

Małgorzata Jaroniec

**Analiza zmian w sekwencji genów kluczowych
dla zespołu nerczycowego u dzieci**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab.n.med. Danuta Ostalska-Nowicka

I Katedra Pediatrii

Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej

**Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu**

Kierownik Katedry: Prof. dr hab.med. Wojciech Cichy

Poznań 2011

Praca finansowana
Z projektu MNiSW
0060/B/P01/2008/35

Pragnę złożyć podziękowania
Pani dr hab.n.med. Danucie Ostalskiej-Nowickiej
za wspaniałą współpracę oraz życzliwość,
Prof. dr hab.n.med. Maciejowi Zabłowi,
Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
za stworzenie warunków do przeprowadzenia pracy badawczej
i umożliwienie rozwoju naukowego,
Pracownikom i Kolegom z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
za serdeczną atmosferę i nieocenioną pomoc,
Mężowi i Rodzicom
za okazane wsparcie i wyrozumiałość
oraz Kochanej Córeczce Misi
za to, że jest...

Spis treści

Wykaz skrótów.....	8
1. Wstęp.....	10
1.1. Choroby uwarunkowane genetycznie.....	10
1.2. Złożoność genomu ludzkiego i typy zmian w sekwencji DNA.....	11
1.2.1. Mechanizmy powstawania zmian w sekwencji w ludzkim genomie.....	13
1.2.2. Rola zmian w sekwencji w diagnostyce oraz terapii molekularnej.....	14
1.2.3. Badania struktury genów na bazie polimorfizmów SNP.....	15
1.2.4. Haplotyp.....	16
1.3. Zespół nerczycowy u dzieci.....	18
1.3.1. Epidemiologia zespołu nerczycowego u dzieci.....	18
1.3.2. Etiopatogeneza zespołu nerczycowego.....	18
1.3.3. Idiopatyczny zespół nerczycowy.....	19
1.3.4. Molekularne podłoże zespołu nerczycowego.....	20
1.3.4.1. Błona filtracyjna kłębuszka nerkowego.....	20
1.3.4.2. Ultrastruktura podocytów.....	20
1.3.4.3. Białka związane z podocytami.....	21
1.3.5. Mutacje w kluczowych białkach związanych z podocytami.....	22
1.3.5.1. Mutacje genu <i>NPHS1</i>	22
1.3.5.2. Mutacje genu <i>NPHS2</i>	24
1.3.5.3. Mutacje genu <i>WT1</i>	25
1.4. Kliniczne aspekty analizy zmian w sekwencji w kluczowych genach dla rozwoju zespołu nerczycowego u dzieci.....	27
2. Cele.....	29
3. Pacjenci i Metody.....	30
3.1. Pacjenci.....	30
3.1.1. Grupa badana.....	30
3.1.2. Grupa kontrolna.....	31
3.1.3. Materiał do badań.....	32

3.2.	Metody.....	32
3.2.1.	Izolacja całkowitego genomowego DNA w krwi obwodowej	33
3.2.2.	Pomiar stężenia DNA.....	34
3.2.3.	Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR).....	35
3.2.4.	Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym.....	39
3.2.5.	Szacowanie ciężarów cząsteczkowych fragmentów DNA na podstawie prędkości migracji podczas elektroforezy w żelach agarozowych.....	40
3.2.6.	Oczyszczanie produktów reakcji PCR.....	41
3.2.7.	Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR w celu poszukiwania mutacji oraz genotypowania polimorfizmów SNP.....	42
3.2.8.	Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania.....	44
3.2.9.	Elektroforeza kapilarna produktów sekwencjonowania.....	45
3.2.10.	Analiza bioinformatyczna.....	45
3.2.10.1.	Analiza mutacji.....	48
3.2.10.2.	Analiza polimorfizmów.....	48
3.2.10.3.	Badanie bloków haplotypowych.....	49
3.2.11.	Real-time PCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan.....	50
4.	Wyniki.....	52
4.1.	Otrzymanie materiału do badań genetycznych i opracowanie bazy danych.....	52
4.2.	Otrzymanie fragmentów kodujących genów <i>NPHS1</i> , <i>NPHS2</i> i <i>WT1</i> do analiz genetycznych.....	56
4.3.	Analiza sekwencji DNA genów <i>NPHS1</i> , <i>NPHS2</i> i <i>WT1</i>	59
4.3.1.	Analiza zależności genotypowo-fenotypowych.....	61
4.3.1.1.	Analiza mutacji punktowych w genie <i>NPHS1</i>	64
4.3.1.2.	Analiza mutacji punktowych w genie <i>NPHS2</i>	65
4.3.1.3.	Analiza mutacji punktowych w genie <i>WT1</i>	66
4.3.2.	Analiza polimorfizmów SNP.....	66
4.3.2.1.	Analiza polimorfizmów SNP w genie <i>NPHS1</i>	67
4.3.2.2.	Analiza polimorfizmów SNP w genie <i>NPHS2</i>	70
4.3.2.3.	Analiza polimorfizmów SNP w genie <i>WT1</i>	74
4.3.3.	Badanie niezrównoważenia sprzężeń na podstawie bloków haplotypowych..	76
4.3.3.1.	Badanie niezrównoważenia sprzężeń w genie <i>NPHS1</i>	76
4.3.3.2.	Badanie niezrównoważenia sprzężeń w genie <i>NPHS2</i>	79

4.3.3.3. Badanie niezrównoważenia sprzężeń w genie <i>WT1</i>	81
5. Omówienie wyników i dyskusja.....	85
6. Wnioski	95
7. Piśmiennictwo.....	96
8. Streszczenie	105
9. Abstract	108
Lista tabel.....	110
Lista rycin.....	112
Lista załączników.....	113
Załącznik 1. Zgoda Komisja Etycznej na prowadzenie badań naukowych.....	114
Załącznik 2. Świadoma zgoda na udział w badaniach genetycznych.....	117
Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z NS	118
Załącznik 4. Ankieta dla osób zdrowych.....	120
Załącznik 5. Genotypy polimorfizmów SNP w genie nefryny dla pacjentów z NS	121
Załącznik 6. Genotypy polimorfizmów SNP w genie nefryny dla osób zdrowych.....	122
Załącznik 7. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny otrzymane w oparciu o sondy typu TaqMan dla pacjentów z NS	123
Załącznik 8. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny otrzymane w oparciu o sondy typu TaqMan dla osób zdrowych.....	124
Załącznik 9. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny dla pacjentów z NS.....	125
Załącznik 10. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny dla osób zdrowych.....	126
Załącznik 11. Genotypy polimorfizmów SNP w genie <i>WT1</i> dla pacjentów z NS	127
Załącznik 12. Genotypy polimorfizmów SNP w genie <i>WT1</i> dla osób zdrowych	128
Załącznik 13. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla pacjentów z NS.....	129
Załącznik 14. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla osób zdrowych.....	130
Załącznik 15. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla pacjentów z NS i osób zdrowych.....	131

Załącznik 16. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla pacjentów z NS.....	133
Załącznik 17. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla osób zdrowych.....	134
Załącznik 18. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla pacjentów z NS i osób zdrowych.....	135
Załącznik 19. Wartości wyrażające LD w genie <i>WT1</i> dla pacjentów z NS.....	136
Załącznik 20. Wartości wyrażające LD w genie <i>WT1</i> dla osób zdrowych.....	137
Załącznik 21. Wartości wyrażające LD w genie <i>WT1</i> dla pacjentów z NS i osób zdrowych.....	138

Wykaz skrótów

- ACTN4 - A-aktynina 4 (ang. A-actinin 4)
- CCR - złożone przekształcenia chromosomów (ang. complex chromosomal rearrangements)
- CD/CV - hipoteza 'częsta choroba / częsty wariant' (ang. common disease / common variant)
- CD2AP - białko związane z CD2 (ang. CD2 associated protein)
- CE - elektroforeza kapilarna (ang. capillary electrophoresis)
- CF - cyklofosfamid
- CGR - częste złożone genomowe przekształcenia (ang. complex genomic rearrangements)
- CNF - wrodzony zespół nerczycowy typu fińskiego (ang. congenial nephrotic syndrome Finnish type)
- CNV - polimorfizmy zróżnicowania liczby kopii (ang. copy number variation)
- CsA - cyklosporyna A
- DDS - zespół Denys-Drash (ang. Denys-Drash Syndrome)
- DSB - dwuniciowe pęknięcia DNA (ang. double strand break)
- ER - retikulum endoplazmatyczne (ang. endoplasmic reticulum)
- ESRD - schyłkowa niewydolność nerek (ang. end-stage renal disease)
- FoSTeS - model blokowania widełek i przełączania matrycy (ang. fork stalling and template switching)
- FSGS - segmentalna ogniskowa sklerotyzacja kłębuszków (ang. focal segmental glomerulosclerosis)
- GK - glikokortykosteroidy
- HWE – prawo niezrównoważenia Hardy-Weinberga (ang. Hardy-Weinberg equilibrium)
- INS - idiopatyczny zespół nerczycowy (ang. idiopathic nephrotic syndrome)
- KZN - kłębuszkowe zapalenie nerek
- LCR - powtórzenia małej liczby (ang. low-copy repeats)
- LD - niezrównoważenie sprzężeń (ang. linkage disequilibrium)
- MCD - zmiany minimalne (ang. minimal change disease)
- MMF - mykofenolan mofetilu
- MP - mezangialna proliferacja (ang. mezangial proliferation)
- MPGN - błoniasto-rozplamowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. membrane proliferative glomerulonephritis)

N - niedojrzałość kłębuszków

NAHR - nie-alleliczna homologiczna rekombinacja (ang. non-allelic homologous recombination)

NHEJ - nie-homologiczne łączenie końców (ang. non-homologous end-joining)

NR - brak remisji (ang. no remission)

NS - zespół nerczycowy (ang. nephrotic syndrome)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio)

PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

PF - czynnik przepuszczalności (permeability factor)

PKD - choroba policystyczna nerek (ang. polycystic kidney disease)

PR - częściowa remisja (ang. partial remission)

RA - reumatoidalne zapalenie stawów (ang. rheumatoid arthritis, RA)

RFLP - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism)

Rtx - rituximab

SD - błona szczelinowa (ang. slit diaphragm)

SDNS - steroidozależny zespół nerczycowy (ang. steroido-resistant nephrotic syndrome)

SNP - polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)

SRNS - steroidooporny zespół nerczycowy (ang. steroido-resistant nephrotic syndrome)

SSLD - stały rdzeń niezrównoważenia sprzężeń (ang. solid spine of linkage disequilibrium)

SSNS - steroidowrażliwy zespół nerczycowy (ang. steroido-sensitive nephrotic syndrome)

tag SNP - SNP znacznikowe

TR - całkowita remisja (ang. total remission)

TRPC6 - przejściowy kanał kationowy (ang. transient receptor potential cation channel)

WT1 - gen supresorowy guza Wilmsa (Wilm's tumor suppressor gene)

ZF - zespół Fraisera

ZO-1 - zonula occludens 1

4GR - zasada 4 gamet (ang. 4 gamete rule)

1. Wstęp

1.1 Choroby uwarunkowane genetycznie

Choroby genetyczne określane są mianem zespołów objawów obserwowanych w wyniku zmian w DNA pacjenta (1). Istnieje kilka kryteriów charakteryzujących choroby genetyczne, w zależności od lokalizacji zmiany - choroby autosomalne lub sprzężone z płcią, konsekwencji mutacji - choroby dominujące i recesywne oraz złożoności mechanizmu - choroby jedno- i wielogenowe. Osobna grupa chorób wywołana jest obecnością aberracji chromosomowych.

Jednogenowe choroby genetyczne, których częstość wynosi 2,5% populacji (2), cechuje niemal całkowita korelacja pojedynczej mutacji ze zmienionym fenotypem, co sprawia, że testy genetyczne mogą służyć diagnostyce prenatalnej oraz prognozowaniu. Wyróżnia się choroby jednogenowe recesywne z silną relacją genotyp-fenotyp, w których fenotyp jest zależny niemal wyłącznie od wystąpienia przyczynowej mutacji w danym genie. Tego typu choroby ujawniają się zwykle w okresie prenatalnym. W latach 80. XX wieku w wyniku badań opartych o technikę RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) (3, 4), oraz markerów mikrosatelitarnych (5), powstały pierwsze mapy sprzężenia genetycznego otwierając tym samym nowy kierunek badań diagnostycznych. Dzięki zastosowanym testom genetycznym możliwe stało się wczesne wykrywanie takich chorób jak mukowiscydoza (6).

Odrębną grupę stanowią choroby wielogenowe, w których relacja genotyp-fenotyp jest znacznie słabsza, a czynnik genetyczny odpowiada jedynie za predyspozycję do wystąpienia choroby (7). Objawy chorób wielogenowych występują zwykle w wieku dorosłym, a ich częstość jest dużo większa niż chorób jednogenowych, choć ze względu na udział licznych genów, efekt fenotypowy jest wysoce podatny na zmiany przez czynniki środowiskowe (8). Nieustannie trwają badania nad identyfikacją kolejnych czynników genetycznych warunkujących rozwój chorób wielogenowych. Badacze wykorzystują w tym celu liczne hipotezy, takie jak 'częsta choroba / częsty wariant' (ang. common disease / common variant, CD/CV) (9). Ze względu na skomplikowane relacje między licznymi genami oraz dodatkowy wpływ czynników środowiskowych, badania genetyczne takich jednostek chorobowych są znacznie utrudnione, wymagają analizy nie pojedynczych, lecz licznych

genów. Co więcej, poznanie podłoża genetycznego złożonych chorób nie ogranicza się do analizy podstawowych genów powiązanych z objawami choroby. Niejednokrotnie niezbędne jest badanie licznych genów regulujących procesy z pozoru nie powiązane z procesem chorobowym. Trafny dobór genów jest niezwykle istotny, ponieważ identyfikacja kolejnych mutacji ujawnia kolejne podtypy choroby charakteryzujące się współwystępowaniem określonych zmian w DNA, co opisano w przypadku wielotorbielowatości nerek (ang. polycystic kidney disease, PKD) (10).

Jak wspomniano, choroby uwarunkowane genetycznie podzielono na jedno- i wielogenowe, jednak w miarę rozwoju genetyki medycznej, granica ta stopniowo zanika. Przyczyną takiej sytuacji są choroby, w których u jednych pacjentów występuje pojedyncza mutacja, u innych zaś kombinacja zmian w kilku genach. Trudno zatem określić przynależność takich chorób do jednej ze wspomnianych grup. Drugą przyczyną jest zjawisko efektu modyfikacji genu, kiedy dodatkowa mutacja występująca w innym genie powoduje zmianę fenotypu chorobowego na łagodniejszy lub wręcz przeciwnie, niezwykle trudny w leczeniu. Przykładem są mutacje w NPHP6 u pacjentów z nefronoftyzą (11).

1.2. Złożoność genomu ludzkiego i typy zmian w sekwencji DNA

Analiza podłoża genetycznego danej choroby wymaga szczegółowego poznania genomu, jego zmienności oraz konsekwencji jakie niosą za sobą obserwowane cechy materiału genetycznego. Szerokim pojęciem obejmującym elementy różnicujące przedstawicieli jednego gatunku są warianty genomowe. Rearanżacje genomowe mogą przyczyniać się do rozwoju chorób mendlowskich oraz nieistotnych z klinicznego punktu widzenia polimorfizmów. Warianty, które mogą przyczyniać się do zmiany fenotypu w kierunku chorób genetycznych określane są jako zaburzenia genomowe (12).

Zaburzenia genomowe występują zwykle z podobną częstością, jednakże odnotowano przypadki, których częstotliwość zależy od badanej populacji (13).

Podstawowe elementy wpływające na dystrybucję wariantów w genomie obejmują mutacje, selekcję, dryf genetyczny, rekombinacje, migracje oraz demografię populacji (14).

Różnorodność fenotypowa ludzi jest bezpośrednią konsekwencją zróżnicowania genetycznego w połączeniu z czynnikami środowiskowymi i behawioralnymi. Warianty genetyczne klasyfikowane są według dwóch podstawowych kryteriów: składu genetycznego oraz ich częstości występowania w populacji. W zależności od składu genetycznego wśród

polimorfizmów wyróżnia się warianty w sekwencji oraz warianty strukturalne. Warianty w sekwencji obejmują zmiany od pojedynczego nukleotydu do tysiąca par zasad (15) w przypadku insercji lub delecji. Większe insercje i delecje, wraz z duplikacjami, inwersjami i translokacjami określane są mianem wariantów strukturalnych i dotyczą obszaru w zakresie od tysiąca par zasad do 5 milionów par zasad (16). Warianty strukturalne dotyczą puli około 22% różnorodności genomu u ludzi (17).

Inny podział wariantów genetycznych uwzględnia ich częstość występowania w populacji, warianty rozpowszechnione występują z częstością większą niż 5% badanej populacji, a warianty rzadkie nie przekraczają progu 5%. Polimorfizm jest określany jako wariant występujący z częstością nie mniejszą niż 1% populacji.

Genomowe rearanżacje obejmują zmiany mutacyjne typu duplikacji, delecji, insercji, inwersji oraz translokacji (18). Rearanżacje takie mogą uwzględniać polimorfizmy neutralne dla funkcji genu, ale mogą powodować również zmiany fenotypowe poprzez różnorodne mechanizmy, takie jak zmiana liczby kopii, zakłócenia genów, czy tworzenie genów fuzyjnych (18). Wszelkie konsekwencje fenotypowe spowodowane wystąpieniem rearanżacji genomowych określane są zbiorczo terminem zaburzeń genomowych (19).

Najczęściej termin rearanżacji genomowej odnosi się do znaczących zmian w obrębie DNA, które obejmują segmenty liczące tysiące, a nawet miliony par zasad. Niejednokrotnie rearanżacje dotyczą całych grup funkcjonalnych genów. Monogenowe mutacje punktowe zazwyczaj odzwierciedlają błędy w replikacji lub naprawie DNA (20), podczas gdy obszerne rearanżacje genomowe są zwykle wynikiem innych mechanizmów pośredniczących lub stymulowanych przez cechy struktury genomu (18).

