia nel 54.5%. La presenza di una mutazione è stata riscontrata nel 100% dei casi familiari (5 pazienti di 3 famiglie) e nel 38% dei casi sporadici. I geni più frequentemente mutati erano NPHS2 e WT1. In letteratura, la frequenza delle mutazioni nei casi sporadici è del 10-25% (52-54), mentre varia dal 40 al 70% nei casi familiari. La frequenza di mutazione nei bambini di età  $\leq 2$  anni è dell'80-100% (52-54). L'elevata percentuale di mutazioni nella nostra serie può essere dovuta ad una maggiore selezione della popolazione sottoposta a *screening* genetico, trattandosi di bambini con caratteristiche fortemente suggestive di forma genetica, ossia esordio nel primo anno di vita o dopo i 10 anni, corticoresistenza, presenza di eventuali anomalie extra-renali (anomalie genitourinarie, manifestazioni neurologiche, difetti oculari...) associate alla proteinuria o positività dell'anamnesi familiare per nefropatia proteinurica. Anche in letteratura, i geni più frequentemente mutati sono NPHS2 e WT1, sebbene vada considerato che essi sono anche i geni noti da più tempo e di conseguenza più analizzati (22).

Dai dati della letteratura, le mutazioni di NPHS2 classicamente si associano a FSGS, con esordio nei primi anni di vita (<5 anni), resistenza alla terapia ed evoluzione a ESRD entro i 10 anni di vita (13, 39). Complessivamente, la frequenza riportata delle mutazioni di NPHS2 è del 45-55% nei casi familiari e fino al 30% nei casi sporadici (55). Nella nostra casistica, abbiamo identificato una variazione di sequenza in 6/40 pazienti (15%), tra cui 1 coppia di fratelli, sempre in associazione a FSGS. La mutazione c.506T>C (p.Leu169Pro), identificata in 2 fratelli di origine marocchina, è stata già riportata in letteratura come causativa di sindrome nefrosica (55). Al contrario, le variazioni c.451+3A>T, c.911C>T, c.938C>T, -52C>G e c.452-31T>C non sono mai state riportate in letteratura.

Per verificare il possibile effetto patogenetico della variazione c.451+3A>T, è stata eseguita l'analisi del trascritto (estrazione di RNA da un frammento bioptico della paziente, retro-trascrizione per ottenere cDNA ed analisi del trascritto tramite sequenziamento diretto): la sostituzione nucleotidica identificata comporta un'alterazione dello *splicing*, che determina l'esclusione totale dell'esone 3. L'analisi bioinformatica (ExpASY Proteomics Server. <http://www.expasy.ch>) ha permesso di predire l'effetto di questa alterazione sulla proteina (scivolamento del modulo di lettura, con creazione di un codone di stop prematuro e traduzione di una proteina tronca), per cui la variazione è da ritenersi una mutazione causa-malattia.

La variazione c.911C>T (p.Ser304Phe) non era riportata in letteratura e i programmi di predizione bioinformatici Polyphen e SIFT la indicano come probabilmente dannosa e non tollerata. Anche la variante c.938C>T (p.Ser313Leu) non è stata identificata in una popolazione di controllo e non è presente nei *database*. Il programma di predizione Polyphen la riporta come probabilmente dannosa. In una famiglia non informativa, è stata riportata la variazione p.Leu312Val in eterozigosi (mutazione privata) come possibilmente dannosa (39, 56). In tutti i tre casi, le variazioni riscontrate

erano associate anche alla variante c.686G>A (p.Arg229Gln) (R229Q), in omozigosi nel primo caso (c.451+3A>T + c.686G>A entrambe in omozigosi) e in eterozigosi composta (c.686G>A e c.938C>T in una paziente e c.686G>A e c.911C>T nell'altra) negli altri due. In questi ultimi, l'analisi dei genitori ha dimostrato che le varianti erano state ereditate ciascuna da un genitore, sano. Il significato della presenza della R229Q negli affetti è stato a lungo dibattuto in letteratura. Infatti, la R229Q è stata identificata con una frequenza allelica del 3.2% in una popolazione di 566 individui sani (57). Tuttavia, in un largo studio americano, essa è stata riportata in associazione a microalbuminuria nella popolazione generale e in alcuni soggetti affetti da sindrome nefrosica, seppur con fenotipo lieve (proteinuria ad esordio tardivo, risposta agli steroidi e progressione lenta) (58). La frequenza allelica della R229Q varia dall'1% all'8% in popolazioni selezionate, con una media del 3-5% negli europei ([www.1000Genomes.org](http://www.1000Genomes.org)) e del 6.7% in un recente studio su una popolazione comprendente soggetti affetti provenienti da Europa e Turchia (52). In un altro studio, la R229Q è stata spesso riscontrata in eterozigosi composta con un'altra mutazione patogenetica di NPHS2 in una popolazione di adulti, portando gli autori ad ipotizzare che essa, pur non essendo patogenetica, possa rappresentare un polimorfismo non-neutro, agendo come *disease modifier* e predisponendo allo sviluppo di proteinuria in presenza di un altro fattore patogenetico. Un'eterozigosi composta per una mutazione di NPHS2 e la R229Q è stata riscontrata nel 23-25% dei soggetti caucasici affetti da sindrome nefrosica familiare autosomica recessiva ad esordio in età adulta e in percentuale variabile, ma molto inferiore (dallo 0-1% al 10-11%), in casi sporadici ad esordio in età adulta (52). Un effetto modificatore della R229Q è ipotizzabile anche nelle nostre due pazienti, che portano l'alterazione in eterozigosi composta con un'altra variazione di sequenza di NPHS2 probabilmente dannosa. Alternativamente, la patologia in queste due bambine potrebbe essere spiegata o dalla presenza di un'altra mutazione nel gene NPHS2, non identificata perché probabilmente localizzata nelle sequenze regolatrici o in regioni non codificanti, oppure dalla presenza di mutazioni di un altro gene (o più geni), che produce un effetto additivo nel contesto di un'ereditarietà digenica (o poligenica). Tuttavia, non sono state identificate alterazioni negli altri 45 geni analizzati tramite NGS, compreso NPHS1 (nefrina), responsabile della sindrome nefrosica finlandese e del quale è nota un'ereditarietà digenica con NPHS2 (59).

Infine, le varianti di significato sconosciuto -52C>G e c.452-31T>C, riscontrate in una bambina con sindrome nefrosica ad esordio a 13 anni e disturbo generalizzato dello sviluppo psicomotorio, angiomas cutanea diffusa e glicosuria normoglicemica, non sono da considerarsi patogenetiche, poiché sono state entrambe ereditate dal padre, non affetto. La paziente ha inoltre risposto alla terapia immunosoppressiva con inibitore della calcineurina e steroide, presentando peraltro una recidiva al tentativo di sospensione del Tacrolimus.

Nei nostri bambini con alterazioni di NPHS2, l'età di esordio della proteinuria era varia (media 5.7 anni, *range* 3 mesi-13 anni), per lo più nell'età tipica della NS idiopatica corticosensibile e l'*outcome* non era diverso tra bambini con età all'esordio  $\leq 1$  anno o superiore: mancata risposta

alla terapia immunosoppressiva con successiva evoluzione verso l'insufficienza renale cronica. Una remissione in risposta a steroide e inibitore della calcineurina si è verificata solo nella bambina in cui le alterazioni riscontrate (-52C>G e c.452-31T>C) sono risultate non patogenetiche. Questo dato è in accordo con la letteratura, in cui le mutazioni di NPHS2 sono state riportate in soggetti di qualsiasi età, compresi gli adulti, e si associano generalmente a resistenza alla terapia ed evoluzione a ESRD (13, 56). Inoltre, in 2 nostri pazienti la manifestazione clinica d'esordio non era la sindrome nefrosica conclamata, bensì una proteinuria (non nefrosica in un caso, nefrosica nell'altro). Considerata la frequenza delle mutazioni di NPHS2 nei casi sporadici (fino al 30%) e familiari (AR, 45-55%), poiché non vi sono caratteristiche cliniche predittive di alterazione di NPHS2, il gene della podocina dovrebbe sempre essere incluso in uno *screening* genetico di pazienti con proteinuria e FSGS, indipendentemente dall'età e dalla presenza di manifestazioni cliniche di NS.

Nella nostra casistica, una mutazione del gene WT1 è stata riscontrata in 11/40 (27.5%) dei pazienti, in associazione a quadro istologico di DMS (5/11 bambini, 45.5%) e FSGS (6/11 bambini, 55.5%). In 4 casi, tutti con quadro istologico di FSGS, si trattava di una nuova mutazione (c.1208G>A, c.1228+2T>G, c.988T>C e c.1115G>A). Negli altri 7 casi (5 con DMS e 2 con FSGS), le alterazioni riscontrate erano mutazioni missenso dell'esone 8 o 9, già note dalla letteratura e associate a sindrome di Denys Drash (DDS) o Frasier (FS) (60). La variabilità fenotipica era ampia: i 5 bambini con mutazione di WT1 associata a DMS avevano presentato l'esordio nel primo anno di vita e decorso severo, con sviluppo di ESRD e trapianto di rene. Tra essi, solo 1 aveva un quadro di DDS completa, con sindrome nefrosica, tumore di Wilm's e pseudoermafroditismo maschile, mentre gli altri 4 avevano DDS incompleta (sindrome nefrosica e pseudoermafroditismo maschile in 1, sindrome nefrosica e tumore di Wilm's in 1 e sindrome nefrosica isolata in 2). Nessuno dei 7 pazienti con mutazione di WT1 e quadro istologico di FSGS aveva presentato l'esordio nel primo anno di vita, ma il decorso è risultato ugualmente severo, con sviluppo di ESRD e trapianto di rene in 5/7; tuttavia, nessuno presentava patologia gonadica o neoplasia.

Tra le nuove mutazioni di WT1 riscontrate, la c.1208G>A (p.Arg403Lys) era una mutazione familiare, identificata in un ragazzo di 16 anni con proteinuria non nefrosica isolata, riscontrata in modo occasionale all'età di 15 anni, ed anamnesi familiare positiva per proteinuria e insufficienza renale cronica da causa non nota, senza manifestazioni extrarenali o neoplastiche, in altri 4 familiari (3 generazioni, trasmissione autosomica dominante), risultati anch'essi portatori della variante identificata nel probando. In letteratura, sono riportati solo altri 4 casi di trasmissione familiare di una mutazione di WT1. Le mutazioni riportate comprendono una *splice site mutation* nell'esone 9, una mutazione nell'esone 10, una mutazione nell'esone 1 ed una nell'esone 9 (61-63). Questi casi erano caratterizzati da un'ampia variabilità fenotipica, non solo inter- ma anche intra-familiare. Il riscontro di una nuova mutazione di WT1 in un paziente senza le caratteristiche fenotipiche tipicamente associate alle alterazioni di tale gene ha suggerito di estendere l'analisi

mutazionale di WT1 a tutti i pazienti con proteinuria associata a FSGS, indipendentemente dall'età e dalla presenza delle caratteristiche cliniche tipiche delle forme associate a mutazioni di tale gene. L'analisi è stata pertanto eseguita su una coorte storica di 22 soggetti sottoposti a trapianto di rene per insufficienza renale terminale secondaria a sindrome nefrosica, che non erano stati precedentemente studiati dal punto di vista molecolare, con riscontro di 4 mutazioni di WT1, 1 delle quali nuova (c.988T>C, in associazione a FSGS). Nessuno dei 4 pazienti presentava manifestazioni extrarenali né ha sviluppato neoplasia nel corso del *follow up*. In letteratura, le alterazioni di WT1 associate a nefropatia sono generalmente di 2 tipi: mutazioni dell'esone 8 o 9 in pazienti con DMS nel contesto della DDS e mutazioni nel sito donatore di *splicing* dell'introne 9 in pazienti con FSGS nel contesto della FS. Tuttavia, le mutazioni dello *splice donor site* dell'introne 9 sono state riportate anche in pazienti con DMS, pseudoermafroditismo o disgenesi gonadica, con o senza gonadoblastoma, e mutazioni missenso dell'esone 8 o 9 sono state descritte in associazione con FSGS a disgenesi gonadica (64-66). Inoltre, sono riportati casi di FSGS o DMS isolata associata indifferentemente a mutazioni nell'introne 9 o nell'esone 8 o 9 (67-71). Sebbene numericamente scarsi, questi dati sottolineano che la variabilità fenotipica delle mutazioni di WT1 è probabilmente anche più ampia di quanto finora descritto, con quadri istopatologici di DMS o FSGS e fenotipo clinico di glomerulopatia isolata (che può manifestarsi con sindrome nefrosica corticoresistente o proteinuria isolata), DDS o FS o a volte caratteristiche intermedie tra le due sindromi (44, 66). Tale variabilità potrebbe essere spiegata dal fatto che, oltre al suo tradizionale ruolo di regolatore della proliferazione, WT1 può anche influenzare l'architettura citoscheletrica del podocita. Diversi studi hanno infatti dimostrato che tra i geni *target* di WT1 vi sono geni che codificano fattori di trascrizione (come PAX2), fattori di crescita e loro recettori (EGR1, EGFR, IGFR1R, TGF-beta1, IGF2, IGFR, PDGF-A, VEGF) e anche proteine podocitarie come la nefrina e la podocalixina (116). Poiché il funzionamento della barriera di filtrazione richiede l'interazione di molteplici vie di segnale tra cellule endoteliali, mesangiali e podocitarie, una corretta interazione di WT1 con i suoi geni *target* appare cruciale per il mantenimento di questa complessa struttura. Inoltre, studi di proteomica in pazienti con DDS hanno dimostrato che WT1 regola anche l'espressione di proteine coinvolte nel mantenimento dell'architettura del citoscheletro podocitario, come cofilina, calponina, elfina, hsp27, vinculina e nestina, la cui mis-espressione si associa a disfunzione podocitaria con sviluppo di proteinuria (72-74). Il poliedrico ruolo di WT1 nello sviluppo renale e nel mantenimento delle funzioni del podocita potrebbe rendere ragione della proteinuria in assenza di alterazioni dello sviluppo genitourinario o tumore di Wilms in alcuni soggetti.