Wśród wspomnianych wariantów strukturalnych wyróżnia się typ nie wpływający na dawkę genu, generowany w wyniku inwersji lub zrównoważonych translokacji. Drugi typ jest związany z dawką genu i obejmuje szeroko badane w ostatnich latach, polimorfizmy zróżnicowania liczby kopii (ang. copy number variation, CNV) (21). Istnieje szereg procesów takich jak: duplikacje, triplikacje i translokacje, które mogą prowadzić do powstania CNV.

Ukończony projekt sekwencjonowania ludzkiego genomu dostarczył wielu ciekawych informacji na temat składu ludzkiego DNA (22). Określono, że około 5% sekwencji genomu występuje w co najmniej dwóch kopiach (23). Grupę sekwencji liczących powyżej tysiąca par zasad i identycznych w co najmniej 90% określono jako powtórzenia małej liczby kopii (ang. low-copy repeats, LCR) lub duplikacje segmentalne.

Kolejną klasą rearanżacji genomu są złożone rearanżacje chromosomów (ang. complex chromosomal rearrangements, CCR), które dotyczą strukturalne rearanżacji genomu

obejmujących co najmniej trzy cytogenetycznie widoczne punkty złamań (ang. breakpoint) oraz wymianę materiału genetycznego między dwoma lub więcej chromosomami (24). Obecność CCR została powiązana z poronieniami u kobiet, czy niepłodnością u mężczyzn (25, 26).

Ostatnia dekada przyczyniła się do odkrycia kolejnej grupy wariantów w DNA - częstych złożonych genomowych rearanżacji (ang. complex genomic rearrangements, CGR), których mechanizm powstawania jest złożony i nie został w pełni poznany (27). Ze względu na swoją złożoną budowę, zmiany CGR przez wiele lat pozostały niezauważone. Prostsze techniki wykorzystywane w nieodległej przeszłości do analizy genomu, nie były w stanie poprawnie zlokalizować ani opisać wariantów CGR.

1.2.1. Mechanizmy powstawania zmian w sekwencji w ludzkim genomie

Wiedza na temat mechanizmów powstawania rearanżacji genomu pozwala na poznanie przyczyn zmienionych fenotypów u pacjentów chorujących na szereg prostych oraz złożonych chorób genetycznych. Zaproponowane zostały trzy podstawowe mechanizmy powstawania przekształceń genomowych: nie-alleliczna homologiczna rekombinacja (ang. non-allelic homologous recombination, NAHR), nie-homologiczne łączenie końców (ang. non-homologous end-joining, NHEJ) oraz modeli blokowania widełek i przełączania matrycy (ang. fork stalling and template switching, FoSTeS) (28).

Proces NAHR wymaga obecności w DNA segmentów o niemal identycznej sekwencji w obrębie LCR (29). Większość powtórzonych przekształceń powstaje w wyniku zajścia NAHR między dwoma LCR (30), których podobieństwo sekwencji sięga 95% (31). NAHR może skutkować zarówno duplikacją, delecją, jak i inwersją fragmentu, który otaczają (20), co ma istotne konsekwencje, gdy odwrócony segment zawiera geny. Może wówczas dojść do całkowitej utraty funkcji genu lub jego skrócenia. Zjawisko NAHR może zchodzić podczas mejozy oraz mitozy.

Drugim mechanizmem powstawania rearanżacji genomowych jest NHEJ, proces, który w komórkach eukariotycznych jest jednym z podstawowych narzędzi naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (ang. double strand break, DSB) (32) powstałych w wyniku rekombinacji oraz wywołanych przez czynniki patologiczne takie jak promieniowanie jonizujące. W przeciwieństwie do NAHR, mechanizm NHEJ nie wymaga obecności w DNA sekwencji homologicznych (33). Proces NHEJ generuje delecje oraz duplikacje (34).

Trzecim mechanizmem generującym rearanżacje w genomie jest powiązany z replikacją DNA, model blokowania widełek i przełączania matrycy – FoSTeS. Do jego odkrycia przyczynił się znaczący postęp w dziedzinie technik molekularnych, który umożliwił badanie złożonych przekształceń genomowych (35). Wcześniej opisane NAHR i NHEJ w klarowny sposób tłumaczą powstanie prostych przekształceń, jednak w przypadku zmian złożonych, właściwym modelem jest FoSTeS (36). Mechanizm działa podczas replikacji DNA (35) i wynika z błędów podczas tego procesu. Model FoSTeS tłumaczy powstawanie złożonych przekształceń genomowych i chromosomowych (37).

Oprócz opisanych trzech mechanizmów generujących zmienność międzyosobniczą genomu, warianty mogą powstawać w wyniku retrotranspozycji z udziałem mRNA. W wyniku retrotranspozycji mogą powstawać małe warianty strukturalne (38). Mimo, że retrotranspozycja nie jest odpowiedzialna za znaczącą grupę wariantów strukturalnych, to zmiany powstałe z jej udziałem mają istotne znaczenie dla funkcjonowania genomu.

1.2.2. Rola zmian w sekwencji w diagnostyce oraz terapii

Identyfikacja genów odpowiedzialnych za zaburzenia genetyczne oraz opisanie mutacji wpływających na mechanizm patogenezы pozwoliły na opisanie licznych chorób. Pierwotne hipotezy zakładające zależność jeden gen – jedna choroba, są obecnie modyfikowane w kierunku sieci oddziaływań (39).

Badania chorób genetycznych nie mają na celu jedynie identyfikacji zaburzeń skorelowanych ze zmienionym fenotypem, ale także próbę wyjaśnienia mechanizmu molekularnego patogenezы. Z tego względu szczegółowym analizom podlegają komponenty całych szlaków sygnalizacyjnych powiązanych z chorobą genetyczną. Zidentyfikowane w ten sposób markery molekularne nie tylko mogą stanowić element testów diagnostycznych, ale przede wszystkim wykorzystywane są do opracowywania terapii.

Tradycyjne techniki molekularne oparte o metodę sekwencjonowania są wysoce informatywne, jednak czasochłonne. W odpowiedzi na zapotrzebowanie, opracowano znacznie szybsze zautomatyzowane metody, takie jak elektroforeza kapilarna (ang. capillary electrophoresis, CE) (40) oraz macierze DNA, które pozwalają na jednoczesną analizę setek tysięcy indywidualnie wybranych loci genowych. Macierze DNA wykorzystywane są do genotypowania i identyfikacji genów, analizy mutacji, polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphisms, SNP), detekcji zaburzeń chromosomowych oraz szeroko pojętych modyfikacji potranslacyjnych (41).

Postęp jaki dokonał się w dziedzinie diagnostyki pozwolił na wprowadzenie do powszechnego użycia badań genetycznych, których wyniki mogą potwierdzić zaburzenie genetyczne lub określić szansę rozwoju danej choroby. Wyróżnia się dwa typy testów genetycznych: diagnostyczno-prognostyczne oraz testy dla celów farmakogenomiki (42). W pierwszym przypadku test ma na celu identyfikację przyczynowych mutacji genetycznych lub polimorfizmów podatności na zachorowanie, z kolei testy farmakogenomiczne ujawniają cechy DNA oraz RNA powiązane z odpowiedzią na leki.

Cechy kwasów nukleinowych badane poprzez testy genetyczne uwzględniają zmiany takie jak SNP, krótkie sekwencje powtórzone, insercje, delecje. W przypadku chorób złożonych należy dokonać szczegółowej analizy licznych polimorfizmów w sekwencji genu oraz jego rejonach regulatorowych w celu uchwycenia ewentualnej asocjacji z zaburzeniem genetycznym. Ten etap badań wymaga weryfikacji w różnych populacjach, gdyż niejednokrotnie istotne polimorfizmy są populacyjno-specyficzne.

Badania molekularne pozwalają obecnie na poznanie mechanizmów powstawania zmian w DNA, co przyczynia się do rozwoju terapii. U pacjentów chorujących na mukowiscydozę opracowano nowoczesną terapię modyfikującą zmiany wywołane defektem genetycznym (43). Innym przykładem jest wykorzystanie antysensownego oligonukleotydu u pacjentów chorujących na dystrofię mięśniową Duchenne'a i posiadających mutację punktową prowadzącą do STOP kodonu i wcześniejszej terminacji wydłużania łańcucha białkowego (44). Terapeutyczna cząsteczka pozwala na ominięcie kodonu STOP podczas splicingu genu dystrofiny, dzięki czemu powstaje skrócone białko pozbawione mutacji i zdolne do częściowego pełnienia funkcji w komórce (44).

Wiedza na temat mutacji w DNA oraz mechanizmów ich powstawania służy zatem rozwojowi diagnostyki oraz terapii, dzięki czemu szanse pacjentów na odzyskanie zdrowia są znacznie większe.

1.2.3. Badania struktury genów na bazie polimorfizmów SNP

Liczne badania nad różnorodnością genetyczną koncentrowały się na charakterystyce ponad 10 milionów polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (45), ponieważ stanowią one około 78% zmienności ludzkiego genomu. SNP rozprzestrzenione są w całym genomie (46), powstają w wyniku mutacji, które są selektywnie utrwalane w populacjach, a ich częstości zależą od czasu jaki upłynął od powstania mutacji, presji ewolucyjnej oraz losowego dryfu genetycznego. Niezwykle istotną cechą SNP jest silne powiązanie częstości alleli z badaną

populacją, w literaturze opisano wiele wariantów SNP występujących tylko w wybranej populacji (46).

W miarę postępu genomiki i prowadzenia badań nad rolą SNP wyselekcjonowano istotne polimorfizmy, które mogą stanowić zarówno element ochronny, jak i czynnik podatności na zachorowanie.

W literaturze opisano szereg metod asocjacji SNP z chorobami (47, 48, 49), większość polega na identyfikacji genotypów i haplotypów powiązanych ze stanem chorobowym. Podstawą identyfikacji jest istotna różnica częstości alleli danego polimorfizmu między pacjentami i grupą kontrolną, w której nie występują cechy choroby (50).

Prowadzenie badań nad podłożem genetycznym chorób może przybierać różne formy, począwszy od poszukiwania mutacji przyczynowych, a skończywszy na badaniu podatności na zachorowanie w oparciu o znane polimorfizmy. Wykorzystanie informacji o SNP wiąże się z wykorzystaniem pewnych obliczeń statystycznych mających na celu opisanie struktury genu (48). Pierwszym etapem jest analiza wybranych polimorfizmów w danym genie, a następnie wykorzystanie otrzymanych genotypów do wskazania elementów dziedziczonych wspólnie, co jest związane ze zjawiskiem sprzężenia genetycznego. Wykazano, że SNP zlokalizowane w sekwencji genu często są dziedziczone wspólnie, czyli kosegregują. Wzory współdziedziczenia grup polimorfizmów są charakterystyczne dla populacji oraz, w szczególnych przypadkach, dla pacjentów z chorobami genetycznymi. Struktura genu może zatem, obok analizy mutacji, stanowić podstawę do określenia podatności na zachorowanie na złożoną chorobę genetyczną.

Mimo setek projektów badawczych, analiza chorób wielogenowych i próby wyjaśnienia ich patogenezy w oparciu o SNP wciąż stanowią odległy cel. Jednak ostatnia dekada stanowiła kamień milowy w badaniach sprzężeń genetycznych, a zdobyta wiedza pozwala planować eksperymenty mające na celu bardziej kompleksową analizę chorób genetycznych, uwzględnającą całe grupy genów, a nie jedynie ich fragmenty.

1.2.4. Haplotyp

W praktyce termin haplotyp najczęściej odnosi się do silnie sprzężonych genetycznie loci, w szczególności do wariantów genomowych jakimi są polimorfizmy pojedynczego nukleotydu. SNP zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie wykazują bowiem silną tendencję do wspólnego dziedziczenia, co określa się mianem niezrównoważenia sprzężeń (ang. linkage disequilibrium, LD) (51). LD jest miarą współwystępowania w populacji określonego allelu w

danym locus z innym określonym allelem w drugim określonym locus genowym z częstotliwością większą niż dla dwóch losowo wybranych loci w genomie. Wysokie LD oznacza, że polimorfizmy SNP są niemal zawsze dziedziczone wspólnie, zatem informacja o wariancie pierwszego SNP u danej osoby pozwala z wysokim prawdopodobieństwem przewidzieć allel posiadany w drugim SNP na tym samym chromosomie. Istnieje kilka testów matematycznych będących miarą LD, należą do nich D, D₀ oraz R², natomiast ich wartość zależy od częstości alleli par polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (52). Test D określa kowariancję dwóch binarnych losowych zmiennych wyrażonych jako haploidalne genotypy, zaś R² jest kwadratem współczynnika korelacji. Najbardziej przydatnym testem jest pochodna korelacji R², która interpretowana jest jako stosunek zmienności w jednym SNP w odniesieniu do drugiego lub stosunek obserwacji, kiedy dwa określone pary ich alleli występują wspólnie. Struktura genów w postaci wzoru bloków haplotypowych na bazie LD obejmuje większość ludzkiego genomu (53).

W przypadku haplotypów, polimorfizmy SNP są wspólnie dziedziczone, a zatem określenie haplotypu pozwala na ograniczenie analizy genetycznej do wybranych kluczowych SNP określanych jako znacznikowe (ang. tag SNP) (54). Podatność na zachorowanie określana jest nie przez pojedyncze SNP, ale ich zbiory, zatem określenie haplotypów i ich późniejsza analiza pozwala na szybsze i bardziej szczegółowe określenie wpływu wariantów w danym genie na zmianę fenotypu. Jeżeli mutacja powodująca chorobę genetyczną powstaje w danym haplocie, jest ona przekazywana kolejnym pokoleniom w populacji, ponieważ struktura haplotypu nie pozwala na jego zaburzenie (55). W przypadku chorób jednogenowych, haplotypy są dużo istotniejsze niż pojedyncze SNP w określaniu podatności na zachorowanie. W przypadku chorób wielogenowych efekt danego haplotypu nie jest wyraźny i trudniej go zidentyfikować (56). Zdobywanie niezbędnej wiedzy na temat haplotypów w ludzkim genomie zostało znacznie ułatwione dzięki międzynarodowemu projektowi HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) (57), który powstał w celu stworzenia publicznej bazy danych całego genomu ludzkiego, obejmującej powszechne sekwencje zmienności wykorzystywane w badaniach genetycznych (58).

1.3. Zespół nerczycowy u dzieci

1.3.1. Epidemiologia zespołu nerczycowego u dzieci

Zespół nerczycowy (ang. nephrotic syndrome, NS) jest najczęstszą przyczyną białkomoczu u dzieci i charakteryzuje się intensywną utratą białka z moczem przekraczającą 50 mg/ kg masy ciała/ dobę, której następstwem są obrzęki (retencja wody w ustroju), hypoalbuminemia, hipercholesterolemia oraz zaburzenia krzepnięcia krwi. Roczne występowanie NS szacuje się od 2 do 7 nowych zachorowań na 100 000 dzieci (59). NS częściej występuje u chłopców niż u dziewcząt (w stosunku 2:1) szczególnie w wieku przedszkolnym.

Doniesienia w literaturze wskazują, że częstość oraz obraz histologiczny NS są zróżnicowane w zależności od rejonu geograficznego oraz etnicznego pochodzenia (60).

1.3.2. Etiopatogeneza zespołu nerczycowego

Mimo znacznego postępu w leczeniu zespołu nerczycowego, wciąż nie został poznany mechanizm patogenezy. W literaturze opisywane są liczne hipotezy podejmujące próbę wyjaśnienia hiperfiltracji kłębuszka nerkowego. Jeden z najbardziej prawdopodobnych modeli dotyczy podłoża immunologicznego. W rozwoju NS opisano defekt odpowiedzi komórkowej, zaburzoną funkcję limfocytów T oraz wpływ interleukin i/lub ich receptorów (61). Udział podocytów w procesach immunologicznych jest związany z obecnością na ich powierzchni C3bR. Aktywacja dopełniacza odgrywa główną rolę w patogenezie wielu postaci kłębuszkowego zapalenia nerek (KZN), prowadzi do uszkodzenia tkanek za pośrednictwem różnych mechanizmów, w tym przez wpływ na wytwarzanie czynników chemotaktycznych i aktywację komórek kłębuszka (62). Potwierdzeniem tych obserwacji jest pozytywna reakcja pacjentów z białkomoczem na glikokortykosteroidy (GK), jak również zahamowanie odpowiedzi komórkowej pod wpływem infekcji np. wirusem odry, a także podatności na infekcje pneumokokami oraz innymi bakteriami (63). Ponadto, za czynnik prowadzący do zwiększonej filtracji bariery kłębuszka nerkowego uważa się hipotetyczną cytokinę pochodzącą z limfocytów T (tzw. permeability factor, PF), która uszkodza błonę podstawną i/lub zmienia jej ładunek elektryczny. Rola tej cytokiny została potwierdzona w przypadkach nawrotu NS w nerce przeszczepionej u pacjentów z pierwotną ogniskową segmentalną sklerotyzacją kłębuszków (ang. focal segmental glomerulosclerosis, FSGS).

Przez wiele lat uważano, że utrata ładunku ujemnego przez błonę podstawną uniemożliwia odpychanie cząsteczek białka i dlatego przechodzą one do przestrzeni pozanaczyniowej. Hipoteza o zaburzonym wytwarzaniu siarczanu heparanu była przedmiotem dociekań wielu badaczy (64).

Według Kriza i wsp., jedną z istotnych przyczyn uszkodzenia podocytów może być zwiększone ciśnienie wewnątrzwołniczkowe i mechaniczne przeciążenie tych komórek oraz odczepienie wypustek stopowatych podocytów od błony podstawnej (65). W ten sposób reakcja komórkowa na odczepienie podocytów stanowi wstęp do wytworzenia zmian sklerotycznych w kłębuszku (66). W następstwie dochodzi do aktywacji immunologicznie czynnych limfocytów T.