Una delle nuove mutazioni di WT1 riscontrate (c.988T>C; p. p.Cys330Arg) era localizzata nell'esone 7 del gene. Dalla letteratura, emerge un numero crescente di mutazioni di WT1 in regioni diverse dagli *hot spot* dell'esone 8 e 9, suggerendo che le alterazioni di WT1 siano sottostimate e che analizzando l'intera sequenza del gene possano essere individuate mutazioni finora non identificate. L'analisi dell'intero gene e l'estensione dello studio molecolare a pazienti

con proteinuria o sindrome nefrosica senza le manifestazioni cliniche tipicamente associate alle mutazioni di WT1 potrebbero spiegare l'elevata frequenza delle alterazioni di WT1 nella nostra casistica, significativamente più elevata rispetto a quanto riportato in letteratura, ove è descritta una frequenza di 8.5% in un largo studio mondiale su 1368 bambini (36 famiglie) e del 4% in un recente *screening* su 227 pazienti (età 10-20 anni) europei e turchi (20, 52).

Nella nostra casistica, un'alterazione di sequenza del gene PLCE1 è stata identificata in 3/40 pazienti (c.4570\_4571delAT in una coppia di fratelli e c.4327G>A+c.2038C>T in una ragazza). In tutti i casi, l'alterazione riscontrata era nuova. Tuttavia, mentre è ipotizzabile un effetto patogenetico per le mutazioni c.4327G>A (p.Gly1443Arg) +c.2038C>T (p.Gln680X) in eterozigosi composta (genitori eterozigoti per una variante ciascuno), il possibile ruolo patogenetico della variazione riscontrata nei due fratelli è di più difficile interpretazione. Entrambi i fratelli presentavano inoltre un noto polimorfismo di NPSH2 (P20L). Il fenotipo era severo in entrambi, con evoluzione a ESRD e trapianto di rene. La sorella maggiore aveva ricevuto un primo trapianto dal padre, presentando recidiva di malattia. Inaspettatamente, l'analisi genetica nel padre è risultata negativa, mentre entrambe le variazioni (PLCE1 e NPHS2) erano state ereditate dalla madre, sana. In una casistica mondiale di 139 pazienti (95 casi familiari e 44 sporadici) con sindrome nefrosica associata a DMS o FSGS, sono stati descritti 3 casi (in 3 famiglie) di portatori omozigoti asintomatici della mutazione omozigote riscontrata nel probando affetto (75). Un altro caso analogo (figlio omozigote affetto e padre omozigote asintomatico) era già stato precedentemente riportato (76). Questi reperti, inattesi in una patologia autosomica recessiva, erano giustificati con l'ipotesi di un'ereditarietà oligogenica, per cui in pazienti con due mutazioni di PLCE1, la presenza di una terza mutazione patogenetica in un altro gene renderebbe ragione del fenotipo clinico o, in alternativa, nei soggetti asintomatici, la presenza di un allele modificatore protettivo compenserebbe la disfunzione di PLCE1, analogamente a quanto avviene in altre malattie genetiche (75). L'applicazione di tale ipotesi, ma al contrario, ai nostri pazienti (affetti, che però portano una sola variazione di sequenza del gene), potrebbe giustificare il fenotipo clinico se vi fosse la contemporanea presenza di altre mutazioni in uno o più geni o un effetto protettivo compensatorio nella madre, portatrice non affetta delle medesime alterazioni riscontrate nei due ragazzi. Tuttavia, gli altri geni analizzati nei probandi (tra cui NPHS2 e NPHS1) sono risultati negativi. Un effetto compensatorio della funzione di PLCE1 e preventivo dello sviluppo della malattia nella madre potrebbe essere esercitato da un altro membro della famiglia PLC, tuttavia non sono state condotte ulteriori indagini genetiche nella signora.

Per quanto riguarda la frequenza di mutazione di PLCE1, è riportato che le alterazioni di questo gene rappresentano la causa più frequente di DMS isolata in bambini con analisi molecolare negativa per il gene WT1, con una frequenza del 28.6% in una popolazione internazionale di 35 famiglie (20). Più recentemente, è stata riportata una frequenza di mutazione del 50% in famiglie con DMS e del 21% in casi sporadici (75). Nella serie originariamente descritta da Hinkes et al.,

erano state identificate mutazioni tronche di PLCE1 in 12 bambini (6 famiglie) con sindrome nefrosica ad esordio entro i 4 anni di vita, quadro istologico di DMS, e decorso severo con evoluzione a ESRD in 4/6. In 2 casi, si era invece verificata una risposta alla terapia immunosoppressiva, spiegata con l'ipotesi di un'induzione, da parte dello steroide o dell'inibitore della calcineurina di un meccanismo ridondante, come l'attivazione di un'altra fosfolipasi C. Nella medesima casistica, erano riportati anche 2 pazienti con mutazione missenso di PLCE1, quadro istologico di FSGS ad esordio tardivo e progressione lenta. L'autore speculava che questa associazione riflettesse una precisa correlazione genotipo-fenotipo, in cui la DMS è causata da un arresto dello sviluppo dovuto a mutazioni che producono una proteina tronca e quindi non funzionante, mentre la FSGS è il risultato di un difetto molecolare meno severo (mutazione missenso), in cui la proteina funziona, ma a basso livello (19). Tale ipotesi non è stata confermata dallo *screening* di 31 soggetti con FSGS (69 famiglie), in cui non sono state riscontrate mutazioni (20). Più recentemente, è stata riportata una frequenza di mutazione di PLCE1 del 12% in casi familiari di FSGS, mentre non sono state riscontrate mutazioni in casi sporadici di FSGS (75). Nella nostra serie, la frequenza delle mutazioni di PLCE1 è stata globalmente del 5% (1/40 pazienti), ma aumenta al 33% (1/3 pazienti), dato in linea con quanto precedentemente pubblicato, se si considerano solo i pazienti con DMS isolata e analisi molecolare negativa per WT1 (3 bambini). Nei nostri pazienti, l'età d'esordio era variabile (18 mesi, 3 anni, 13 anni), così come le manifestazioni cliniche (sindrome nefrosica con ESRD ad esordio entro i 3 anni di vita in due bambine, proteinuria non nefrosica ad esordio tardivo e successiva evoluzione a ESRD nel fratello minore di una di esse) e il quadro istologico (DMS in una paziente, FSGS nei due fratelli); tuttavia, il decorso di malattia è stato severo in tutti i casi (dialisi e trapianto) e non si è osservata risposta alla terapia immunosoppressiva nell'unico caso in cui è stata somministrata. Anche nella recente letteratura, è riportata una certa eterogeneità fenotipica (clinica e istologica), senza chiare associazioni genotipo-fenotipo, contrariamente a quanto originariamente ipotizzato (20, 75). Tale eterogeneità potrebbe anche rendere ragione dell'inattesa risposta all'immunosoppressione nei 2 pazienti di Hinkes et al., ma sembra soprattutto rafforzare l'ipotesi che altri geni modificatori o fattori epigenetici possano giocare un ruolo nella patogenesi della malattia, rendendone più complessa anche la prognosi (20, 75).

In metà dei nostri casi, l'analisi genetica, anche con metodica NGS, è risultata negativa. In questi soggetti, è utile eseguire anche la ricerca del suPAR o il test di permeabilità glomerulare all'albumina, che possono fornire indicazioni sia sulla possibile eziologia immunomediata della sindrome nefrosica, sia sulla possibilità di recidiva sul rene trapiantato, essendo la positività del test potenzialmente predittiva di ricaduta (38). Oltre all'utilità in termini di definizione diagnostica, le informazioni provenienti dai test molecolari e di permeabilità, possono avere, nel loro complesso, un'elevata utilità clinica, rappresentando un'indicazione a proseguire una terapia immunosoppressiva (steroidi, inibitori della calcineurina, citotossici, anticorpi monoclonali) o a

intraprendere una terapia aspecifica antiproteinurica-renoprotettiva (ACE-inibitori e sartanici). Inoltre, essi possono essere utili nella formulazione prognostica a lungo termine (rischio di ricaduta sul rene trapiantato) e nella definizione di una strategia terapeutica per il trapianto di rene, in termini di scelta del donatore (non vivente e congiunto vivente) e di disegno terapeutico (plasmaferesi pre-, intra e postoperatoria, scelta dei farmaci immunosoppressori, utilizzo di anticorpi monoclonali). Dall'altra parte, l'impossibilità di individuare una mutazione causa-malattia in un significativo numero di casi suggerisce sia la necessità di approfondire il possibile ruolo patogenetico dei geni già noti nelle forme cui si associano più frequentemente (ad esempio, estendendo l'analisi mutazionale a tutta la sequenza del gene e non solo agli *hot spots*) e a quelle con le quali l'associazione è meno comune, sia la possibile esistenza di altri geni patogenetici, ancora non noti. Ulteriori studi, sia sull'animale sia nell'uomo, potranno condurre all'identificazione di nuovi geni candidati ed aumentare le conoscenze riguardo ai meccanismi patogenetici.



## CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, la comprensione dei difetti genetici associati alle glomerulopatie proteinuriche ha posto al centro dell'attenzione il podocita, aprendo nuove prospettive nella conoscenza dei meccanismi patogenetici delle diverse podocitopatie. Sebbene lo sviluppo della glomerulopatia che determina la proteinuria non sia unicamente spiegato dalla presenza di un'anomalia genetica, una diagnosi di malattia genetica può risultare l'elemento di svolta nella definizione del percorso diagnostico, delle strategie terapeutiche e della prognosi del singolo paziente (specie se si considera che non vi sono caratteristiche cliniche che permettano di distinguere a priori una forma genetica da una forma immunomediata), consentendo di aumentare l'efficacia e l'efficienza delle cure e di ottimizzare le risorse sanitarie. L'analisi tramite sequenziamento diretto di geni candidati in forme monogeniche ad elevata penetranza di sindrome nefrosica ha rappresentato una svolta epocale nella conoscenza del *background* genetico di questa patologia. Tuttavia, il numero crescente di geni identificati e, dall'altra parte, l'assenza di mutazioni in un largo numero di affetti, hanno anche evidenziato come la sindrome nefrosica sia in realtà una patologia complessa, anche dal punto di vista molecolare, caratterizzata da un'elevata eterogeneità genetica, aprendo la via all'utilizzo di tecnologie come la NGS, che hanno il vantaggio di analizzare contemporaneamente e in modo rapido un elevato numero di geni e di individui. Tuttavia, paradossalmente, proprio la disponibilità di un'enorme mole di informazioni genetiche in contemporanea richiede cautela nell'interpretazione dei risultati, specie ove vengano identificate nuove variazioni di sequenza o più alterazioni in un singolo paziente e se questi dati possano avere delle implicazioni cliniche dirette. Tale limite potrebbe essere superato dalla condivisione dei dati in *database* specifici per patologia, completi di dati clinici e molecolari e comprendenti anche le varianti più rare. In tale ottica, sarà utile poter disporre di *database* genetici che includano anche individui appartenenti a gruppi etnici finora poco studiati, in modo da poter disporre del maggior numero di informazioni possibile.



## BIBLIOGRAFIA

1. Hogg RJ, Harris S, Lawrence DM, et al. Renal tract abnormalities detected in Australian preschool children. *J Paediatr Child Health*. 1998;34:420-4.
2. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; 88:451-87.
3. Buscher AK and Weber S. The podocitopathies. *Eur J Pediatr* 2012;171:1151-1160.
4. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:201-16.
5. Fogo A, Kashgarian M. *Diagnostic Atlas of Renal Pathology*, 1st Ed. Elsevier Saunders, 2005.
6. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, et al. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis*. 2004;43:368-82.
7. Franceschini N, North KE, Kopp JB, et al. NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review. *Genet Med*. 2006;8:63-75.
8. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:529-42.
9. Vats A, Nayak A, Ellis D, et al. Familial nephrotic syndrome: clinical spectrum and linkage to chromosome 19q13. *Kidney Int*. 2000;57:875-81.
10. Izzedine H, Brocheriou I, Eymard B, et al. Loss of podocyte dysferlin expression is associated with minimal change nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2006;48:143-50.
11. Southwest Pediatric Nephrology Study Group, Focal segmental glomerulosclerosis in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 1985;27:442-49.
12. Niaudet P, Gubler MC. WT1 and glomerular diseases. *Pediatr Nephrol*. 2006;21:1653-60.
13. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2000;24:349-54.
14. Roselli S, Gribouval O, Boute N, et al., Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002;160:131-9.
15. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, et al. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int*. 2004;66:571-9.
16. Morrison AA, Viney RL, Saleem MA, et al. New insights into the function of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295:F12-7.
17. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, et al. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*. 1991;67:437-47.
18. Wing MR, Bourdon DM, Harden TK. PLC-epsilon: a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G alpha beta gamma-mediated signaling. *Mol Interv* 2003;3:273-280.

19. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, et al. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet.* 2006;38:1397-405.
20. Gbadegesin R, Hinkes BG, Hoskins BE, et al. Mutations in PLCE1 are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS). *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:1291-7.
21. Jalanko H. Congenital nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009;24:2121-28.
22. Caridi G, Trivelli A, Sanna-Cherchi S, et al. Familial forms of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:241-52.
23. Liu L, Doné SC, Khoshnoodi J, et al. Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2637-44.
24. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics.* 1999;58:113-20.
25. Reiser J, Polu KR, Möller CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 2005;37:739-74.
26. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2000;24:251-6.
27. Weins A, Kenlan P, Herbert S, et al. Mutational and Biological Analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:3694-701.
28. Choi HJ, Lee BH, Cho HY, et al. Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an ACTN4 mutation and paternal germline mosaicism. *Am J Kidney Dis.* 2008;51:834-8.
29. Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science.* 1999;286:312-5.
30. Löwik MM, Groenen PJ, Pronk I, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation. *Kidney Int.* 2007;72:1198-203.
31. Kim JM, Wu H, Green G. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science.* 2003;300:1298-1300.
32. Gigante M, Pontrelli P, Montemurno E, et al. CD2AP mutations are associated with sporadic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:1858-64.
33. Avner E, Harmon W, Niaudet P et al. *Pediatric Nephrology*, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2009.
34. Wong W, Idiopathic nephrotic syndrome in New Zealand children, demographic, clinical features, initial management and outcome after twelve-month follow-up: results of a three-year national surveillance study. *J Paediatr Child Health* 2007;43:337-41.