Część powyższych teorii jest nadal weryfikowana. Oprócz reakcji immunologicznych, na rozwój zespołu nerczycowego mogą wpływać także zmiany na poziomie DNA. Choć zaburzenia kłębuszkowej bariery filtracyjnej były powiązane z patofizjologią zespołu nerczycowego od ponad 40 lat, dopiero ostatnie dziesięciolecie i badania genetyczne pozwoliły na identyfikację nowych genów oraz ich produktów istotnych dla rozwoju NS (67).

1.3.3. Idiopatyczny zespół nerczycowy

Idiopatyczny zespół nerczycowy (ang. idiopathic nephrotic syndrome, INS) dotyczy pacjentów, u których nie określono dokładnie przyczyny wystąpienia choroby, natomiast pierwszy rzut wystąpił w wieku przedszkolnym (między 2, a 10 rokiem życia). INS ujawnia się zwykle po 18 miesiącu życia, a tylko sporadycznie w pierwszych tygodniach jako nefroza wrodzona. Idiopatyczny wrodzony NS występuje sporadycznie. Odnotowano również przypadki rodzinnego występowania INS.

Zastosowanie glikokortykosteroidów w INS w ok. 90 % przynosi remisję kliniczną i biochemiczną NS tj. ustąpienie obrzęków, białkomoczu (w dobowej zbiorce moczu < 150 mg) oraz normalizację proteinemii i cholesterolemii w surowicy krwi. Taki przebieg NS określa się jako steroidowrażliwy NS (ang. steroidosensitive nephrotic syndrome, SSNS), natomiast w biopsji nerki można się spodziewać obecności zmian minimalnych (ang. minimal change disease, MCD) (68). Z kolei brak reakcji na GK po 8 tygodniach leczenia wskazuje na steroidooporny NS (ang. steroidoresistant nephrotic syndrome, SRNS), który jest wskazaniem do wykonania biopsji nerki oraz zmiany leczenia. W przebiegu SRNS w badaniu histologicznym można ujawnić FSGS, mezangialną proliferacją oraz sporadycznie mezangialną sklerotyzację kłębuszków nerkowych.

Szacuje się, że wśród dzieci z SRNS nawet 10-25% pacjentów może posiadać mutacje w genie podocyny (*NPHS2*), guza Wilmsa (ang. Wilms' tumour suppressor gene 1, *WT1*), aktyniny 4 (ang. A-actinin 4, *ACTN4*), białka związanego z CD2 (ang. CD 2 associated protein, *CD2AP*) czy przejściowego kanału kationowego (ang. transient receptor potential cation channel, *TRPC6*) (69, 70).

Ponadto, w leczeniu NS można zaobserwować steroidozależność, czyli uzyskanie remisji klinicznej i biochemicznej pod wpływem nawet niewielkich dawek GK. Najczęściej steroidozależny zespół nerczycowy (ang. steroidodependant nephrotic syndrome, SDNS) określa się jako nawracający w ciągu 2 tygodni od zakońzonego leczenia lub w trakcie redukcji dawki GK. Taki przebieg NS wymaga rozpoznania histologicznego oraz zmiany leczenia.

1.3.4. Molekularne podłoże zespołu nerczycowego

1.3.4.1. Błona filtracyjna kłębuszka nerkowego

Zaburzenie funkcjonowania bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego ma fundamentalne znaczenie dla rozwoju zespołu nerczycowego. Struktura ta zbudowana jest z trzech elementów: śródbłona okienkowego, błony podstawnej oraz podocytów (71). Bariera ta oddziela krew od moczu pierwotnego i odpowiada za utrzymanie selektywnej ultrafiltracji roztworów oraz zapobiega nadmiernej utracie dużych cząsteczek takich jak albuminy, czy czynniki krzepnięcia krwi, których masa cząsteczkowa przekracza 40 kDa (72). W przypadku zespołów nerczycowych bariera filtracyjna jest niepełna i zwiększa się jej przepuszczalność.

Komórki śródbłona posiadają pory o średnicy 70-100 nm, zaś błona podstawna, ogranicza przepływ substancji wielkocząsteczkowych proporcjonalnie do ich masy. Podocyty występujące w obrębie listka trzewnego torebki Bowmana są końcowo zróżnicowanymi komórkami nabłonkowymi posiadającymi liczne rozgałęzienia – wyrostki stopowate (71). Błony szczelinowe (ang. SD, slit diaphragm), najważniejszy element bariery filtracyjnej kłębuszka (67), są zakotwiczone w wyrostkach stopowatych podocytów i łączą je ze sobą (73). Głównymi białkami budującymi i wzmacniającymi błony szczelinowe są nefryna i podocyna.

1.3.4.2. Ultrastruktura podocytów

Podocyty wyściełają zewnętrzną powierzchnię błony podstawnej kłębuszka nerkowego. Każdy z podocytów jest związany z więcej niż jedną tętniczką, a każda tętniczka

jest pokryta przez kilka podocytów. Podocyty można podzielić na trzy strukturalne i funkcjonalne segmenty: ciało komórki, wyrostek większy i wyrostek stopowaty. W obrębie wyrostka stopowatego występuje szereg białek budujących aparat kurczliwy, należą do nich min. aktyna, miozyna, aktynina i wimentyna (74). Wyrostek większy natomiast ma dobrze rozwinięty cytoszkielet zbudowany z mikrotubul i filamentów pośrednich (75). Mikrotubule podocytów cechuje heterogenna polarność, co umożliwia tworzenie wypustek cytoplazmatycznych (75). Główną rolą podocytów jest udział w filtracji kłębuszkowej. Filtrat kłębuszkowy przechodzi kolejno przez okienka śródbłónka, błonę podstawną oraz błony szczelinowe, zamykające szczeliny między wyrostkami stopowatymi podocytów.

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

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

W rozwoju kłębuszka nerkowego, który jest ściśle powiązany z różnicowaniem podocytów, wyróżnia się cztery fazy: pęcherzykową, S-kształtną, pętli naczyniowej oraz dojrzałości (76). W danej fazie obserwuje się charakterystyczny profil ekspresji genów, co umożliwia ocenę dojrzałości podocytów na bazie odpowiednich markerów molekularnych.

1.3.4.3. Białka związane z podocytami

Podocyty związane są z szeregiem białek, do cząsteczek istotnych dla ich prawidłowego rozwoju należą: WT1 (77), podoplanina (78), podokaliksyna (79), GLEPP1 (80), czy synaptopodyna (81).

Na podocytach pojawia się także ekspresja C3bR, nazywanego receptorem 1 dopełniacza, inaktywującego składowe C3b i C4b dopełniacza (82), co tłumaczy immunologiczne podłoże zespołów nerczycowych. Istotną rolę pełnią również integryny, które kontrolują aparat kurczliwy podocytów (83).

Dotychczas wskazane białka dotyczyły prawidłowej budowy cytoszkieletu podocytów oraz ich wyrostków stopowatych. Z kolei to białka błony szczelinowatej mają zasadnicze znaczenie w powstawaniu białkomoczu, w szczególności nefryna i podocyna. Model oparty o obraz z mikroskopu elektronowego zakłada, że nefryna łączy sąsiadujące wyrostki stopowate na wzór zamka błyskawicznego (84). Liczne obserwacje i badania kliniczne potwierdziły dominującą rolę nefryny w funkcjonowaniu błony szczelinowatej (85). Nefryna jest

rozmieszczona nieregularnie, przybiera postać ziarnistości szczególnie w miejscach zlewania się wypustek podocytów (86). Do pozostałych białek błony sączącej należą: podocyna, łączące się z nefryną CD2AP oraz ZO-1 i kateniny oddziałujące z NEPH1 (87). Białkiem łączącym “wiązki” mikrofilamentów jest ACTN4 i inne aktyniny.

W dojrzałym kłębuszku podocyty charakteryzują się znacznym stopniem zróżnicowania. Mechanizmy regulujące różnicowanie podocytów są bardzo skomplikowane i nadal nie do końca poznane. Wykazano, że białka macierzy pozakomórkowej mogą przyczyniać się do powstawania sygnałów wewnątrzkomórkowych, regulujących morfogenezę podocytów, czego przykładem jest pobudzający wpływ lamininy na formowanie wyrostków stopowatych *in vitro* (75).

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

1.3.5. Mutacje w kluczowych białkach związanych z podocytami

Liczne badania nad genetycznym podłożem zespołu nerczycowego przyczyniły się do wyodrębnienia grupy białek kluczowych dla patogenezy białkomoczu. Zalicza się do nich białka strukturalne błony szczelinowatej podocytów: nefrynę, podocynę, CD2AP i ACTN4 oraz inne cząsteczki kontrolujące prawidłową filtrację kłębuszkową, w tym między innymi WT1, PLCE1 oraz LAMB2 (67).

1.3.5.1. Mutacje genu *NPHS1*

Zlokalizowany na chromosomie 19q13.1 gen *NPHS1* zbudowany jest z 29 eksonów, o całkowitej długości 26 tysięcy par zasad. Koduje on białko nazwane nefryną, składające się z 1241 reszt aminokwasowych. Nefryna należy do nadrodziny immunoglobulin i rodziny komórkowych cząsteczek adhezyjnych (88) i jest zlokalizowana w błonie szczelinowatej znajdującej się pomiędzy wyrostkami stopowatymi dojrzałych podocytów (89).

Mutacje w genie *NPHS1* powiązane są z autosomalnym recesywnym wrodzonym zespołem nerczycowym typu fińskiego (ang. congenial nephrotic syndrome Finnish type, CNF), charakteryzującym się białkomoczem w życiu płodowym (90). W rozwoju płodowym już mutacja jednego allelu genu nefryny powoduje białkomocz, podwyższone stężenie α -fetoproteiny w płynie owodniowym i/lub krwi ciężarnej oraz zanik wyrostków stopowatych

podocytów. W życiu pozapłodowym, do wystąpienia zespołu nerczycowego konieczna jest mutacja obu alleli genu nefryny. Wynika to z faktu, że podczas dojrzewania kłębuszka obydwie allele tego genu są niezbędne do prawidłowej syntezy nefryny, zaś w późniejszym okresie życia wystarczy jeden prawidłowy allel (91).

Jak wspomniano, mutacje nefryny początkowo powiązano z fińskim typem NS, w przypadku którego najczęstszymi, występującymi w 94% pacjentów, zmianami są 2 mutacje (92). Pierwszą jest zmiana L41fsX90, określana jako Fin major (główna), skracająca większą część białka, drugą R1109X znana jako Fin minor (poboczna), skracająca jedynie karboksylowy koniec nefryny (93). Do wystąpienia objawów klinicznych NS konieczne jest odziedziczenie mutacji w obu allelach *NPHS1* (homozygoty Fin major lub Fin minor lub heterozygoty złożonej Fin major/Fin minor) (94).

W obrębie genu zidentyfikowano kilka gorących miejsc (ang. hot spot), w których potencjalnie występuje dużo mutacji. Są one zlokalizowane w rejonach istotnych z punktu widzenia funkcji nefryny, a zatem między innymi w domenach immunoglobulinowych (85). Wśród poznanych mutacji nefryny, wiele potencjalnych mutacji typu zmiany sensu dotyczy reszt aminokwasowych posiadających ładunek, takich jak arginina, oraz reszt hydrofobowych jak leucyna, czy izoleucyna. Wprowadzone zmiany najczęściej powodują poważne zaburzenia konformacyjne białka. Inne mutacje dotyczą reszt cysteiny, co zaburza tworzenie mostków disulfidowych (85). Badania *in vitro* sugerują, że nefryna jest białkiem niezwykle plastycznym, które łatwo przechodzi w alternatywne formy konformacyjne (95) oraz, że blisko 75% znanych mutacji typu zmiany sensu może skutkować nieprawidłowym fałdowaniem nefryny, która zostaje uwięziona w retikulum endoplazmatycznym i w konsekwencji nie zostaje zakotwiczona w błonie podocytów (96).

Wielokrotne sekwencjonowanie nefryny przyczyniło się do identyfikacji dwóch mutacji w rejonie promotorowym, których obecności nie wykryto u zdrowych ludzi. Wstępne badania bioinformatyczne sugerują, że mutacje mogą leżeć w rejonie wiązania czynnika transkrypcyjnego i w konsekwencji powodować zmianę poziomu ekspresji prawidłowego białka (85).

Niemal wszystkie mutacje w genie nefryny skutkują niezwykle ciężkimi przypadkami CNF, niezależnie od lokalizacji mutacji w genie oraz od jej konsekwencji dla kodowanego białka. Wyjątek stanowi występująca w układzie homozygotycznym mutacja R1160X, która została powiązana z łagodniejszą odmianą fińskiego zespołu nerczycowego (85). Na poziomie molekularnym mutacja R1160X skutkuje skróceniem białka nefryny poniżej ostatniej reszty aminokwasowej w eksonie 27. W przeciwieństwie do mutacji Fin minor w eksonie 26,

zmiana R1160X nie powoduje zatrzymania białka w retikulum endoplazmatycznym, nefryna mimo zmiany jest zlokalizowana prawidłowo w kłębuszkach nerkowych (93). Ciekawe jest jednak to, że wszystkie pozostałe mutacje w eksonie 27, nawet leżące tuż obok R1160X, powodują ciężki wrodzony NS typu fińskiego. R1160X to mutacja nonsensowna, która ma charakter recesywny, gdyż występuje w pojedynczym allelu u osób zdrowych (85).

Przeprowadzone przez Koziell i in. badania podjęły także temat mutacji nefryny w innych niż CNF zespołach nerczycowych. Po przeanalizowaniu 29 eksonów, intronów oraz promotora genu u pacjentów z wczesnym SRNS nie zidentyfikowano żadnej mutacji (85).

1.3.5.2. Mutacje genu *NPHS2*

Gen *NPHS2*, ulokowany na chromosomie 1q25-q31, jest jednym z genów powiązanych z zespołem nerczycowym. Podocyna kodowana przez ten gen to integralne białko o ciężarze 42kDa, charakteryzujące się wysoką homologią z łańcuchem 7 rodziny stomatyn (97), które ulega ekspresji zarówno na etapie płodowym, jak i w dojrzałych kłębuszkach (97). Podocyna wiąże się z cytoplazmatyczną częścią nefryny oraz z dwoma innymi białkami: CD2AP oraz białkiem podobnym do nefryny, Neph1 (98).

Gen *NPHS2* powiązany został z występowaniem autosomalnego recesywnego steroidoopornego NS, tak rodzinnym, jak i sporadycznym (97). Do identyfikacji genu przyczyniła się analiza rodzin chorujących na autosomalny recesywny SRNS (99), następnie opisano szereg mutacji recesywnych powiązanych z NS. Obraz kliniczny u pacjentów posiadających mutacje podocyny wykazuje duże zróżnicowanie, od pierwszych objawów pojawiającego się wcześnie po urodzeniu, jak w przypadku mutacji genu nefryny, do ujawnienia się tych objawów w drugiej dekadzie życia. Średni wiek wystąpienia I rzutu NS określa się między 3, a 5 rokiem życia. W badaniu histologicznym nerek tych pacjentów wykazano obecność zmian w postaci FSGS, choć opisano także zmiany minimalne, które w kolejnych biopsjach przekształciły się w zmiany ogniskowej segmentalnej sklerotyzacji kłębuszków (100).

Dane zebrane przez Winna i wsp. wskazują, że zmiany *NPHS2* są obecne w 20-30% sporadycznych, nie rodzinnych, SRNS (101). Jest to obiecujący wynik, który wymaga weryfikacji oraz znacznego poszerzenia grupy badanej oraz kontrolnej (97).

Jak wspomiano, podocyna została wielokrotnie powiązana ze steroidoopornym zespołem nerczycowym. Prowadzono także badania w odniesieniu do pacjentów wrażliwych na leczenie steroidami, co zaowocowało wykluczeniem genu *NPHS2* jako genu kandydata SSNS (99).

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

W modelu wielogenowym oprócz *NPHS1* i *NPHS2*, nie wyklucza się możliwości udziału dodatkowych genów modyfikujących obraz kliniczny (108).

1.3.5.3. Mutacje genu *WT1*

Gen supresorowy guza Wilmsa (*WT1*) jest zlokalizowany na chromosomie 11p13 i koduje czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję wielu genów podczas rozwoju nerek i układu moczowo-płciowego. Gen kodujący białko WT1 składa się z 10 eksonów i zawiera 4 domeny cynkowe. WT1 to czynnik transkrypcyjny i potranskrypcyjny niezbędny do utrzymania prawidłowego fenotypu podocyta (79) i odpowiedzialny za różnicowanie komórek kłębuszka (109).

W przypadkach zespołów nerczycowych wykryto mutacje typu zmiany sensu dotyczące eksonów: 8 i 9 w obrębie domeny cynkowej, oraz intronu 9 (109). Mutacje genu *WT1* stwierdzono także w chorobach rozrostowych, takich jak białaczka, retinoblastoma, rak piersi i płuc, a przede wszystkim guz Wilmsa (110). Co więcej, obniżoną ekspresję białka WT1 zaobserwowano w kłębuszkach nerkowych chorych na glomerulopatie przebiegające z rozplemem podocytów, tzn. w wariacie FSGS z zapadaniem włóściwek i nefropatii związanej z HIV (77).

W przypadku genu *WT1*, mutacje zostały początkowo zidentyfikowane u pacjentów z guzem Wilmsa (111). Były to mutacje skracające powiązane z całkowitą utratą funkcji WT1. Podobne mutacje zostały powiązane z izolowanym guzem Wilmsa, zaś przypadki rodzinne odpowiadały schematowi dziedziczenia dominującego (112). Następnie, mutacje w tym genie powiązano z zespołem Denys-Drash (ang. Denys-Drash Syndrome, DDS). Zmiany dotyczyły w znacznej mierze kodujących elementów genu, eksonu 8 i 9 i były mutacjami powstałymi *de novo*, a zatem nie zostały odziedziczone od rodziców. Najczęściej występującą mutacją jest R394W, która powoduje zmianę argininy na tryptofan w pozycji 394 (113).