35. Hodson EM, Alexander SI. Evaluation and management of steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:145-50.
36. Ehrich JH, Geerlings C, Zivicnjak M, et al. Steroid-resistant idiopathic childhood nephrosis: overdiagnosed and undertreated. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:2183-93.
37. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, Maiguel D, Karumanchi SA, Yap HK, Saleem M, Zhang Q, Nikolic B, Chaudhuri A, Daftarian P, Salido E, Torres A, Salifu M, Sarwal MM, Schaefer F, Morath C, Schwenger V, Zeier M, Gupta V, Roth D, Rastaldi MP, Burke G, Ruiz P, Reiser J. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*. 2011;17:952-60.
38. Musante L, Candiano G, Bruschi M, Zennaro C, Carraro M, Artero M, Giuffrida MG, Conti A, Santucci A, Ghiggeri GM. Characterization of plasma factors that alter the permeability to albumin within isolated glomeruli. *Proteomics*. 2002;2:197-205.
39. Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet*. 2009;18:R185-94.
40. Schwartz GJ, Brion LP, Spitzer A. The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatr Clin North Am*. 1987;34:571-90.
41. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. [www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines](http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines).
42. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;1:575-82.
43. Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, et al. Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet*. 1995;4:2155-8.
44. Jeanpierre C, Denamur E, Henry I, et al. Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutations database. *Am J Hum Genet*. 1998;62:824-33.
45. Avis HJ, Vissers MN, Wijburg FA, et al. The use of lipid-lowering drug therapy in children and adolescents. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10:224-31.
46. Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(4):CD001533.
47. Sümegi V, Haszon I, Bereczki C, et al. Long-term follow-up after cyclophosphamide and cyclosporine-A therapy in steroid-dependent and -resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2008;23:1085-92.
48. Bhimma R, Adhikari M, Asharam K, et al. Management of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis in children using tacrolimus. *Am J Nephrol*. 2006;26:544-51.

49. Kikuchi H, Takata A, Akasaka Y, et al. Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genet.* 1998;35:45-8.
50. Pollak MR. Focal segmental glomerulosclerosis: recent advances. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17:138-42.
51. Teer JK, Mullikin JC. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum Mol Genet.* 2010;19:R145-51.
52. Lipska BS, Iatropoulos P, Maranta R, Caridi G, Ozaltin F, Anarat A, Balat A, Gellermann J, Trautmann A, Erdogan O, Saeed B, Emre S, Bogdanovic R, Azocar M, Balasz-Chmielewska I, Benetti E, Caliskan S, Mir S, Melk A, Ertan P, Baskin E, Jardim H, Davitaia T, Wasilewska A, Drozd D, Szczepanska M, Jankauskiene A, Higuaita LM, Ardissino G, Ozkaya O, Kuzma-Mroczkowska E, Soylemezoglu O, Ranchin B, Medynska A, Tkaczyk M, Peco-Antic A, Akil I, Jarmolinski T, Firszt-Adamczyk A, Dusek J, Simonetti GD, Gok F, Gheissari A, Emma F, Krmar RT, Fischbach M, Printza N, Simkova E, Mele C, Ghiggeri GM, Schaefer F; PodoNet Consortium. Genetic screening in adolescents with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2013;84:206-13.
53. McCarthy HJ, Bierzynska A, Wherlock M, Ognjanovic M, Kerecuk L, Hegde S, Feather S, Gilbert RD, Krischock L, Jones C, Sinha MD, Webb NJ, Christian M, Williams MM, Marks S, Koziell A, Welsh GI, Saleem MA; RADAR the UK SRNS Study Group. Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8:637-48.
54. Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B, García-Maset R, Giménez I, Silva I, Ruíz P, Ballarín J, Torra R, Ars E. Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6:1139-48.
55. Caridi G, Perfumo F, Ghiggeri GM. NPHS2 (Podocin) mutations in nephrotic syndrome. Clinical spectrum and fine mechanisms. *Pediatr Res.* 2005;57:54R-61R.
56. Tonna SJ, Needham A, Polu K, et al. NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC Nephrology* 2008;9:13-23.
57. Caridi G, Bertelli R, Di Duca M et al. Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1278-86.
58. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, et al. NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int.* 2004;65:1026-30.
59. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA, Schachter AD, Poch E, Abreu PF, Appel GB, Pereira AB, Kalluri R, Pollak MR. NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest.* 2002;110:1659-66.
60. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Human Mutat* 1997;9:209-25.

61. Mucha B, Ozaltin F, Hinkes BG, et al. Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res.* 2006;59:325-31.
62. Zirn B, Wittmann S, Gessler M, et al. Novel familial read-through mutation associated with Wilms tumor and slow progressive nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2005;45:1100-4.
63. Regev M, Kirk R, Mashevich M, Bistritzer Z, Reish O: Vertical transmission of a mutation in exon 1 of the WT1 gene: lessons for genetic counseling. *Am J Med Genet. Part A* 2008;146A:2332-6.
64. McTaggart SJ, Algar E, Chow CW, et al. Clinical spectrum of Denys-Drash and Frasier syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2001;16: 335-9.
65. Kohsaka T, Tagawa M, Takekoshi Y, et al. Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Hum Mutat.* 1999;14:466-70.
66. Kaltenis P, Schumacher V, Jankauskiene A, et al. Slow progressive FSGS associated with an F392L WT1 mutation. *Pediatr Nephrol.* 2004;19:353-6.
67. Denamur E, Bocquet N, Mougnot B, et al. Mother-to-child WT1 splice-site mutation is responsible for distinct glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:2219-23.
68. Kikuchi H, Takata A, Akasaka Y, et al. Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genet.* 1998;35:45-8.
69. Tsuda M, Owada M, Tsuchiya M, et al. WT1 nephropathy in a girl with normal karyotype (46,XX). *Clin Nephrol.* 1999;51:62-3.
70. Yang Y, Jeanpierre C, Dressler GR, et al. WT1 and PAX2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *Am J Pathol.* 1999;154:181-92.
71. Mucha B, Ozaltin F, Hinkes BG, et al. Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res.* 2006;59:325-31.
72. Viney RL, Morrison AA, van den Heuvel LP, et al. A proteomic investigation of glomerular podocytes from a Denys-Drash syndrome patient with a mutation in the Wilms tumour suppressor gene WT1. *Proteomics* 2007;7: 804-15.
73. Wagner N, Wagner K-D, Scholz H, et al. Intermediate filament protein nestin is expressed in the developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2006;291: R779-87.
74. Su W, Chen J, Yang H, et al. Expression of nestin in the podocytes of normal and diseased human kidneys. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2007;292:R1761-67.
75. Boyer O, Benoit G, Gribouval O, Nevo F, Pawtowski A, Bilge I, Bircan Z, Deschênes G, Guay-Woodford LM, Hall M, Macher MA, Soulami K, Stefanidis CJ, Weiss R, Loirat C, Gubler MC, Antignac C. Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *J Med Genet.* 2010;47:445-52.

76. Gilbert RD, Turner CL, Gibson J, Bass PS, Haq MR, Cross E, Bunyan DJ, Collins AR, Tapper WJ, Needell JC, Dell B, Morton NE, Temple IK, Robinson DO. Mutations in phospholipase C epsilon 1 are not sufficient to cause diffuse mesangial sclerosis. *Kidney Int.* 2009;75:415-9



Figure 1. Diagnostic algorithm.

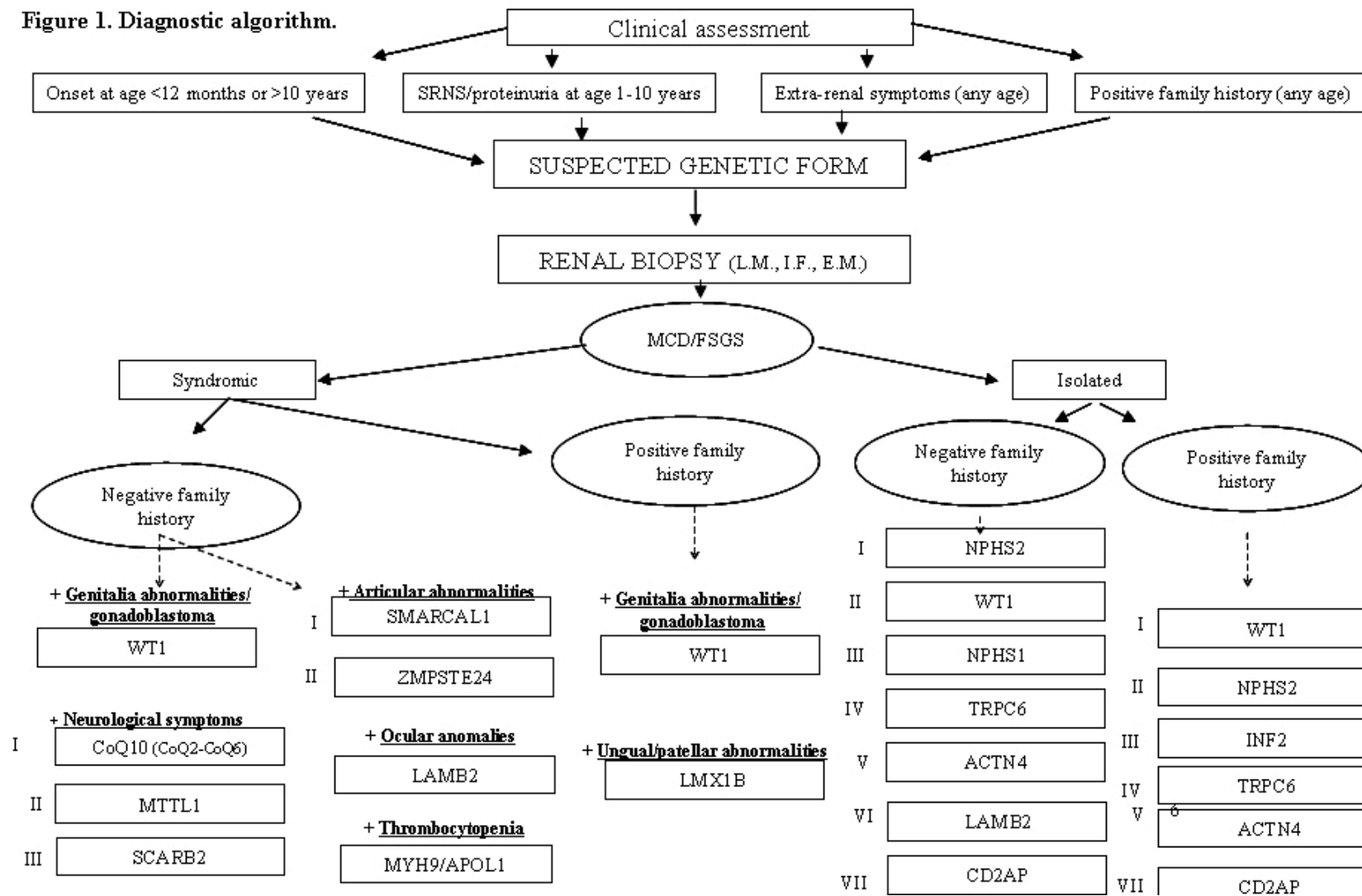
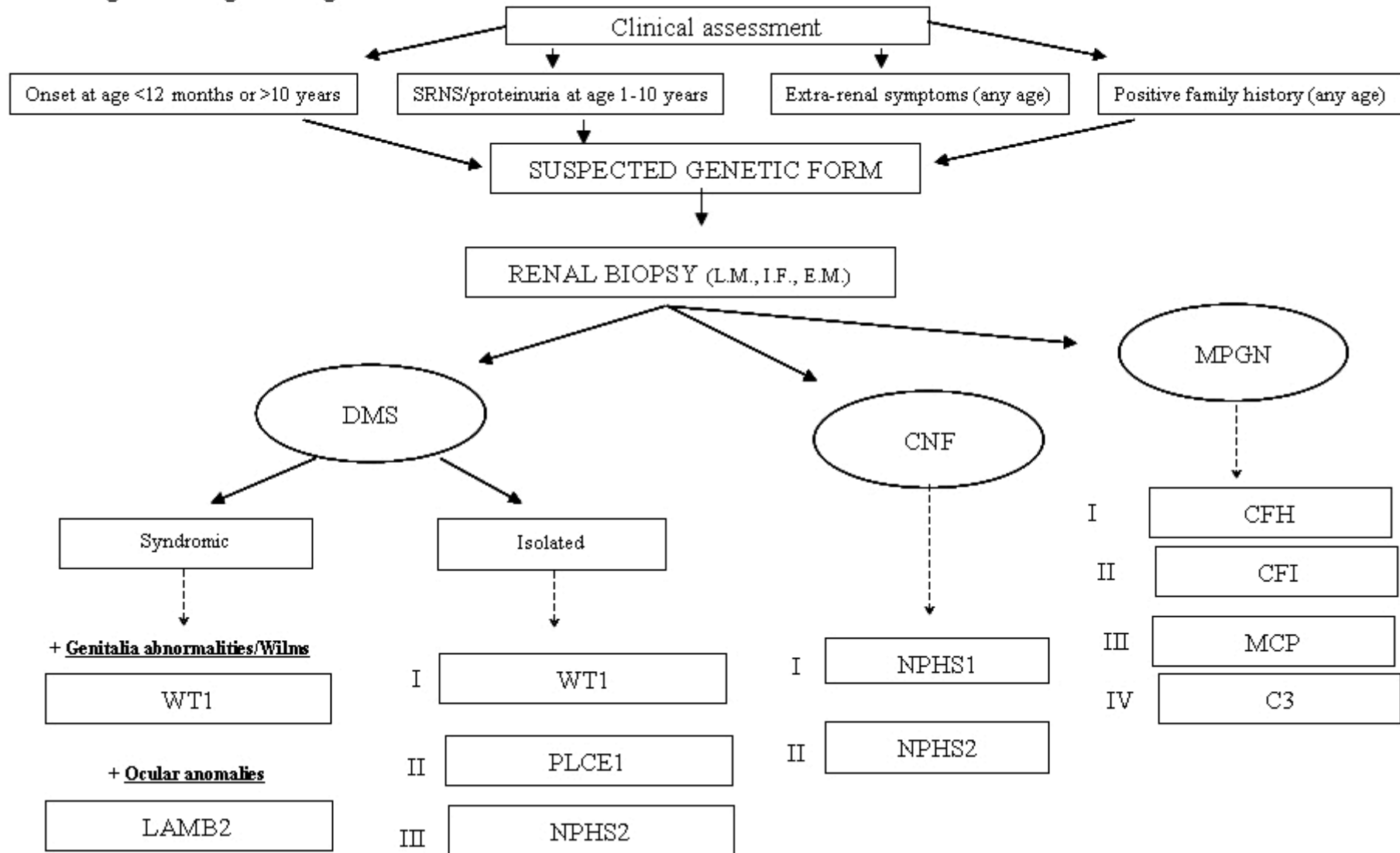


Figure 2. Diagnostic algorithm.