Kolejne badania powiązały zmiany w genie *WT1* także z zespołem nerczycowym, za czym przemawia fakt, że *WT1* odgrywa ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej czynności podocyta, a w konsekwencji prawidłowej morfologii kłębuszka. U myszy mutacja *WT1* powoduje sklerotyzację kłębuszków przebiegającą z pogrubieniem błony podstawnej i fuzją wyrostków stopowatych podocytów (114). Rola mutacji genu *WT1* w NS może wynikać także z faktu, iż białko guza Wilmsa pozytywnie kontroluje ekspresję genu nefryny (115).

Gen *WT1* został powiązany także z zespołem Frasiera, w którym występuje ogniskowa sklerotyzacja kłębuszków, męskie obojnactwo rzekome i występowanie guzów typu gonadoblastomy (116).

Ciekawe wydają się spostrzeżenia Koziell i wsp. (117) dotyczące mutacji *WT1* obecnych w FSGS wrodzonym lub o wczesnym początku, bez innych cech DDS lub Zespołu Frasiera (ZF). W DDS mutacja *WT1* nie prowadzi do powstania patologicznego białka strukturalnego, ale uszkodzonego czynnika transkrypcyjnego. Uszkodzenie obu alleli wyzwała nowotworzenie. Z kolei w ZF chory ma tylko jedną uszkodzoną kopię *WT1*, która koduje krótszą izoformę, dochodzi zatem do zaburzenia stosunku ilości izoform *KTS(-)*/*KTS(+)*.

Po przebadaniu większej i bardziej zróżnicowanej populacji autorzy wywnioskowali, że mutacje *WT1* są niespotykane w izolowanym FSGS, mimo podobnego obrazu histopatologicznego obu chorób. Może to sugerować wpływ mutacji w innych, specyficznych dla kłębuszka, genach (117).

1.4. Kliniczne aspekty analizy zmian w sekwencji w kluczowych genach dla rozwoju zespołu nerczycowego u dzieci.

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

Rola zmian w sekwencji DNA została wielokrotnie wykazana w przypadku wrodzonego oraz idiopatycznego NS (67). Istnieje szereg powodów, dla których badania te są niezwykle istotne zarówno z punktu widzenia diagnostyki, jak i doboru leczenia choroby.

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

Mutacje genu nefryny dotyczą zwykle pacjentów, u których pierwszy rzut choroby ujawnił się przed ukończeniem pierwszego roku życia (88). Dla nefrologa informacja o takiej mutacji sugeruje trudniejszy w leczeniu przebieg zespołu nerczycowego.

Z kolei analiza sekwencji podocyny jest zasadna w szczególności u pacjentów chorujących na idiopatyczny zespół nerczycowy (97). Informacja o mutacjach w tym genie jest niezwykle cenna, ponieważ wielokrotnie powiązano ich występowanie z brakiem odpowiedzi na leczenie glikokortykosteroidami. Zatem przeprowadzenie analizy sekwencji genu *NPHS2* pozwala na dobór terapii immunosupresyjnej dla danego pacjenta. Nie oznacza to rezygnacji z leczenia GK, ale modyfikację leczenia z zastosowaniem dodatkowych leków.

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

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

Oprócz wykrywania mutacji, analizy zmian w sekwencji DNA dostarczają informacji o polimorfizmach SNP. Mimo, iż pojedyncze polimorfizmy nie powodują rozwoju zespołu nerczycowego, jednak badanie całych zespołów polimorfizmów SNP, tworzących bloki haplotypowe, może informować o podatności na zachorowanie. Badanie struktury genów w odniesieniu do chorób wielogenowych, do których należy zaliczyć NS, może okazać się w przyszłości istotniejsze niż detekcja pojedynczych mutacji.

Przeprowadzenie obszernych badań struktury genów istotnych dla rozwoju zespołu nerczycowego może ujawnić wzory charakterystyczne dla wysokiej podatności na zachorowanie na SRNS oraz SSNS. Taka wiedza pozwoliłaby przewidzieć, czy u pacjenta z pierwszym rzutem choroby, może dojść do rozwoju steroidooporności. Co więcej, badania takie można by z powodzeniem stosować u rodzeństwa pacjentów, aby ewentualnie objąć ich opieką profilaktyczną w poradni nefrologicznej.

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

2. Cele

Celeami niniejszej pracy była:

- 2.1. analiza mutacji w trzech kluczowych genów (*NPHS1* kodujący nefrynę, *NPHS2* kodujący podocynę oraz *WT1* kodujący białko guza Wilmsa) u dzieci z zespołem nerczycowym,
- 2.2. analiza znanych i opisanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w wyżej wymienionych genach,
- 2.3. określenie struktur badanych genów oraz ich różnic w otrzymanych blokach haplotypowych u dzieci z zespołem nerczycowym oraz u zdrowych osób,
- 2.4. określenie znaczenia zmian genetycznych wyżej wymienionych genów w zespole nerczycowym,
- 2.5. identyfikacja nowych mutacji pojawiających się u pacjentów z zespołem nerczycowym, celem ich zastosowania w badaniach diagnostycznych.

3. Pacjenci i Metody

3.1. Pacjenci

Na prowadzone badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 974/09, załącznik 1). Badania przeprowadzono w sumie na 124 pacjentach, w tym 33 pacjentach chorujących na zespół nerczycowy oraz 91 pacjentach bez objawów NS. Przed pobraniem krwi obwodowej do badań, opiekunowie prawni każdego pacjenta zarówno z grupy badanej, jak i kontrolnej, zostali poinformowani o celu badań oraz korzyściach płynących z przeprowadzenia takich analiz wśród polskich pacjentów chorujących na NS. Opiekunowie prawni otrzymali informację o badaniu w formie pisemnej zamieszczonej na oświadczeniu świadomej zgody na udział w badaniach genetycznych pacjentów (dzieci). Opiekunowie podpisali również zgodę na udział w badaniach DNA. Do niniejszej pracy załączono kopię świadomej zgody na udział w badaniu (załącznik 2).

3.1.1. Grupa badana

Grupę z zespołem nerczycowym stanowiło 33 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badana grupa pacjentów obejmowała: 64% chłopców (n=21) oraz 36% dziewcząt (n=12) w wieku od 6 miesięcy do 19 lat (średnia 10,7). W rozpoznaniu klinicznym stwierdzono: steroidooporny NS (SRNS, n=23), pierwszy rzut NS (I NS, n=8), trzeci rzut NS (III NS, n=1) oraz piąty rzut NS (V NS, n=1).

U każdego pacjenta przeprowadzono dokładny wywiad medyczny w oparciu o ankietę (załącznik 3) przygotowaną na podstawie kwestionariusza prof. dr. F. Hildebrandta.

Ankieta pozwoliła na uzyskanie informacji o czasie trwania choroby, wieku wystąpienia pierwszego rzutu NS, wyniku biopsji nerki (o ile była przeprowadzona), stanie klinicznym pacjenta w dniu przyjęcia do szpitala, stosowanego leczenia w odniesieniu do NS oraz odpowiedzi na daną terapię. Dodatkowo, uzyskano informacje o wystąpieniu szeregu schorzeń, które mają charakter dziedziczny lub zostały powiązane z genetycznie uwarunkowanym NS. Pytanie to dotyczyło samego pacjenta oraz członków rodziny, gdyż badania genetyczne wymagają zdobycia jak najpełniejszej informacji o historii chorób w

rodzinie, w szczególności schorzeń dziedziczonych w sposób złożony z udziałem wielu genów. W ankiecie wyszczególniono następujące choroby lub cechy charakterystyczne: głuchotę, ślepotę, małogłowie, opóźnienie, cukrzycę typu I, choroby immunologiczne (reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Leśniewskiego-Crohna) niski wzrost, dystrofię twarzy, sześciopalczałość, dysplazję kręgowo-nasadową, anomalie przewodu moczowego, anomalie lub wady serca, alergie, nowotwory / guzy Wilmsa, choroby pęcherza moczowego, wirusowe zapalenie wątroby typu B.

Dane pacjentów, zgodnie z ustawą o ochronie danych osobowych, zostały zakodowane. Począwszy od momentu otrzymania próbki z krwią, pacjentowi nadawany był unikalny numer, którym oznaczano próbki danego pacjenta we wszystkich kolejnych etapach analizy.

3.1.2. Grupa kontrolna

Bazę grupy kontrolnej stanowiło 91 osób (płeć męska n=52, płeć żeńska n=39) z polskiej populacji, z województwa wielkopolskiego, u których nigdy nie wystąpiły objawy zespołu nerczycowego ani białkomoczu. Wśród 91 osób, 23% stanowili ochotnicy (n=21), natomiast 77% pacjenci z Kliniki Otolaryngologii Dziecięcej UM w Poznaniu (n=70), przyjęci na oddział w celu usunięcia migdałków. W celu przeprowadzenia badań genetycznych, wyselekcjonowano grupę 30 dzieci z oddziału Otolaryngologii w wieku od 4 do 18 lat (średnia 9,7). Wybór pacjentów z oddziału otolaryngologicznego był podyktowany faktem, że powodem przyjęcia do szpitala nie była poważna choroba zagrażająca życiu. Przed pobraniem materiału biologicznego do badań, opiekunowie prawni pacjentów w grupy kontrolnej zostali poproszeni o uzupełnienie ankiety zawierającej pytania o historię chorób w rodzinie, w szczególności chorób dziedzicznych i powiązanych z uwarunkowanym genetycznie NS. Przygotowana ankieta stanowiła zmodyfikowaną wersję ankiety przeznaczonej dla pacjentów z NS. Kopia ankiety dla grupy kontrolnej została załączona do niniejszej pracy (załącznik 4). Nikt z rodzin osób z populacji kontrolnej nie cierpiał na zespół nerczycowy. Jedyнным czynnikiem różnicującym grupę kontrolną od badanej było występowanie zespołu nerczycowego.

Dodatkowo, dla pacjentów z grupy kontrolnej wykonano analizę ogólną moczu, w celu określenia, czy otrzymane wyniki zawierają się w granicach przyjętych norm. Badania

moczu obejmowały następujące parametry: pH, ciężar właściwy, białko, glukoza, liczba erytrocytów i leukocytów w osadzie moczu.

Dla każdego z trzech badanych genów wyselekcjonowano odpowiednią grupę pacjentów bazując na dotychczas zdobytej wiedzy o podłożu genetycznym NS. Wybór pacjentów był uzależniony od wieku wystąpienia pierwszego rzutu choroby oraz odpowiedzi na leczenie glikokortykosteroidami. Do analizy poszczególnych genów wybrano niezależne grupy pacjentów, o różnej liczebności. W przypadku genu nefryny analizie poddano grupę 14 pacjentów chorujących na zespół nerczycowy, w tym 13 pacjentów SRNS i 1 pacjenta z I rzutem NS, oraz 20 dzieci bez objawów NS. W przypadku genu podocyny przeprowadzono analizę sekwencji dla 22 pacjentów z zespołem nerczycowym (21 pacjentów z SRNS, 1 pacjent I rzutu NS) oraz 30 dzieci bez objawów NS. W przypadku genu *WT1* przeanalizowano 14 pacjentów z zespołem nerczycowym (12 pacjentów z SRNS, 2 pacjentów I rzutu NS) oraz 20 dzieci bez objawów NS.

Liczba osób z grupy kontrolnej została ustalona indywidualnie dla każdego z badanych genów, w zależności od liczby analizowanych pacjentów. Liczba osób zdrowych była około półtora raza większa niż liczba pacjentów NS.

3.1.3. Materiał do badań

Zarówno w przypadku grupy badanej, jak i kontrolnej, materiałem do badań była krew obwodowa pobrana podczas rutynowych badań w szpitalu, odpowiednio w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej lub w Klinice Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Krew do badań rutynowych pobierana była do probówek ze złożem EDTA, z których pipetą odmierzano 200 µl w celu izolacji całkowitego genomowego DNA z wykorzystaniem systemu kolumnowego. Wybór probówek ze złożem EDTA był niezwykle istotny, ponieważ alternatywnie stosowane probówki z heparyną uniemożliwiają lub utrudniają wykorzystanie DNA do celów badań naukowych, jako że heparyna jest inhibitorem reakcji PCR.

3.2. Metody

Wszystkie etapy analizy genetycznej zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.2.1. Izolacja całkowitego genomowego DNA w krwi obwodowej

W celu izolacji całkowitego genomowego DNA w krwi obwodowej od pacjentów w grupy badanej i kontrolnej wykorzystano komercyjnie dostępny system kolumnowy ze złożem krzemionkowym QIAamp DNA Mini Blood firmy QIAGEN. Pojedyncza kolumna pozwala na wyizolowanie około 6 µg DNA z 200 µl mrożonej lub świeżej krwi obwodowej. Wszystkie etapy izolacji oraz wirowania przeprowadzono w temperaturze pokojowej.

Do próbki typu Eppendorf (1,5 ml) pobierano 200 µl krwi oraz odpowiednio opisywano próbkę wykorzystując opracowany system kodowania, krew przechowywano w temperaturze -80°C do momentu izolacji DNA.

Po wyjęciu próbki w zamrażarki i jej rozmrożeniu w temperaturze pokojowej, opisywano nową próbkę Eppendorf (1,5 ml), na jej dno dodawano 20 µl Proteinazy K. Do próbki dodawano 200 µl krwi oraz 200 µl buforu lizującego AL. Próbkę umieszczano na mieszadle typu vortex na 15 sekund. W celu przeprowadzenia lizy erytrocytów oraz strawienia białek związanych z DNA, próbkę umieszczano w bloku grzejnym o temperaturze 56 °C na 10 minut. Po upływie 10 minut zawartość próbki zmieniała kolor na brunatno-zielony, co świadczyło o poprawnie przeprowadzonej lizie erytrocytów. W celu usunięcia mieszaniny z wieczka, próbkę umieszczano w wirówce laboratoryjnej na kilka sekund. Do próbki dodawano 200 µl czystego etanolu (96-100%), a następnie umieszczano na mieszadle typu vortex na 15 sekund w celu wymieszania zawartości. Zawartość próbki ostrożnie наносono na opisaną uprzednio tym samym numerem kolumnę do izolacji DNA QIAamp Mini. Kolumnę umieszczano w wirówce i wirowano z szybkością 8000 rpm przez 1 minutę. Podczas wirowania rozpuszczalnik przechodził przez złożę, natomiast DNA ulegało związaniu ze złożem poprzez tworzenie wiązań z krzemionką przy odpowiednim pH oraz stężeniu soli chaotropowych. Kolumnę ze związanym DNA umieszczano w nowej próbce odbierającej, zaś starą wraz z supernatantem wyrzucano do pojemnika na skażone odpady biologiczne w celu utylizacji. Następnie na kolumnę наносono 500 µl buforu płuczącego AW1 w celu usunięcia zanieczyszczeń, wirowano przy szybkości 8000 rpm przez 1 minutę. Kolumnę ze złożem ponownie umieszczano w nowej próbce odbierającej, zaś otrzymany supernatant wyrzucano do pojemnika na skażone odpady biologiczne. Ponownie przemyto złożę ze związanym DNA, tym razem z wykorzystaniem 500 µl buforu AW2. Po naniesieniu buforu płuczącego AW2, kolumnę wirowano przy szybkości 14000 rpm przez 4 minuty. Kolejnym etapem izolacji DNA było odzyskanie związanego kwasu dezoksyrybonukleinowego ze złoża krzemionkowego. Kolumnę umieszczano w nowej

opisanej odpowiednim numerem probówki Eppendorf (1,5 ml), a na dno dodawano 200 μ l buforu elucyjnego AE. Skład buforu AE, podobnie jak pozostałym buforów zawartych w zestawie, jest strzeżony patentem i tajemnicą producenta, jednak DNA można odzyskać poprzez elucję ze złoża krzemionkowego stosując czystą wodę lub roztwór Tris-EDTA. Po dodaniu buforu AE, kolumnę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut, a następnie wirowano przy szybkości 8000 rpm przez 1 minutę. Wyizolowany całkowity genomowy DNA otrzymywano w probówce Eppendorf, zaś kolumnę wyrzucano.

Otrzymany materiał był bezpośrednio wykorzystywany do kolejnych etapów badań i nie wymagał dodatkowych etapów oczyszczania jak np. precipitacja. Wykorzystane odczynniki przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Odczynniki wykorzystane do izolacji całkowitego genomowego DNA.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Kit do izolacji DNA: QIAamp DNA Mini Blood	QIAGEN	51106
Bufor lizujący AL (Lysis buffer)		
Bufor płuczający 1 AW1 (Wash buffer 1)		
Bufor płuczający 2 AW2 (Wash buffer 2)		
Bufor elucyjny AE (Elution buffer)		
Proteinaza K		
Alkohol etylowy bezwodny (EtOH) 99,8%	POCH	396480111

3.2.2. Pomiar stężenia DNA

Ilość wyizolowanego genomowego DNA mierzono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem urządzenia Nano-Drop ND-1000 firmy NanoDrop ThermoScientific. Pomiar stężonego DNA był wyrażony w jednostkach ng/ μ l. Dodatkowo urządzenie Nano-Drop pozwoliło na określenie jakości otrzymanego DNA poprzez pomiar stosunku absorbancji przy fali 260 nm do fali o długości 280 nm. Pomiar ten powinien mieścić się w granicach 1,8-2,0, co świadczy o czystości otrzymanego materiału genetycznego. Wartości wykraczające poza wskazane ramy informują o zanieczyszczeniu fenolem, białkami lub solami.