**TABELLA 1.** Geni inclusi nell'array di sequenziamento tramite NGS.

Gene	Protein	Locus	Exons
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1 isoform D	chr11:32409325-32457087	10
<i>WTIP</i>	Wilms tumor 1 interacting protein	chr19:34972880-34992084	10
<i>BASP1</i>	brain abundant, membrane attached signal protein	chr5:17217750-17276935	2
<i>PAX2</i>	paired box protein 2 isoform e	chr10:102505468-102589697	10
<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription factor 1, beta	chr9:129376748-129463311	8
<i>LDB1</i>	LIM domain binding 1 isoform 1	chr10:103867327-103880210	11
<i>TCF21</i>	transcription factor 21	chr6:134210259-134213391	2
<i>MAFB</i>	transcription factor MAFB	chr20:39314519-39317876	1
<i>NPHS1</i>	nephrin precursor	chr19:36316274-36342739	29
<i>NPHS2</i>	podocin	chr1:179519677-179545084	8
<i>CD2AP</i>	CD2-associated protein	chr6:47445525-47594994	18
<i>FOXC2</i>	forkhead box C2	chr16:86600857-86602535	1
<i>CITED2</i>	Cbp/p300-interacting transactivator, with	chr6:139693397-139695785	2
<i>NF-Kb1</i>	nuclear factor kappa-B, subunit 1 isoform 1	chr4:103422486-103538458	24
<i>SMAD7</i>	SMAD family member 7	chr18:46446224-46477081	4
<i>TGFB</i>	transforming growth factor, beta 1 precursor	chr19:41836651-41859816	7
<i>ZHX1</i>	zinc fingers and homeoboxes 1	chr8:124260697-124286547	4
<i>ZHX2</i>	zinc fingers and homeoboxes 2	chr8:123793901-123986755	4
<i>ZHX3</i>	zinc fingers and homeoboxes 3	chr20:39807089-39928739	4
<i>RBPJ-K</i>	recombining binding protein suppressor of	chr4:26322448-26433278	11
<i>SYNPO</i>	synaptopodin isoform A	chr5:150020220-150038792	3
<i>ACTN4</i>	actinin, alpha 4	chr19:39138327-39221170	21
<i>INF2</i>	inverted formin 2 isoform 1	chr14:105155943-105185947	23
<i>PALLD</i>	palladin isoform 2	chr4:169418217-169849607	21
<i>ITGA3</i>	integrin alpha 3 isoform b precursor	chr17:48133340-48167848	26
<i>ITG1BP1</i>	integrin cytoplasmic domain-associated protein 1	chr2:9545823-9563643	7
<i>CTSL1</i>	cathepsin L1 preproprotein	chr9:90340974-90346382	8
<i>TRPC6</i>	transient receptor potential cation channel,	chr11:101322296-101454659	13
<i>KIRREL</i>	kin of IRRE like precursor	chr1:157963063-158065842	15
<i>KIRREL3</i>	kin of IRRE like 3 isoform	chr11:126293397-126870766	16
<i>LAMB2</i>	laminin, beta 2 precursor	chr3:49158548-49170599	33
<i>PODXL</i>	podocalyxin-like isoform 2 precursor	chr7:131185023-131241376	8
<i>PLCE1</i>	phospholipase C, epsilon 1 isoform 1	chr10:95753746-96088146	32
<i>SCARB2</i>	scavenger receptor class B, member 2	chr4:77079894-77135035	12
<i>CoQ10A</i>	coenzyme Q10 homolog A isoform a	chr12:56660642-56664748	5
<i>CoQ10B</i>	coenzyme Q10 homolog B precursor	chr2:198318231-198339851	5
<i>CoQ2</i>	para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase,	chr4:84184979-84205964	7
<i>PDSS2</i>	prenyl diphosphate synthase, subunit 2	chr6:107473761-107780779	8
<i>SMARCAL1</i>	SWI/SNF-related matrix-associated	chr2:217277473-217347772	18
<i>CD151</i>	CD151 antigen	chr11:832952-838834	9
<i>LMNA</i>	lamin A/C isoform 1 precursor	chr1:156084461-156109878	12
<i>ZMPSTE24</i>	zinc metalloproteinase STE24	chr1:40723733-40759855	10
<i>MYH9</i>	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	chr22:36677324-36784063	42
<i>PTPRO</i>	receptor-type protein tyrosine phosphatase O	chr12:15475487-15750335	27
<i>MYO1E</i>	myosin IE	chr15:59428564-59665071	28
<i>NOTCH1</i>	notch1	chr9:139388897-139440238	34
<b>Total 46</b>			610