W celu określenia stężenia DNA, po uruchomieniu komputera sprzężonego ze spektrofotometrem oraz wybraniu w programie obsługującym urządzenie opcji: pomiar stężenia DNA, na punkt pomiarowy pipetą nakładano 1 μ l czystej wody wolnej od nukleaz firmy Ambion w celu kalibracji. Następnie dokonywano pomiaru próby ślepej, w przypadku

DNA był to bufor elucyjny AE z zestawu do izolacji DNA firmy Qiagen, w którym izolat DNA był zawieszony. W tym celu umieszczano 1 μ l buforu AE w miejscu pomiarowym i dokonywano pomiaru próby ślepej (tła). Po przetarciu miejsca pomiarowego czystą ligniną, dokonywano pomiaru stężenia próbki właściwej zawierającej wyizolowany genomowy DNA. Analogicznie, na miejsce pomiarowe nanoszono pipetą 1 μ l izolatu, otrzymaną wartość stężenia DNA odnotowywano, a następnie w tabeli z pomiarem sprawdzano stosunek wartości absorbancji próbki przy fali 260nm/280nm określając stopień czystości DNA.

3.2.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR)

W doświadczeniach wykorzystano technikę PCR w celu amplifikacji rejonów kodujących genów (eksonów), które na podstawie literatury zostały wyselekcjonowane do badania podłoża genetycznego zespołu nerczycowego u dzieci. Do genów tych zaliczono: *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1*. Jako matryce dla polimerazy posłużyły preparaty całkowitego genomowego DNA izolowanego z krwi obwodowej od pacjentów z NS oraz od pacjentów z grupy kontrolnej. Mieszanina reakcyjna o objętości 12,5 μ l zawierała całkowity ludzki DNA w ilości 50-100 ng na reakcję, 0,6 jednostki (5 U/1 μ l) polimerazy FastStart Taq, 0,25mM mieszaniny trifosforanów dezoksyrybonukleotydów dNTP, 10 x bufor reakcyjny z dodatkiem $MgCl_2$, 5 x bufor GC, wodę wolną od nukleaz. Informacje dotyczące odczynników wykorzystanych do reakcji zestawiono w Tabeli 2. Każdorazowo oprócz próbek badanych przygotowywano dodatkową próbę nie zawierającą DNA, która stanowiła negatywną kontrolę i potwierdzała czystość wykorzystywanych odczynników.

Do reakcji PCR zastosowano startery zaprojektowane w celu amplifikacji 10 fragmentów kodujących w obrębie genu *NPHS1* kodującego nefrynę, 8 fragmentów kodujących w obrębie genu *NPHS2* kodującego podocynę oraz 9 fragmentów kodujących w obrębie genu *WT1* kodującego białko guza Wilmsa 1. Informacje dotyczące wykorzystanych starterów zostały zestawione w Tabeli 3. Wszystkie startery zostały zamówione w firmie IBB PAN w Warszawie oraz dostarczone w formie zliofilizowanej.

Po zakończeniu reakcji PCR, próby nakładane były na 1 % żel agarozowy zawierający bromek etydionowy w ilości 0,52 μ g/ ml żelu. W celu oszacowania ciężarów cząsteczkowych, do jednej z kieszonek żelu dodawano marker ciężarów cząsteczkowych Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas). Etap elektroforezy informował o długości otrzymanych produktów i potwierdzał specyficzność wykorzystanych starterów na podstawie obecności pojedynczego prążka w żelu.

Startery do reakcji PCR zaprojektowano dla eksonów genów *NPISH1*, *NPISH2* oraz *WT1* dostępnej w bazach danych NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) oraz SNPper (<http://snpper.chip.org>) wykorzystując program Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), zaś unikalność wybranych par oligonukleotydów w ludzkim genomie sprawdzono dzięki programowi blast2sequences (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>).

Tabela 2. Odczynniki wykorzystane do reakcji PCR.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
FastStart Taq DNA Polymerase, 1000U	Roche	12032937001
GC Rich Solution 5x	Roche	12032929001
PCR Buffer + MgCl ₂ 10x	Roche	12032929001
dNTP MIX 5mM	Novazym	D1000-05
Woda wolna od nukleaz (Nuclease-free water, not DEPC-treated)	Ambion, Applied Biosystems	AM9930

Tabela 3. Startery wykorzystane do reakcji PCR.

Oligodezoksurybonukleotydy – funkcja starterów w reakcji PCR (IBB PAN, Warszawa)				
Gen <i>NPISH1</i> (nefryna), accession number NG_013356.1				
Fragment genu	Analizowane eksony	Nazwa startera	Sekwencja startera	Temp. Topnienia
Nef 1	1, 2, 3, 4	Nef1_f	GAAAAGCAGGTGGCAGAGAC	60
		Nef1_r	GGCCCTTAGAAGGGTACTGG	59,9
Nef 2	5	Nef2_f	CCATGCTCCCCAGAATCTAT	59
		Nef2_r	AATTGGGTCCCAGATGTTCA	60,2
Nef 3	6, 7, 8	Nef3_f	GGGACTTAGACCAGGTGTGG	59,4
		Nef3_r	TTGGCATCCAGTAGGCATAA	59,1
Nef 4	9, 10, 11	Nef4_f	ATGCC TACTGGATGCCAAAG	60,1
		Nef4_r	TGCCCAAGATTCTGAAGGAG	60,3
Nef 5	12, 13, 14	Nef5_f	ACCCAGTGGGCAGGGTAG	60,9
		Nef5_r	ACCTATGATTGCGTCACTGC	58,8
Nef 6	15, 16, 17	Nef6_f	TCGTGACCCCAACTTTAACC	59,8
		Nef6_r	ATGTATGTGGTCCCCACTCC	58,5
Nef 7	18, 19, 20	Nef7_f	CCTCTGTGGAGGGTGATTGT	60
		Nef7_r	CAATCAGGGATGTGGGAATG	61,1
Nef 8	21,22	Nef8_f	AGGGAAAACCTGGACAGAATC	59,4
		Nef8_r	TGTGACCTTGGACAATTTGC	59,5
Nef 9	23	Nef9_f	CAGTTCCCATGAATCTAATAGGC	59
		Nef9_r	GCTTGCCAGAATAAGTCG	60

Nef 10	24, 25, 26, 27, 28	Nef10_f	CCTCTGCCCATCTGTTTCTC	59,8
		Nef10_r	ATCATGGTCAGGCCTCTTTG	60,1
Gen <i>NPHS2</i> (podocyna), accession number NG_007535.1				
Pod 1	1	Pod1_f	AGCGACTCCACAGGGACT	58,3
		Pod1_r	CAATCTGCTCTGGCTTCAGT	58,2
Pod 2	2	pod2_f	CAGGCCCTGTGAACTCTGAC	60,9
		Pod2_r	TGAGCAAGGTCTTGGAGGAG	60,5
Pod 3	3	Pod3_f	TTTTCTGGTTCTCAAAACAAAA	60
		Pod3_r	CATGTGGGCTCTCTGTACCA	59,7
Pod 4	4	Pod4_f	TTTACCCTCAGGTGGAGGTG	60
		Pod4_r	TCCCTAGATTGCCTTTGCAC	60,2
Pod 5	5	Pod5_f	GGGTAGGCCAACTCCATTTT	60,2
		Pod5_r	TATGAGCTCCCAAAGGGATG	60
Pod 6	6	Pod6_f	CAGGCAAATAATGTCCTTTCAA	59,1
		Pod6_r	CCTGGCCTAAAATGGGAAAT	60,1
Pod 7	7	Pod7_f	AGGAATGGCACACTCTGGTC	60,1
		Pod7_r	GTTGTAAGGGCCCAAGACAG	60
Pod 8	8	Pod8_f	TTAACCGTGCTTGCCACATA	60,1
		Pod8_r	TGGATGGTGCATTGTGACTT	60
Gen <i>WT1</i> (białko guza Wilmsa 1), accession number NG_009272.1				
WT1_1	1	WT1_1f	GGCTGCTGAGTGAATGGAG	59,5
		WT1_1r	GGGAAGCAGCTGGGTAAGAG	61,3
WT1_2	2,3	WT1_2f	GTCTTCCTGCCGAAAGTCCT	60,8
		WT1_2r	GTCTCGTGCCTCCAAGACC	60,8
WT1_3	4	WT1_3f	ATGTGGAGGCTTGCAC TTC	60,3
		WT1_3r	ACCAACTAGGGGAAGGAGGA	59,9
WT1_4	5	WT1_4f	GGGACTGGGGACTTAGTTCA	59
		WT1_4r	CCCCAGCATGTGTATGATGA	60,3
WT1_5	6	WT1_5f	GAGGGAGGCAAAAACCAACT	60,5
		WT1_5r	AAGGAGCCTGCAGTGAAGAA	60,1
WT1_6	7	WT1_6f	GGAGTGTGAATGGGAGTGGT	59,8
		WT1_6r	TGGATCAGACCTTTCAAAGCA	60,8
WT1_7	8	WT1_7f	CCCTGAGCTCCCATTCAIT	61,4
		WT1_7r	ATTAAAGAGGAGGAACATCTCCAG	59,2
WT1_8	9	WT1_8f	GCAGATGCAGACATTGCAG	59,1
		WT1_8r	GCCACGCACTATTCTTCTC	59,8
WT1_9	10	WT1_9f	GCTCAGGGACAGAATGATGG	60,6
		WT1_9r	CCAGGCACACCTGGTAGTTT	60

Wszystkie reakcje PCR zostały przeprowadzone w oparciu o taki sam skład mieszaniny, informacje dotyczące ilości poszczególnych odczynników w pojedynczej reakcji PCR przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR dla genów *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1*.

Odczynnik	Dodawana objętość
FastStart Taq DNA Polymerase	0,12 µl
GC Rich Solution 5x	2,5 µl
PCR Buffer + MgCl ₂ 10x	1,25 µl
dNTP MIX 5mM	0,6 µl
MIX starterów F+R 12,5 µM	0,5 µl
Nuclease-free water, not DEPC-treated	5,53 µl
Genomowy DNA	2 µl
Całkowita objętość reakcji PCR	12,5 µl

Tabela 5. Szczegółowe parametry programów amplifikacyjnych reakcji PCR.

Fragment	Wstępna denaturacja	Denaturacja	Annealing	Elongacja	Liczba cykli	Amplifikacja
Nef 1	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 90 sec	35	72°C / 7 min
Nef 2	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 30 sec	35	72°C / 7 min
Nef 3	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Nef 4	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Nef 5	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 90 sec	35	72°C / 7 min
Nef 6	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 90 sec	35	72°C / 7 min
Nef 7	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 90 sec	35	72°C / 7 min
Nef 8	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Nef 9	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 30 sec	35	72°C / 7 min
Nef 10	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 90 sec	35	72°C / 7 min
Pod 1	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Pod 2	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Pod 3	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	55°C / 30 sek	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Pod 4	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	58°C / 30 sek	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Pod 5	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sek	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Pod 6	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	58°C / 30 sek	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Pod 7	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sek	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
Pod 8	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sek	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
WT1_1	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sek	72°C / 90 sec	35	72°C / 7 min
WT1_2	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sek	72°C / 90 sec	35	72°C / 7 min
WT1_3	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sek	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min

WT1_4	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
WT1_5	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
WT1_6	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
WT1_7	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
WT1_8	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	59°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min
WT1_9	95°C / 4 min	95°C / 30 sek	60°C / 30 sec	72°C / 60 sec	35	72°C / 7 min

Reakcje PCR prowadzone były z wykorzystaniem termocyklera RealPlex Mastercycler epgradientS firmy Eppendorf oraz licznych programów amplifikacyjnych, co podyktowane było różną długością namnażanego produktu oraz temperaturą topnienia wykorzystanych starterów. W Tabeli 5 zamieszczono zestawienie parametrów reakcji PCR.

3.2.4. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym

Zamplifikowane fragmenty genów *NPHS1*, *NPHS2* i *WT1* przeznaczone do analizy genetycznej w poszukiwaniu mutacji oraz analizy polimorfizmów SNP, rozdzielano w 1,5% żelach agarozowych o wysokiej temperaturze topnienia, przygotowanych w buforze 1 x TBE (Tris, Kwas borowy, EDTA pH 8.0). Roztwór TBE wykorzystano również jako bufor elektrodowy. Odpowiednią ilość roztworu EtBr (2µl roztwór o stężeniu 10 mg/ml) dodawano do roztopionego zolu agarozowego po jego ostygnięciu do około 50°C w celu późniejszej oceny długości otrzymanych fragmentów DNA oraz ich jakości. Elektroforezę prowadzono 20 minut przy napięciu 90mV w aparacie PowerPac Basic firmy BIO-RAD. Po zakończeniu elektroforezy, żełe umieszczano na podświetlarce emitującej światło nadfioletowe (X = 302 nm) i fotografowano z wykorzystaniem system do wizualizacji żeli GelDoc-It Imaging System, UVP. Zdjęcia otrzymywano i analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Life Science Software Launch VisionWorksLS. W celu określenia długości produktów PCR, zastosowano wzorzec długości DNA Ladder 1kb (Fermentas). Odczynniki wykorzystane do rozdziału elektroforetycznego przedstawia Tabela 6.

Tabela 6. Odczynniki wykorzystane do rozdziálu produktów reakcji PCR w żelu agarozowym.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Agaroza	Abo Prona Basica	LE BGQT1
Bromek Etydionowy (EtBr)	SIGMA	E1510 056K8907
Marker ciężaru cząsteczkowego: Gene Ruler 1 kb DNA Ladder 0,5 µg/µl	Fermentas	SM0311
Obciążacz: 6x loading Dye Solution	Fermentas	R0611
Bufor TBE		
Tris	Sigma	T6066
Kwas borowy (boric acid)	Sigma	B7901
EDTA 0,5M pH 8,0	Sigma	E0399

3.2.5 Szacowanie długości fragmentów DNA na podstawie prędkości migracji podczas elektroforezy w żelach agarozowych

Stosowano wzorzec ciężaru cząsteczkowego GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas), który po rozdziale w 1,5% żelu agarozowym, umożliwił identyfikację fragmentów DNA, długości produktów PCR poszczególnych fragmentów genów *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1* wyrażone w parach zasad (pz) przedstawia Tabela 7.

Tabela 7. Długości produktów PCR dla genów *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1*.

Fragment genu	Długość produktu PCR	Fragment genu	Długość produktu PCR	Fragment genu	Długość produktu PCR
<i>NPHS1</i> (nefryna)		<i>NPHS2</i> (podocyna)		<i>WT1</i> (białko guza Wilmsa 1)	
Nef 1	1072 pz	Pod 1	460 pz	WT1_1	1053 pz
Nef 2	263 pz	Pod 2	432 pz	WT1_2	960 pz
Nef 3	877 pz	Pod 3	412 pz	WT1_3	343 pz
Nef 4	947 pz	Pod 4	412 pz	WT1_4	370 pz
Nef 5	1062 pz	Pod 5	455 pz	WT1_5	353 pz
Nef 6	1181 pz	Pod 6	450 pz	WT1_6	420 pz
Nef 7	1016 pz	Pod 7	343 pz	WT1_7	426 pz
Nef 8	579 pz	Pod 8	544 pz	WT1_8	359 pz
Nef 9	276 pz			WT1_9	416 pz
Nef 10	1161 pz				

3.2.6. Oczyszczanie produktów reakcji PCR

Po weryfikacji jakości otrzymanych produktów PCR metodą elektroforezy w żelu agarozowym, próby oczyszczano w celu usunięcia pozostałych, niewykorzystanych starterów oraz trifosforanów dezoksyrybonukleinowych. W tym celu stosowano system kolumnowy MultiScreen HTS firmy Millipore. Do próbki zawierającej produkt PCR dodawano 200 μ l wody wolnej od nukleaz, a następnie całość przenoszono pipetą na płytkę do oczyszczania. Dno każdego dołka płytki zaopatrzone było w membranę o porach, których wielkość pozwalała na zatrzymanie cząsteczek kwasu nukleinowego o długości powyżej 100 pz, cząsteczki mniejsze mogły swobodnie przechodzić przez kolumnę. Następnie płytkę umieszczano na próżniowym systemie ssącym na 15-20 minut, tak, aby większość płynu przeszła przez kolumnę, ale aby powierzchnia kolumny nie wyschła całkowicie. W tym celu wykorzystano system do próżniowego odsysania SNAP i.d. Millipore. W wyniku działania próżni, do odbieralnika odsysane były zanieczyszczenia, zaś czysty produkt PCR pozostawał na powierzchni membrany. W celu odzyskania produktu, na dno kolumny oczyszczającej наносono 20 μ l wody wolnej od nukleaz, a następnie tipsem przemywano kilkakrotnie powierzchnię membrany w celu związania z wodą jak największej frakcji produktu PCR. W kolejnym etapie oczyszczony produkt o objętości 20 μ l przenoszono do nowej próbki PCR lub na płytkę, którą odpowiednio opisywano. Po zakończeniu procedury oczyszczania, ponownie mierzono stężenie DNA z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop w sposób analogiczny do pomiaru genomowego DNA po izolacji z krwi obwodowej. Pomiaru dokonywano także dla oczyszczonej próbki PCR, która stanowiła kontrolę negatywną. Celem było określenie wydajności procedury oczyszczania DNA, ponieważ w próbce nie zawierającej produktu DNA, a jedynie niewykorzystane startery oraz dNTP, po oczyszczeniu nie powinno znajdować się DNA. Wynik pomiaru dla negatywnej próby zawsze wskazuje pewną wartość dodatnią, która jest odejmowana od pomiaru stężenia oczyszczonego produktu PCR w próbce badanej. Otrzymana w ten sposób wartość stężenia stanowi wiarygodny wynik nieobarczony błędem metody badawczej. Pomiar stężenia produktu PCR po oczyszczeniu był niezbędny do przeprowadzenia kolejnego etapu analizy – reakcji sekwencjonowania. Przed przystąpieniem do kolejnego etapu badań, wszystkie oczyszczone produkty PCR rozcieńczano do stężenia 2,5 ng/ μ l wykorzystując wodę wolną od nukleaz. Odczynniki oraz zestaw wykorzystane do oczyszczania produktów PCR przedstawia Tabela 8. Oczyszczone produkty posłużyły jako matryce do reakcji reamplifikacji, czyli sekwencjonowania z wykorzystaniem wyznakowanych fluorescencyjnie dideoksyrybonukleotydów (ddNTP).

Tabela 8. Odczynniki oraz zestaw wykorzystane do oczyszczania produktów PCR.

Odczynnik / zestaw	Producent	Numer katalogowy
MultiScreen HTS (96-well filtration system)	Millipore	MSNU03010
Woda wolna od nukleaz (Nuclease-free water, not DEPC-treated)	Ambion, Applied Biosystems	AM9930

3.2.7. Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR w celu poszukiwania mutacji oraz genotypowania polimorfizmów SNP.

W celu uzyskania informacji o obecności mutacji oraz polimorfizmów w badanych genach struktury podocyta, *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1*, wykorzystano technikę sekwencjonowania DNA. Zasada reakcji sekwencjonowania stanowi modyfikację tradycyjnej techniki PCR. W reakcji sekwencjonowania matrycą były oczyszczone produkty reakcji PCR obejmujące rejony kodujące (eksony) poszczególnych genów. Jako startery posłużyły te same oligonukleotydy, które wykorzystano do reakcji PCR dla danego fragmentu genu, jednak do reakcji sekwencjonowania dodawano tylko 1 starter, w orientacji forward lub reverse. W przypadku fragmentów, których długość przekraczała 900 pz, wykonywano sekwencjonowanie w obu kierunkach, ponieważ w pojedynczym kierunku sekwencje dobrej jakości mają długość do 800 pz. Sekwencjonowania w obu kierunkach wymagały następujące produkty PCR: Nef1, Nef5, Nef6, Nef7, Nef10, WT1_1, WT1_2. W mieszaninie reakcji sekwencjonowania oprócz tradycyjnych dNTP znajdują się dodatkowo wyznakowane fluorescencyjnie dideoksyrybonukleotydy (ddNTP), które posiadają grupę OH przy węglu 3'. Dzięki temu po przyłączeniu wyznakowanego ddNTP, do powstającego produktu nie może przyłączyć się kolejny nukleotyd. Wyróżnia się cztery typy ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP, w zależności od rodzaju zasady azotowej, poszczególne cząsteczki wyznakowane są innym fluorochromem, co umożliwia identyfikację i odczyt sekwencji DNA. Zastosowane cztery barwniki fluorescencyjne posiadają bowiem inne widmo absorpcji i emisji światła, generując odmienne sygnały szczytowe w kolejnym etapie sekwencjonowania przez sekwenator. Mieszanina reakcyjna o objętości 10 µl zawierała oczyszczony produkt PCR w ilości 2,5 ng, bufor BigDye Sequencing Buffer 5x, odczynnik do sekwencjonowania zawierający dNTP, ddNTP oraz polimerazę - BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, specyficzny starter dla danego produktu PCR w orientacji forward lub reverse oraz wodę

wolną od nukleaz. Odczynniki wykorzystane do reakcji sekwencjonowania przedstawia Tabela 9. Skład pojedynczej mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 10.

Tabela 9. Odczynniki wykorzystane do reakcji sekwencjonowania przedstawia.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4336915
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix		
5x BigDye Sequencing Buffer		
Woda wolna od nukleaz (Nuclease-free water, not DEPC-treated)	Ambion, Applied Biosystems	AM9930
Starter do reakcji PCR (specyficzny)	IBB PAN, Warszawa	Zamówienie indywidualne

Tabela 10. Skład mieszaniny w reakcji sekwencjonowania.

Odczynnik	Dodawana objętość
5x Bufor BigDye Sequencing Buffer	1 μ l
BigDye Ready reaction Mix	0,2 μ l
Starter specyficzny dla produktu PCR (F lub R) 12, 5 μ M	1 μ l
Oczyszczony produkt reakcji PCR (2,5 ng/ μ l)	1 μ l
Nuclease-free water, not DEPC-treated	6,8 μ l
Całkowita objętość reakcji PCR	10 μ l

Reakcje sekwencjonowania prowadzone były z wykorzystaniem termocyklera RealPlex Mastercycler egradientS firmy Eppendorf oraz jednego uniwersalnego programu amplifikacyjnego. Jednolity program amplifikacji był możliwy dzięki obniżeniu temperatury annealingu do wartości 52°C, niezależnie od sekwencji zastosowanego w reakcji startera oraz jego temperatury topnienia. W Tabeli 11 zamieszczono parametry programu reakcji sekwencjonowania.

Tabela 11. Parametry programu reakcji sekwencjonowania.

Etap reakcji sekwencjonowania	Wstępna denaturacja	Denaturacja	Annealing	Elongacja	Liczba cykli
Temp. / czas	96°C / 1 min	96°C / 10 sek	52°C / 5 sec	60°C / 4 min	25

3.2.8. Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania

Po przeprowadzeniu reakcji sekwencjonowania, w mieszaninie reakcyjnej znajdowały się produkty powstałe w wyniku amplifikacji zastosowanego startera, produkty te miały różne długości, począwszy od długości startera + 1, a skończywszy na najdłuższym produkcie o długości identycznej jak zastosowany do reakcji produkt PCR. Każdy powstały produkt zakończony był wyznakowanym fluorescencyjnie ddNTP, przy czym rodzaj barwnika wskazywał na typ przyłączonego nukleotydu. Przykładowo, dla produktu o długości 200 pz oraz zastosowanego specyficznego startera o długości 20 pz, otrzymano produkty o długości od 21 pz do 200 pz. W mieszaninie reakcyjnej oprócz właściwych produktów, znajdowały się dodatkowo niewykorzystane startery oraz wyznakowane fluorescencyjnie ddNTP. Ich obecność w mieszaninie reakcyjnej zaburzyłaby odczyt otrzymanych sekwencji i uniemożliwiła dalszą analizę głównie ze względu na sygnał generowany przez fluorochromy przyłączone do zmodyfikowanych nukleotydów. Z tego względu niezbędnym etapem było oczyszczenie produktów reakcji sekwencjonowania. Wykorzystano w tym celu zestaw BigDye Terminator bazujący na kuleczkach wychytujących niewykorzystane w reakcji ddNTP. Oczyszczanie przeprowadzane było na płytkach wykorzystywanych następnie do rozdziału elektroforezy kapilarnej. Po otrzymaniu produktów sekwencjonowania, całą zawartość próbki przenoszono na płytkę 96-dołkową do sekwencjonowania, a następnie dodawano 45 µl odczynnika SAM oraz 10 µl odczynnika Xterminator Solution. Tak przygotowane produkty umieszczano na wytrząsarce firmy Millipore na 10 minut przy maksymalnej sile wytrząsania. Następnie płytkę wirowano przez 1 minutę w celu strącenia kuleczek wraz ze związanymi ddNTP na dno dołków, produkty reakcji sekwencjonowania pozostawały w supernatancie. Otrzymane oczyszczone produkty były bezpośrednio gotowe do rozdziału kapilarnego w celu odczytania sekwencji DNA. Odczynniki oraz płytka wykorzystane do oczyszczenia produktów sekwencjonowania przedstawia Tabela 12.

Tabela 12. Odczynniki oraz płytka wykorzystane do oczyszczenia produktów sekwencjonowania.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
BigDye XTerminator Purification Kit	Applied Biosystems	437686
SAM Solution		
XTerminator Solution		
Reaction Plate 96-w no barcode	Applied Biosystems	N8010560

3.2.9. Elektroforeza kapilarna produktów sekwencjonowania.

Otrzymane produkty reakcji sekwencjonowania posiadały znaczniki fluorescencyjne, dzięki czemu ich odczytanie możliwe było z wykorzystaniem analizatora genetycznego – sekwenatora zaopatrzonego w skaner czuły na światło o różnej długości fali. W celu poznania sekwencji kodujących fragmentów badanych genów, produkty sekwencjonowania poddawane były rozdzielowi elektroforezy kapilarnej, która stanowi modyfikację tradycyjnej elektroforezy w żelu agarozowym. W tym przypadku rozdział prowadzony jest w niezwykle cienkich kapilarach o długości 50 cm, których objętość wynosi zaledwie kilka μl , zaś polimer jest skomponowany na bazie mocznika.

Oczyszczone produkty sekwencjonowania znajdowały się na płytkach przeznaczonych do rozdziału kapilarnego. Po umieszczeniu płytki w sekwenatorze ABI Prism 3130 firmy Applied Biosystems oraz dobraniu odpowiednich parametrów rozdziału kapilarnego uwzględniających typy odczynników wykorzystanych do sekwencjonowania oraz oczyszczania, prowadzono elektroforezę kapilarną. Podczas rozdziału produkty sekwencjonowania migrowały w żelu z szybkością uzależnioną od długości poszczególnych produktów w mieszaninie. W oknie odczytu dochodziło do skanowania sygnału generowanego przez odpowiedni barwnik fluorescencyjny przyłączony do danego produktu sekwencjonowania.

W celu odczytania elektroforegramów wykorzystano program SequenceAnalysis firmy Applied Biosystems v. 5.2. Odczynniki wykorzystane do elektroforezy kapilarnej przedstawia Tabela 13.

Tabela 13. Odczynniki wykorzystane do elektroforezy kapilarnej.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
POP-7 Polymer for 3130	Applied Biosystems	43633785
10x EDTA buffer	Applied Biosystems	402824

3.2.10. Analiza bioinformatyczna

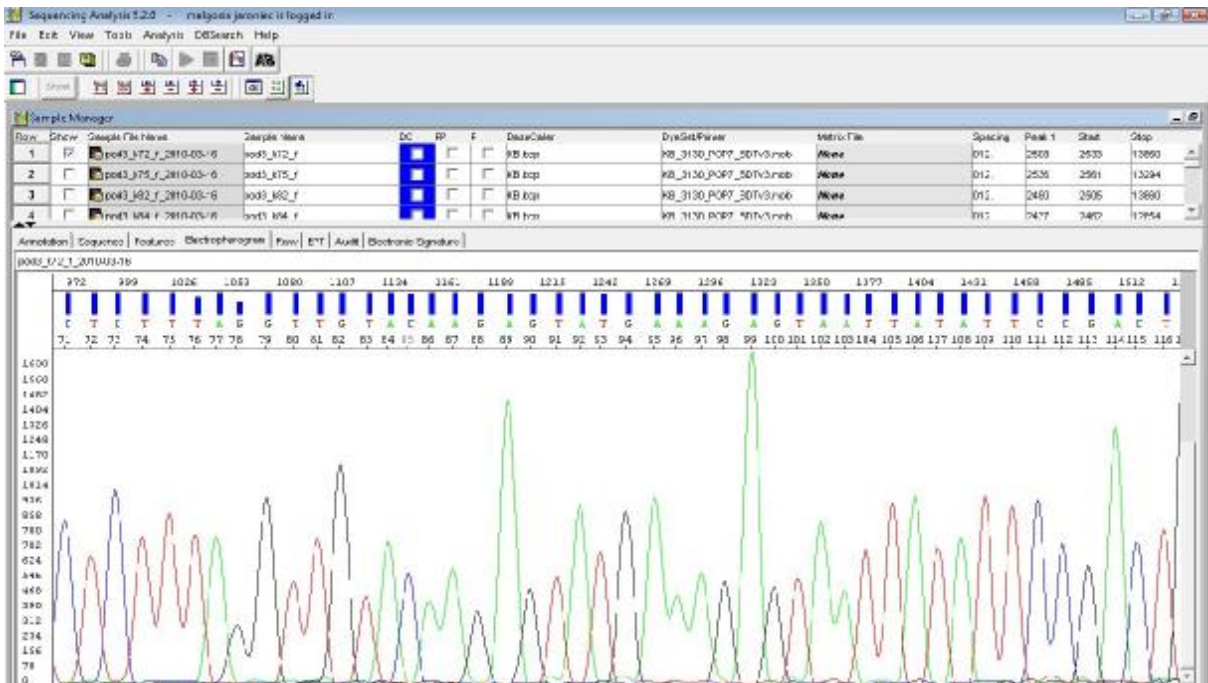
Po przeprowadzeniu elektroforezy kapilarnej analizator genetyczny ABI3130 wygenerował pliki w formacie .fsa, które zawierały odczyty sekwencji DNA. Analizę otrzymanych danych przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania SequenceAnalysis (Applied Biosystems). Program umożliwił zarówno odczytanie sekwencji w formie pliku

tekstowego, jak i weryfikację jakości pików sygnału fluorescencyjnego dzięki elektroforegramom. Przykładowy odczyt sekwencji przedstawia rysunek 7, natomiast przykładowe elektroforegramy przedstawiają rysunki 8 i 9. Rysunek 8 to przykład elektroforegramu dobrej jakości, zaś na rysunku 9 występują pojedyncze piki słabej jakości.

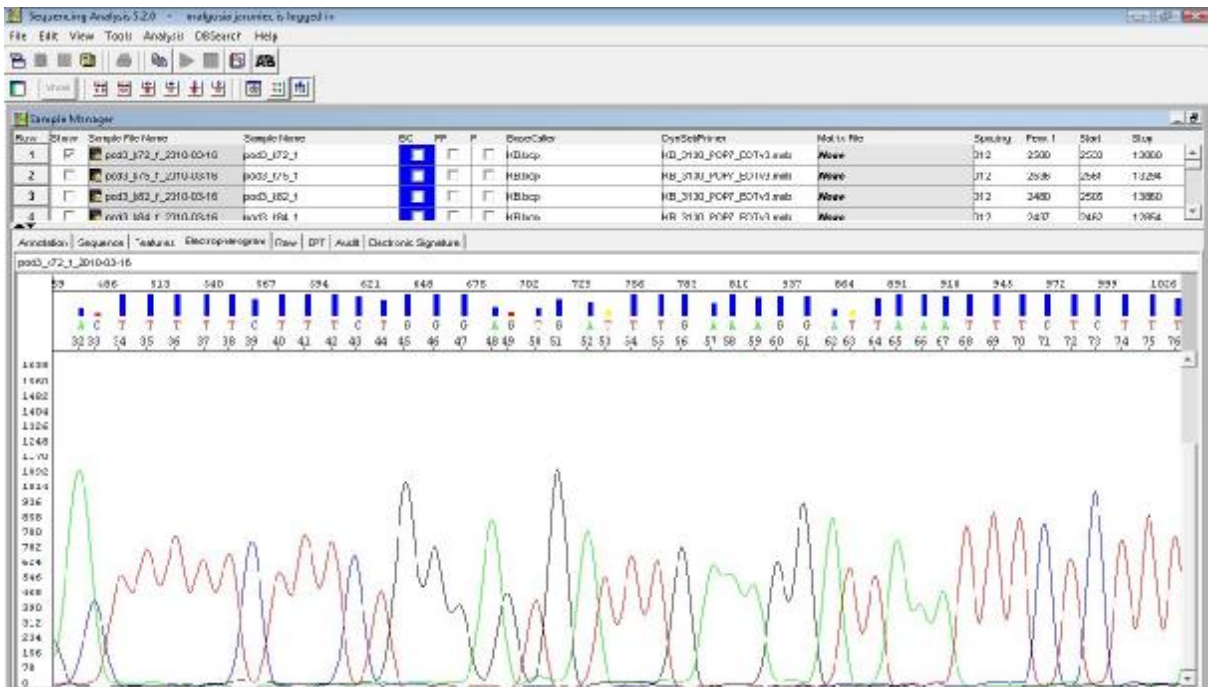
Na Rysunkach 7, 8 i 9 niebieski kolor oraz wysokość słupków przy danym nukleotydzie informuje o dobrej jakości odczytu, kolor żółty świadczy o średniej jakości odczytu piku, zaś kolor czerwony o słabej jakości odczytu piku. Kolory żółty i czerwony mogą wynikać ze słabszego sygnału fluorescencyjnego lub nakładania się kilku sygnałów tej samej długości, co jest charakterystyczne dla układów heterozygotycznych.



Ryc. 1. Przykładowy odczyt sekwencji fragmentu genu podocytyny w postaci pliku tekstowego.



Ryc.2. Przykładowy elektroforegram dobrej jakości fragmentu genu podocyny przedstawiający wysokości pików fluorescencyjnych sekwencji DNA.



Ryc.3. Przykładowy elektroforegram fragmentu genu podocyny przedstawiający wysokości pików fluorescencyjnych sekwencji DNA z pojedynczymi pikami słabszej jakości.

3.2.10.1. Analiza mutacji

Odczytanie sekwencji kodujących fragmenty genów *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1* posłużyło do zbadania obecności mutacji oraz genotypowania znanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. W tym celu sekwencję określonego fragmentu genu dla danego pacjenta zestawiano z sekwencją referencyjną pobraną z ogólnodostępnej bazy danych NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

W przypadku identyfikacji zmiany w sekwencji genu, identyfikowano miejsce mutacji w danym genie, w tym celu wykorzystywano narzędzie CCDS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi>) z bazy danych NCBI dla określonego genu. Zakładka CCDS pozwoliła na powiązanie miejsca mutacji w DNA z pozycją aminokwasową, która ulega zmianie w białku będącym produktem danego genu. Jest o informacja kluczowa, ponieważ istnieje szereg mutacji, które nie powodują zmiany podczas przepisywania nici mRNA na funkcjonalne białko. Takie nieistotne mutacje pozostają zwykle bez wpływu na funkcjonalność białka. W przypadku identyfikacji mutacji, określano czy występuje ona w układzie homo-, czy też heterozygotycznym oraz sprawdzano wpływ na łańcuch polipeptydowy kodowanego białka.

3.2.10.2. Analiza polimorfizmów

W przypadku analizy polimorfizmów SNP, informacje o ich lokalizacji zaczerpnięto z bazy danych dbSNP NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) oraz SNPper (<http://snpper.chip.org>). W miejscu występowania danego SNP, przeszukiwano sekwencję w programie Sequence Analysis v.5.2. W celu skatalogowania genotypów dotyczących polimorfizmów w badanych genach, stworzono pliki w programie Microsoft Excel dla każdego polimorfizmu zlokalizowanego w zakresie sekwencjonowanych rejonów genów, niezależnie od tego, czy dany SNP u badanych osób był zróżnicowany czy też nie.