**Tabella 2.** Caratteristiche dei pazienti.

Paziente	Età esordio	Fenotipo clinico	Stadio CKD esordio	Terapia	Istologia	Gene	Variazione sequenza	Outcome	Stato attuale
1	7 anni	NS	1	Medica (steroidi, ciclosporina, ACE-i)	FSGS	NPHS2	c.451+3A>T + c.686G>A (p.Arg229Gln)	ESRD, dialisi peritoneale, trapianto, rigetto	Trapianto funzionante
2	6 anni	NS	1	Medica (steroidi, ACE-i)	FSGS	NPHS2	c.506T>C (p.Leu169Pro)	CKD stadio 1	Terapia medica conservativa
3	4 anni	Proteinuria non nefrosica	1	Medica (steroidi, ACE-i)	FSGS	NPHS2	c.506T>C (p.Leu169Pro)	CKD stadio 1	Terapia medica conservativa
4	13 anni	NS, ritardo PM, angiomasiosi	1	Medica (steroidi, tacrolimus)	FSGS	NPHS2	-52C>G + c.452-31T>C	Remissione di malattia	Remissione
5	4 anni	NS	1	Medica (steroidi, CFA, tacrolimus, ACE-i, ARB)	FSGS	NPHS2	R229Q e c.911C>T p.Ser304Phe	CKD stadio 2	CKD stadio 2
6	3 mesi	Proteinuria non nefrosica	1	Medica (ACE-i, steroidi, tacrolimus)	FSGS	NPHS2	R229Q e c.938C>T p.Ser313Leu esone 8	CKD stadio 1	CKD stadio 1
7	3 mesi	NS (DDS)	5	Dialisi peritoneale, binefrectomia	DMS	WT1	c.1096C>T (p.Arg366Cys)	Trapianto	Trapianto funzionante
8	8 mesi	NS e Wilms (DDS)	5	Dialisi peritoneale, binefrectomia, chemioterapia	DMS	WT1	c.1186G>A (p.Asp396Asn)	Dialisi peritoneale, trapianto, espanto, dialisi peritoneale, trapianto	Trapianto funzionante
9	8 mesi	NS e ipertensione (DDS)	5	Dialisi peritoneale	DMS	WT1	c.1181G>T (p.Arg394Leu)	Trapianto (espanto), Wilms, binefrectomia, chemio e radioterapia, carcinoma tiroideo, trapianto vivente	Trasferimento adulti
10	2 mesi	NS (DDS)	5	Dialisi peritoneale, nefrectomia preventiva	DMS	WT1	c.1096C>T (p.Arg366Cys)	Dialisi peritoneale, trapianto	Trapianto funzionante
11	16 anni	Proteinuria non nefrosica	1	Medica (ACE-i)	FSGS	WT1	c.1208G>A (p.Arg403Lys)	CKD stadio 1	Terapia medica conservativa
12	12 anni	NS	1	Emodialisi, Dialisi peritoneale, trapianto	FSGS	WT1	c.988T>C p.Cys330Arg (esone 7)	Trapianto	Trasferimento adulti
13	2 anni	NS	1	Medica (steroidi, CFA), dialisi peritoneale	FSGS	WT1	c.1180C>T p.Arg394Trp (esone 9)	Trapianto	Trapianto funzionante
14	12 mesi	NS	5	Dialisi peritoneale, trapianto	DMS	WT1	c.1180C>T p.Arg394Trp (esone 9)	Trapianto	Trasferimento adulti
15	2 anni	NS	1	Medica (steroidi, CFA), dialisi peritoneale	FSGS	WT1	c.1180C>T p.Arg394Trp (esone 9)	Trapianto	Trapianto funzionante
16	3 anni	NS	1	Medica (MMF, steroidi, tacrolimus, ACEi, ARB)	FSGS	WT1	c.1228+2T>G (esone 9)	CKD stadio 1	CKD stadio 1
17	5 anni	NS	5	Emodialisi, Dialisi peritoneale	FSGS	WT1	c.1115G>A p.Arg372Lys (esone 8)	Trapianto	Trapianto funzionante
18	3 anni	Insufficienza renale scompensata e proteinuria nefrosica	5	Dialisi peritoneale	DMS	PLCE1	c.4327G>A (p.Gly1443Arg)+c.2038C>T (p.Gln680X)	Trapianto	Trapianto funzionante
19	18 mesi	NS	5	Dialisi peritoneale	FSGS	NPHS2 e PLCE1	c.59C>T (p.Pro20Leu) NPHS2 e c.4570_4571delAT (p.Met1524Alafs*5) PLCE1	I trapianto con ricaduta. Il trapianto.	CKD stadio 3-4
20	13 anni	Proteinuria nefrosica, piede torto, distrofia muscolare	3	Medica (ACE-i)	FSGS	NPHS2 e PLCE1	c.59C>T (p.Pro20Leu) NPHS2 e c.4570_4571delAT (p.Met1524Alafs*5) PLCE1	ESRD, emodialisi, trapianto	Trapianto funzionante

LEGENDA. NS: sindrome nefrosica. PM: psicomotorio. DDS: sindrome di Denys Drash. CFA: ciclofosfamide. FSGS: glomerulosclerosi focale segmentale. DMS: sclerosi mesangiale diffusa. ESRD: *end stage renal disease*. CKD: insufficienza renale cronica.

**Tabella 3.** Caratteristiche dei pazienti.

Paziente	Età esordio	Fenotipo clinico	Stadio CKD esordio	Terapia	Istologia	Variazione sequenza	Outcome	Stato attuale
21	4 mesi	NS	1	Medica sintomatica	DMS	Nessuna	ESRD, emodialisi, trapianto, ricaduta	Remissione, ma CKD stadio 2
22	7 mesi	NS	1	Medica sintomatica	DMS	Nessuna	ESRD, dialisi peritoneale, trapianto	Trapianto funzionante
23	4 anni	NS	1	Medica (steroidi)	FSGS	Nessuna	ESRD, emodialisi, trapianto, ricaduta, remissione, trapianto funzionante	Perso al follow up
24	12 anni	NS	1	Medica (steroidi)	FSGS	Nessuna	ESRD, emodialisi, trapianto, ricaduta, Non remissione	Emodialisi
25	12 mesi	NS	1	Medica (steroidi)	FSGS	Nessuna	Remissione di malattia	Persa al follow up
26	10 anni	NS e ipertensione	1	Medica (steroidi)	FSGS	Nessuna	CKD stadio 3	Terapia medica conservativa
27	13 anni	Proteinuria nefrosica e insufficienza renale	2	Medica sintomatica e steroidi	FSGS	Nessuna	Trapianto, espianto per MOF-sepsi	Emodialisi
28	16 mesi	Proteinuria nefrosica e microematuria	1	Medica (steroidi)	FSGS	Nessuna	Remissione di malattia	Remissione
29	7 anni	Iperensione e proteinuria nefrosica	1	Medica (steroidi, tacrolimus, ACE-i)	FSGS	Nessuna	CKD stadio 1	Terapia medica conservativa
30	9 mesi	NS	1	Medica (steroidi)	FSGS	Nessuna	Remissione di malattia	Remissione
31	3 anni	NS	1	Medica (steroidi)	FSGS	Nessuna	CKD stadio 1	Terapia medica conservativa
32	2 anni	Proteinuria non nefrosica	1	Medica (ACE-i)	FSGS	Nessuna	CKD stadio 2	Terapia medica conservativa
33	12 anni	Proteinuria nefrosica	1	Medica (steroidi, ciclosporina, ACE-i)	FSGS	Nessuna	Remissione di malattia	Remissione, CKD stadio 1
34	14 anni	NS e ipertensione	1	Medica (steroidi, tacrolimus)	FSGS	Nessuna	Remissione di malattia	Remissione
35	3 mesi	NS	1	Medica (sintomatica)	DMS	Nessuna	Remissione spontanea	Remissione
36	5 anni	NS	1	Medica (steroidi, tacrolimus)	FSGS	Nessuna	Remissione	Remissione
37	20 mesi	NS	1	Medica (steroidi, tacrolimus)	FSGS	Nessuna	Remissione	Remissione
38		Proteinuria nefrosica	1	Medica (ACE-i)	FSGS	Nessuna	Proteinuria, CKD stadio 1	CKD stadio 1
39	2 anni	NS	1	Medica (steroidi, tacrolimus)	FSGS	Nessuna	Remissione	Remissione
40	8 anni	NS	1	Medica (steroidi, tacrolimus)	FSGS	Nessuna	Remissione	Remissione

LEGENDA. NS: sindrome nefrosica. FSGS: glomerulosclerosi focale segmentale. DMS: sclerosi mesangiale diffusa. ESRD: *end stage renal disease*. CKD: insufficienza renale cronica.