Analizie poddano wszystkie polimorfizmy zlokalizowane w produktach PCR poddanych sekwencjonowaniu. Dodatkowo, w przypadku genu podocyny, przeprowadzono analizę sześciu polimorfizmów techniką sond typu TaqMan. Otrzymane genotypy posłużyły do obliczenia częstości alleli i genotypów dla pacjentów z NS i osób zdrowych. W tym celu posłużono się programem statystycznym Haploview. Następnie przy pomocy testu dokładnego Fishera sprawdzano, czy różnice częstości alleli między pacjentami i osobami zdrowymi są istotne statystycznie. Ostatnim elementem było obliczenie ilorazu szans (ang. odds ratio, OR), który wyraża powiązanie danego polimorfizmu z wystąpieniem NS. OR istotnie mniejsze od jedności wskazało, iż wariant polimorfizmu może być czynnikiem

chroniącym przed wystąpieniem choroby, zaś OR istotnie większe od jedności może świadczyć o podwyższonym ryzyku zachorowania.

3.2.10.3. Badanie bloków haplotypowych

W związku z brakiem informacji na temat bloków haplotypowych genów *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1*, drugim etapem badania była analiza bloków haplotypowych w oparciu o przebadane polimorfizmy. Badanie obejmowało SNP kodujące oraz niekodujące zlokalizowane w pobliżu granicy intron-ekson. Strukturę genów badano w oparciu o zróżnicowane SNP. Dla każdego genu przeprowadzono trzy niezależne obliczenia: dla grupy badanej, kontrolnej oraz dla obu grup ujętych wspólnie. W celu poznania struktury wybranych genów wykorzystano ogólnodostępny program Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>), który wykorzystuje 3 algorytmy: Gabriel et al. (53), Regułę 4 gamet (Four gamete rule, 4GR) oraz Rdzeń niezrównoważenia sprzężeń (Solid spine of LD, SSLD). W niniejszej pracy posłużono się jednym algorytmem – Gabriel et al., ponieważ jest on uważany za najbardziej wiarygodny i wymagający w odniesieniu do otrzymanych wyników, co zmniejsza ryzyko otrzymania fałszywie pozytywnych relacji między badanymi polimorfizmami SNP. Określenie struktury genów może być wyrażone w postaci kilku wartości matematycznych, w niniejszej pracy posłużono się wartością R^2 , która jest miarą LD informującą o tym, czy analizowane SNP są ze sobą powiązane i czy wspólnie segregują. R^2 określa prawdopodobieństwo wspólnej segregacji danych polimorfizmów. Szacuje się, że wartość ta powinna wynosić około 0.7 (70%).

Po otrzymaniu genotypów wszystkich badanych SNP dla pacjentów NS i osób zdrowych, przygotowano zakodowane pliki w formacie .txt, w których nukleotydami odpowiadały wartości numeryczne. Adeninę zastąpiono cyfrą 1, cytozynę cyfrą 2, guaninę – cyfrą 3, a tyminę – cyfrą 4. Dodatkowo, dla każdego genu, również w formacie .txt, stworzono plik zawierający nazwę badanych polimorfizmów SNP w danym genie oraz ich lokalizację wyrażoną liczbowo. Informacje o lokalizacji każdego SNP zaczerpnięto z bazy danych dbSNP NCBI.

Po wprowadzeniu zakodowanych numerycznie genotypów oraz plików informujących o lokalizacji SNP, z wykorzystaniem programu Haploview obliczano wartości niezrównoważenia sprzężeń. W celu jasnej wizualizacji wyników, w opcjach wybrano przedstawienie wyników w postaci R^2 oraz w skali szarości. Kolor biały na schemacie struktury genu oznaczał brak sprzężenia, zaś czarny – wysoką kosegregację pary SNP. Liczby na diagramach oznaczały wartości R^2 dla par SNP, które zbiegają się w danym kwadracie. W

opcji analizy wybrano algorytm Gabriel et al, który spośród trzech możliwych do wyboru, był najbardziej wiarygodnym oraz najbardziej wymagającym. Pozostałe dwa algorytmy, 4 Gamete Rule oraz Solid Spine of LD, często generują fałszywie pozytywne wyniki i obecność bloków haplotypowych w przypadkach, gdy nie dochodzi do wspólnej segregacji polimorfizmów SNP.

3.2.11. Real-time PCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan

W przypadku genu podocyny analiza polimorfizmów SNP przebiegła w dwóch niezależnych badaniach. Oprócz sekwencjonowania wykonano genotypowanie z wykorzystaniem sond typu TaqMan, które przeprowadzono na grupie 33 pacjentów NS oraz 91 osób zdrowych bez objawów NS.

Oprócz sekwencjonowania, wykorzystano alternatywną technikę analizy polimorfizmów SNP opierającą się na reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. real time PCR). Metoda pozwoliła szybko przeanalizować wybrane polimorfizmy SNP w genie *NPHS2* i została wykorzystana jako wstępny etap badań poprzedzający sekwencjonowanie. Real-time PCR to technika szybka i relatywnie tania, i choć ilość otrzymanych danych jest ograniczona, wyniki pozwoliły na test skringowy pacjentów z NS. Etap ten miał na celu selekcję pacjentów, którzy w kolejnym etapie zostali poddani sekwencjonowaniu DNA.

Technika molekularna wykorzystująca sondy typu TaqMan polega na wykorzystaniu zmodyfikowanych oligonukleotydów komplementarnych do interesującej sekwencji, czyli sond zaopatrzonych w dwa znaczniki: barwnik fluorescencyjny o znanej długości światła wzbudzającego i emitowanego oraz wygaszacz, którego fizyczna bliskość, blokuje zdolności fluorescencyjne barwnika. W przypadku przyłączenia danej sondy komplementarnej do badanej sekwencji, znajdująca się w mieszaninie reakcyjnej polimeraza wydłużała powstający produkt, odcinając napotkany wygaszacz. Barwnik fluorescencyjny był wówczas aktywny i emitował światło odpowiedniej długości, które było rejestrowane jest przez termocykler zaopatrzony w detektor. W celu analizy wybranych polimorfizmów SNP w genie *NPHS2* do mieszaniny reakcyjnej dodawane były: matryca w postaci genomowego DNA, odczynnik Pre-designed SNP Genotyping Assay zawierający: startery specyficzne amplifikowanej sekwencji i dwie sondy TaqMan komplementarne do wariantów polimorfizmu, ale wyznakowane różnymi barwnikami oraz uniwersalny TaqMan Genotyping MasterMix zawierający: polimerazę, dNTP oraz odpowiednie sole. Odczynniki wykorzystane do analizy SNP poprzez sondy typu TaqMan przedstawia Tabela 14. Reakcje real-time PCR prowadzone były w

objętości 5 µl na płytkach 384-dółkowych na urządzeniu 7900HT Fast Real-Time PCR firmy Applied Biosystems. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 15. Wszystkie przeanalizowane tą metodą SNP zostały zbadane z wykorzystaniem uniwersalnego programu amplifikacyjnego, którego parametry przedstawia Tabela 16.

W wyniku reakcji real-time PCR w pojedynczym etapie możliwe było określenie, czy badany osobnik jest homozygotą czy też heterozygotą w odniesieniu do wybranego polimorfizmu. Technika sond typu TaqMan została wykorzystana do zbadania, czy u pacjentów z zespołem nerczycowym polimorfizmy zlokalizowane blisko znanych mutacji w genie *NPFS2* występują w wariantach zmienionych.

Tabela 14. Odczynniki wykorzystane do reakcji real-time PCR z sondami typu TaqMan.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Pre-designed SNP Genotyping Assay Stock 20x	Applied Biosystems	4351379
TaqMan Genotyping Master Mix	Applied Biosystems	4371355
Woda wolna od nukleaz (Nuclease-free water, not DEPC-treated)	Ambion, Applied Biosystems	AM9930

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej real-time PCR z sondami typu TaqMan

Odczynnik	Dodawana objętość
Pre-designed SNP Genotyping Assay Stock 20x (sondy TaqMan + startery)	0,25 µl
TaqMan Genotyping Master Mix	2,5 µl
Nuclease-free water, not DEPC-treated	0,25 µl
Genomowy DNA	2 µl
Całkowita objętość reakcji PCR	5 µl

Tabela 16. Parametry programu amplifikacyjnego reakcji real time PCR z sondami TaqMan.

Etap reakcji sekwencjonowania	Wstępna denaturacja	Denaturacja	Annealing / Elongacja	Liczba cykli
Temp. / czas	95°C / 10 min	92°C / 15 sek	60°C / 1 min	40

4. Wyniki

4.1. Uzyskanie materiału do badań genetycznych i opracowanie bazy danych.

Od pacjentów z NS oraz osób zdrowych otrzymano ilości DNA mieszczące się w granicach od 4,8 ng/ μ l do 76,3 ng/ μ l, co stanowiło wystarczającą ilość do przeprowadzenia badań genetycznych. Pomiar stosunku absorbancji fal o długości 260/280 nm wykazały, że 30 próbek nie mieściło się w przedziale 1,8-2,0, co oznacza obecność zanieczyszczeń w postaci białek lub soli, zaś 94 próbki wykazywały pomiar w granicach 1,8-2,0, co świadczy o dobrej jakości materiału do badań.

Wyniki pomiaru stężenia DNA oraz wartości stosunku absorbancji 260/280 nm pacjentów z NS przedstawia tabela 17. Analogiczne informacje o grupie kontrolnej przedstawia Tabela 18.

Tabela 17. Informacje dotyczące stężenia oraz czystości izolatów DNA pacjentów z NS.

Lp.	Kod pacjenta	Stężenie DNA [ng/μl]	Absorbancja 260/280 nm
1	K72	19,5	1,86
2	K75	4,8	2,07
3	K77	8	1,9
4	K81	64,2	1,9
5	K82	31,2	1,87
6	K83	27,1	1,80
7	K84	67,4	1,87
8	K85	57	1,92
9	K89	61,7	1,80
10	K94	26,3	2
11	K96	42,6	1,78
12	K98	23,6	1,74
13	K100	26,2	1,92
14	K102	28,5	1,81
15	K103	38,6	1,78
16	K104	24,5	1,91
17	K106	25,2	1,85
18	K107	15,3	2,06
19	K108	17,7	1,93
20	K110	34,2	1,53
21	K111	14,8	1,95
22	K115	28,8	1,84
23	K119	10,6	2,07
24	K122	68,5	1,82
25	K123	47,7	1,85
26	K126	67	1,83
27	K128	21,6	2,03
28	K131	13,1	1,89
29	K132	76,3	1,81
30	K134	29	1,8
31	K139	13,3	1,7
32	K147	29,3	1,96
33	K162	38,5	1,81

Tabela 18. Informacje dotyczące stężenia oraz czystości izolatów DNA grupy kontrolnej.

Lp.	Kod osoby z grupy kontrolnej	Stężenie DNA [ng/μl]	Absorbancja 260/280 nm
1	C1	29	1,6
2	C2	26,9	1,65
3	C3	23,5	1,89
4	C4	34,8	1,8
5	C5	23,6	1,84
6	C6	17,7	1,91
7	C7	47,7	1,86
8	C8	16,5	1,87
9	C9	26,2	1,95
10	C10	20,4	1,74
11	C11	26,8	1,72
12	C12	19,7	1,68
13	C13	19,7	1,68
14	C14	27,6	1,87
15	C15	35,4	1,83
16	C16	36,2	1,85
17	C17	23	1,86
18	C18	27,9	1,82
19	C19	28,7	1,85
20	C20	38,2	1,96
21	C21	39,6	1,84
22	C22	31,6	1,98
23	C23	12,7	2
24	C24	23,2	1,93
25	C25	48,6	1,87
26	C26	32	1,98
27	C27	26,9	1,98
28	C28	39,7	1,87
29	C29	28,4	1,94
30	C30	23,2	1,95
31	C31	16	1,94
32	C32	30,1	1,81
33	C33	25,4	1,84
34	C34	19,8	2

Lp.	Kod osoby z grupy kontrolnej	Stężenie DNA [ng/μl]	Absorbancja 260/280 nm
35	C35	38,1	1,86
36	C36	23,4	1,99
37	C37	24,7	1,82
38	C38	28,4	1,91
39	C39	18,4	1,77
40	C40	25,9	2,06
41	C41	14,3	1,74
42	C42	15	2,06
43	C43	19,1	1,97
44	C44	22,5	1,97
45	C45	16,1	1,82
46	C46	18,3	2,03
47	C47	17,9	2,05
48	C48	26,3	1,88
49	C49	27,5	1,68
50	C50	15	1,69
51	C51	20,7	1,46
52	C52	29,5	1,92
53	C53	60,1	1,84
54	C54	24,4	1,88
55	C55	35,4	2,11
56	C56	39,5	1,96
57	C57	21	1,61
58	C58	34,2	1,68
59	C59	41,9	1,81
60	C60	24,5	1,82
61	C61	28,4	1,75
62	C62	57,6	1,80
63	C63	33,8	1,8
64	C64	23,6	1,69
65	C65	29,6	1,80
66	C66	32,6	1,81
67	C67	45,2	1,80
68	C68	38,5	1,83
69	C69	32,9	1,84
70	C70	27,6	1,80

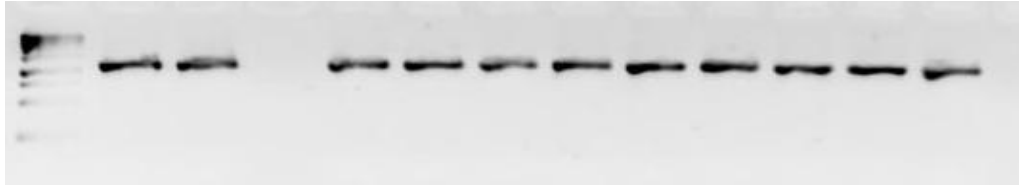
Lp.	Kod osoby z grupy kontrolnej	Stężenie DNA [ng/μl]	Absorbancja 260/280 nm
71	C71	26,5	1,83
72	C72	35,6	1,87
73	C73	32,8	1,9
74	C74	43,5	1,88
75	C75	31,6	1,96
76	C76	26,8	1,91
77	C77	22,9	1,97
78	C78	24	1,92
79	C79	36,6	1,96
80	C80	30,8	1,93
81	C81	25,9	1,73
82	C82	26,7	1,83
83	C83	25,9	1,73
84	C84	32,8	1,94
85	C85	32,4	1,88
86	C86	28,1	1,81
87	C87	27,8	1,8
88	C88	31,8	1,88
89	C89	34,6	1,94
90	C90	30,9	1,91
91	C91	28,9	1,81

4.2. Otrzymanie fragmentów kodujących genów *NPHS1*, *NPHS2* i *WT1* do analiz genetycznych

Elektroforetycznie rozdzielono wszystkie otrzymane produkty PCR dla pacjentów z NS oraz osób zdrowych. Prążek na żelu przedstawia produkt PCR odpowiedniej długości.

Wynik rozdziału elektroforetycznego fragmentu 6 genu nefryny osób zdrowych: C75 i C76 oraz pacjentów z NS: K77, K94, K100, K103, K115, K119, K123, K132, K128 przedstawia Rycina 4.

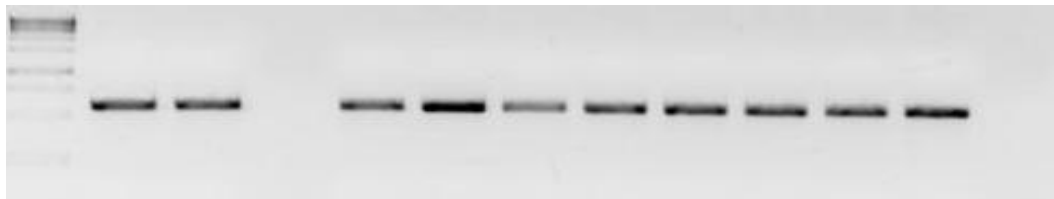
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(100bp)	C75	C76	K77	K94	K100	K103	K115	K119	K123	K132	K128	neg



Ryc. 4. Rozdział produktów PCR (fragment Nef 6, 1181 p.z.). Neg – kontrola negatywna, M – marker długości 100bp, pozostałe próby to osoby zdrowe oraz pacjenci z NS.

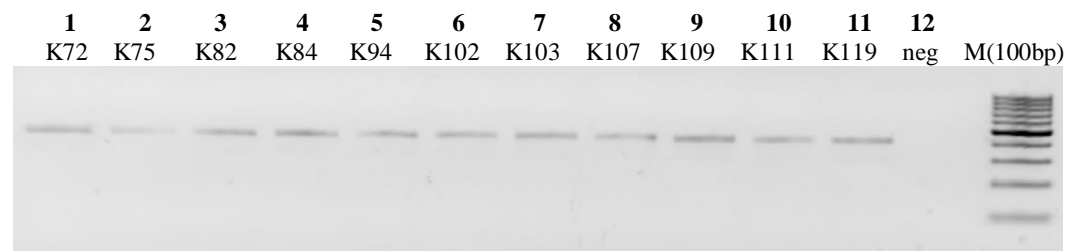
Rycina 5 przedstawia amplikony fragmentu 8 genu nefryny osób zdrowych C75 i C76 oraz pacjentów z NS: K77, K94, K100, K103, K115, K119, K123, K132.

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(100bp)	C75	C76	K77	K94	K100	K103	K115	K119	K123	K132	neg



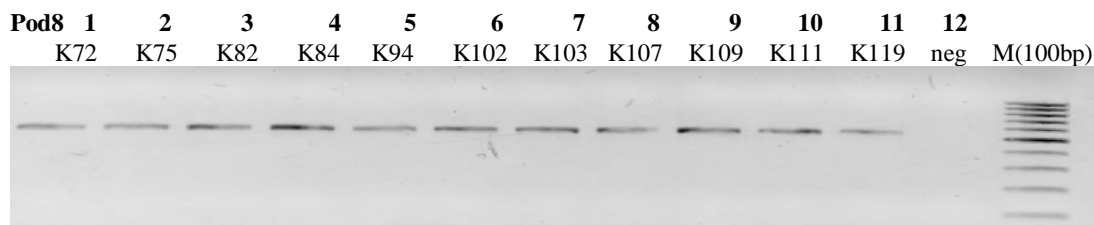
Ryc. 5. Rozdział produktów PCR (fragment Nef 8, 579 p.z.). Neg – kontrola negatywna, M – marker długości 100bp, pozostałe próby to osoby zdrowe oraz pacjenci z NS.

Wynik rozdziłu elektroforetycznego fragmentu 3 genu podocyny pacjentów z NS: K72, K75, K82, K84, K94, K102, K103, K107, K109, K111, K119 przedstawia Rycina 6.



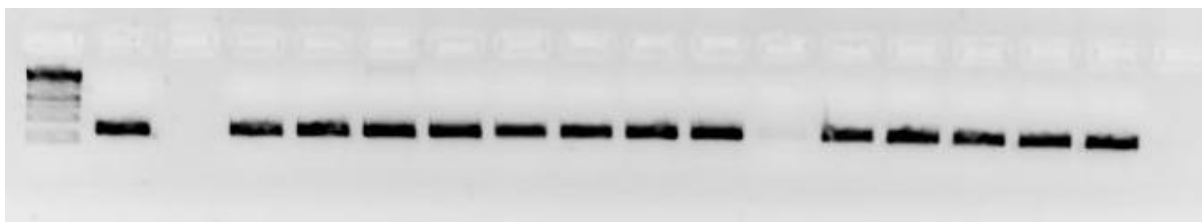
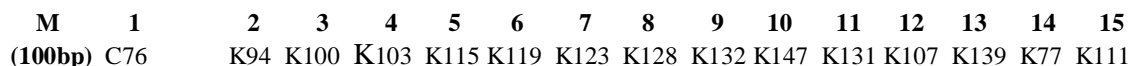
Ryc. 6. Rozdział produktów PCR (fragment Pod3, 412 p.z.). Neg – kontrola negatywna, M – marker długości 100bp, pozostałe próby to pacjenci z NS.

Rycina 7 przedstawia amplikony fragmentu 8 genu podocyny pacjentów z NS: K72, K75, K82, K84, K94, K102, K103, K107, K109, K111, K119.



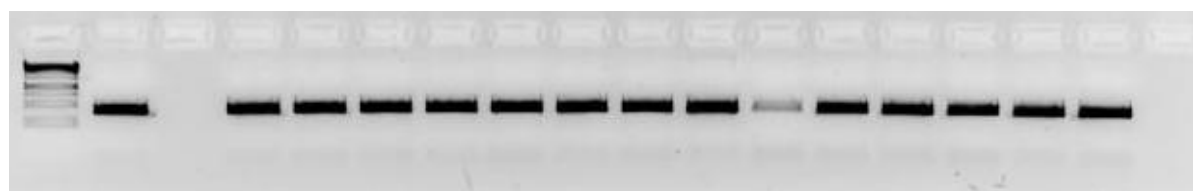
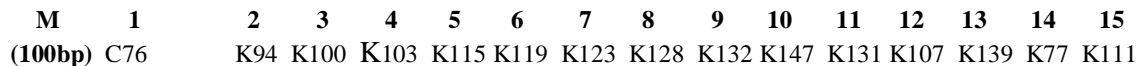
Ryc. 7. Rozdział produktów PCR (fragment Pod8, 544 p.z.). Neg – kontrola negatywna, M – marker długości 100bp, pozostałe próby to pacjenci z NS.

Wynik rozdziału elektroforetycznego fragmentu 5 genu WT1 osoby zdrowej C76 oraz pacjentów z NS: K94, K100, K103, K115, K119, K123, K128, K132, K147, K131, K107, K139, K77, K111 przedstawia Rycina 8.



Ryc. 8. Rozdział produktów PCR (fragment WT1_5, 353 p.z.), M – marker długości 100bp, pozostałe próby to osoba zdrowa oraz pacjenci z NS.

Rycina 9 przedstawia amplikony fragmentu 9 genu WT1 osoby zdrowej C76 oraz pacjentów z NS: K94, K100, K103, K115, K119, K123, K128, K132, K147, K131, K107, K139, K77, K111.



Ryc. 9. Rozdział produktów PCR (fragment WT1_9, 416 p.z.), M – marker długości 100bp, pozostałe próby to osoba zdrowa oraz pacjenci z NS.

4.3.1. Analiza zależności genotypowo-fenotypowych

W wyniku analizy sekwencji trzech genów zbadano podłoże genetyczne u 33 pacjentów z NS, spośród których u dwóch NS wykryto w trzecim miesiącu życia, a u jednego w piątym miesiącu życia. Między pierwszym, a trzecim rokiem życia pierwszy rzut wystąpił u osiemnastu pacjentów, natomiast między czwartym, a dziesiątym rokiem życia u pięciu pacjentów. Najpóźniej, między jedenastym a piętnastym rokiem życia, NS wykryto u siedmiu pacjentów. Biopsję wykonano u 21 pacjentów: u 4 wykryto FSGS, u 5 zmiany minimalne (ang. minimal change disease, MCD), zaś niedojrzałość kłębuszków (N) u 4. Zmiany w postaci mezangialnej proliferacji (MP) dotyczyły 11 pacjentów, natomiast błoniasto-rozplamowe zapalenie nerek (MPGN) jednego. U 12 pacjentów biopsja nie została wykonana. W badanej grupie zastosowano zróżnicowane leczenie, w terapii wykorzystano glikokortykosteroidy (GK), cyklosporynę A (CsA), cyklofosfamid (CF), mykofenolan mofetilu (MMF) oraz Rituksimab (Rtx). Całkowitą remisję (ang. total remission, TR) odnotowano u 15 pacjentów, częściową (ang. partial remission, PR) u 13 pacjentów, zaś brak remisji (ang. no remission, NR) u 2 pacjentów. Dwóch pacjentów jest poddawanych dializoterapii, natomiast jeden pacjent zmarł w wyniku nawrotu. Przeprowadzona ankieta wykluczyła dodatkowe schorzenia u 25 pacjentów z NS, natomiast u 8 występowały towarzyszące choroby takie jak alergia, reumatoidalne zapalenie stawów (ang. rheumatoid arthritis, RA), astma, brodawczak, naczyniak, łuszczyca oraz choroby serca.

Podłoże molekularne w postaci mutacji w przebadanych genach zidentyfikowano u 17 pacjentów z NS; 9 posiadało mutacje w genie *NPHS1*, 1 pacjent posiadał mutacje w genie *NPHS1* i *NPHS2*, zaś 1 w genach *NPHS1* i *WT1*. Mutacje w genie *NPHS2* wykryto u 6 pacjentów, a wyłącznie w *WT1* u jednego. Wśród 17 pacjentów posiadających mutacje w którymkolwiek ze zbadanych genów, 15 nie odpowiadało na leczenie GK; jeden miał pierwszy rzut NS, a jeden trzeci rzut NS. W tej grupie u 3 pacjentów zaobserwowano całkowitą remisję, u 9 częściową remisję, natomiast u 2 pacjentów brak remisji. Dwojka dzieci jest obecnie dializowana, a jeden pacjent zmarł w wyniku powikłań. U pacjentów posiadających podłoże molekularne NS pierwszy rzut wystąpił w różnym wieku; u 4 dzieci w pierwszym roku życia, u 6 w drugim roku życia, u 3 w trzecim roku życia. U pozostałych 4 pacjentów będących nosicielami mutacje choroba ujawniła się odpowiednio w wieku: pięciu, jedenastu, trzynastu i piętnastu lat. U pozostałych 16 pacjentów nie wykryto mutacji w żadnym z trzech sekwencjonowanych genów. Szczegółowe informacje dotyczące przebiegu klinicznego choroby oraz podłoża molekularnego NS przedstawia Tabela 19.

Tabela 19. Przebieg kliniczny choroby u pacjentów z NS

LP.	Kod pacjenta	Wiek rozpoznania (lata/mies)	Rozpoznanie	Biopsja	Leczenie immunosupresyjne	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Współistniejące schorzenia	Podłoże molekularne NS	Status mutacji	Spodziewany efekt w białku
1	K77	2/0	SRNS	N, MP	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	TR	6	-	NPHS1 (Ex1+2T>A)	heterozygota	brak
2	K100	2/0	SRNS	niewykonano	GK, CF, CsA	PR	15	-	NPHS1 (Ser 421 Asn, G>A)	heterozygota	4' domena Ig
									NPHS1 (Arg 1008 Lys, G>A)	heterozygota	domena FN3
3	K103	0/3	SRNS	FSGS	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	PR	19	naczyniak (wątroba)	NPHS1 (Ile 183 Leu, A>C)	heterozygota	2' domena Ig
									NPHS1 (Asp 310 Asn, insA)	homozygota	3' domena Ig, zmiana ładunku
4	K115	2/0	SRNS	MP	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	PR	18	brodawczak	NPHS1 (Ala 423 Pro, G>C)	heterozygota	4' domena Ig
5	K123	2/0	SRNS	FSGS	GK, CF, CsA	TR	19	-	NPHS1 (Val 655 Met, G>A)	heterozygota	6' domena Ig
6	K132	0/3	SRNS	niewykonano	GK, CsA	DIALIZY	0.5	-	NPHS1 (Thr 42 Arg, C>G)	heterozygota	1' domena Ig, zmiana ładunku
									NPHS1 (Ser 1157 Phe, C>T)	heterozygota	ogon cytozolowy, zmiana polarność
7	K147	2/6	SRNS	niewykonano	GK, CsA	PR	2	-	NPHS1 (Gly 270 Asp, G>A)	heterozygota	3' domena Ig, zmiana ładunku, polarność
									NPHS1 (Ala 658 Ser, G>T)	heterozygota	6' domena Ig, zmiana polarność
									NPHS1 (Arg 1008 Lys, G>A)	heterozygota	domena FN3
8	K131	2/0	III NS	niewykonano	GK, CF	TR	4	-	NPHS1 (Ser 1157 Phe, C>T)	heterozygota	ogon cytozolowy, zmiana polarność
9	K139	2/6	SRNS	niewykonano	GK, CF	PR	3	-	NPHS1 (Thr 761 Ser, A>T)	heterozygota	7' domena Ig
									NPHS1 (Arg 1008 Lys, G>A)	heterozygota	domena FN3
									NPHS1 (Arg 1088 Gln, G>A)	heterozygota	domena transbłonowa
10	K119	1/0	SRNS	FSGS	GK, CsA	ZGON	2	-	NPHS1 (Thr 18 Ser, A>T)	heterozygota	zmiana w części niefunkcjonalnej
									NPHS1 (Ex1+2T>A)	heterozygota	brak
									NPHS2 (Arg 229 Gln, G>A)	heterozygota	zmiana ładunku

Tabela 19. Przebieg kliniczny choroby u pacjentów z NS

LP.	Kod pacjenta	Wiek rozpoznania NS	Rozpoznanie	Biopsja	Leczenie immunosupresyjne	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Współistniejące schorzenia	Podłoże molekularne NS	Status mutacji	Spodziewany efekt w białku
11	K128	2/6	SRNS	niewykonano	GK, CF	PR	3	astma, alergia	NPHS1 (Pro 227 Arg, C>G)	heterozygota	2' domena Ig, zmiana ładunku, polarności
									WT1 (Pro 257 Pro, A>T)	heterozygota	brak
12	K102	15	SRNS	MP	GK, CsA, MMF	NR	17	-	NPHS2 (Val 290 Met, G>A)	heterozygota	domena stomatynowa
13	K107	2/0	INS	niewykonano	GK	PR	2	alergia	NPHS2 (Pro 150 Pro, T>A)	heterozygota	domena stomatynowa
									NPHS2 (Leu 139 Gln, T>A)	heterozygota	domena stomatynowa
14	K108	13	SRNS	MP	GK, CsA, MMF	PR	15	łuszczyca	NPHS2 (A>G, Intron 7)	heterozygota	brak
15	K126	11	SRNS	MP	GK, CsA, Rtx	NR	11	-	NPHS2 (A>G, Intron 7)	heterozygota	brak
16	K134	5	SRNS	MP	GK, CF, CsA, MMF	DIALIZY	16	-	NPHS2 (A>G, Intron 7)	heterozygota	brak
17	K72	0/5	SRNS	MP, GS	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	PR	9	-	WT1 (Val 303 Ile, G>A)	heterozygota	nieznana
18	K75	6	SRNS	MP	GK, CsA, MMF, Rtx	TR	11	-	-		
19	K81	3/0	INS	N, MP	GK, CF	TR	8	-	-		
20	K82	9	SRNS	MCD	GK, CsA, MMF, Rtx	PR	9	-	-		
21	K83	3/0	INS	niewykonano	GK	TR	3	-	-		
22	K84	15	SRNS	MPGM	GK, CsA, MMF, Rtx	PR	18	-	-		
23	K85	3/0	INS	MP	GK	TR	6	-	-		
24	K89	12	SRNS	MCD	Gk, CsA, Rtx	PR	12	-	-		
25	K94	3/0	SRNS	MCD, N	GK, CF, CsA, MMF	TR	11	-	-		
26	K96	3/0	VNS	niewykonano	GK	TR	9	-	-		
27	K98	7	SRNS	MP	GK, CF, CsA, MMF	PR	17	WZW (B)	-		
28	K104	15	INS	FSGS	GK, MMF	TR	16	RA	-		
29	K106	15	INS	niewykonano	GK	TR	16	choroba serca	-		
30	K110	3/0	SRNS	MCD, N	GK, CF	TR	11	-	-		
31	K111	3/0	INS	niewykonano	GK, CsA	TR	2	-	-		
32	K122	6	INS	niewykonano	GK	TR	7	-	-		
33	K162	2/0	SRNS	MCD	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	TR	3.5	-	-		

4.3.1.1. Analiza mutacji punktowych w genie *NPHS1*

Pierwszym genem poddanym analizie mutacji był gen kodujący nefrynę, *NPHS1*. Gen nefryny zbudowany jest z 28 eksonów, jednak ze względu na ich mały rozmiar oraz fizyczną bliskość, możliwe było ich objęcie w 10 amplikonach. Produkty reakcji PCR pozwoliły na poznanie sekwencji więcej niż jednego eksonu. Informacje o lokalizacji eksonów w produktach PCR zawiera Tabela 20. Większość amplikonów pozwoliła na zbadanie 3 eksonów, natomiast ostatni amplikon (Nef10) obejmował aż 5 ostatnich eksonów.

Tabela 20. Lokalizacja poszczególnych eksonów genu nefryny w produktach PCR.

Produkt PCR	Nef1	Nef2	Nef3	Nef4	Nef5	Nef6	Nef7	Nef8	Nef9	Nef10
Ekson	1,2,3,4	5	6,7,8	9,10,11	12,13,14	15,16,17	18,19,20	21,22	23	24,25,26,27,28

W wyniku przeprowadzonych analiz, w rejonach kodujących genu nefryny u pacjentów z NS zidentyfikowano łącznie 15 mutacji, w tym 1 na granicy intron-ekson, 1 mutację niekodującą i 13 mutacji kodujących. Wszystkie mutacje wykryto u pacjentów z SRNS. Czternaście mutacji miało charakter substytucji, a jedna insercji pojedynczego nukleotydu (adeniny). Żadna ze zidentyfikowanych mutacji nie została wykryta w grupie kontrolnej. Po dwie zmiany zidentyfikowano w eksonie 1, eksonie 10 i eksonie 15. Trzy mutacje wystąpiły u więcej niż jednego pacjenta z SRNS: mutacja niekodująca w intronie 1 zlokalizowana była u 2 pacjentów z SRNS, mutacja Arg 1008 Lys w eksonie 22 zidentyfikowana została u 3 pacjentów z SRNS i mutacja Ser 1157 Phe zlokalizowana w eksonie 27 została zidentyfikowana u 2 pacjentów z SRNS. Pozostałe 12 mutacji punktowych zostało zidentyfikowanych w pojedynczej próbce DNA. W sumie mutacje w genie nefryny posiadało 11 pacjentów, w tym dwoje dzieci miało także mutację odpowiednio w genie podocyny oraz *WT1*. Zmiany w genie nefryny posiadało zatem 79% pacjentów, u których zbadano sekwencję *NPHS1*. Szczegółowe zestawienie mutacji przedstawia Tabela 21.

Tabela 21. Informacje dotyczące mutacji zidentyfikowanych w genie *NPHS1* u pacjentów z zespołem nerczycowym.

Lp.	Nazwa	Lokalizacja	Typ zmiany	Zmiana nukleotydowa	Status mutacji	Liczba pacjentów z mutacją
1	Thr 18 Ser	Ekson 1	Kodująca	C / G (ACT / AGT)	Heterozygota	1
2	c.58+2T>A	Intron 1	Niekodująca	T / A	Heterozygota	2
3	Thr 42 Arg	Ekson 2	Kodująca	C / G (ACG / AGG)	Heterozygota	1
4	Ile 183 Leu	Ekson 5	Kodująca	A / C (ATC / CTC)	Heterozygota	1
5	Pro 227 Arg	Ekson 6	Kodująca	C / G (CCC / CGC)	Heterozygota	1
6	Gly 270 Asp	Ekson 7	Kodująca	G / A (GGC / GAC)	Heterozygota	1
7	g.7846_7847insA	Ekson7/Intron8	Kodująca	Insercja A	Heterozygota	1
8	Asp 310 Asn	Ekson 8	Kodująca	G / A (GAC / AAC)	Homozygota	1
9	Ser 421 Asn	Ekson 10	Kodująca	G / A (AGT / AAT)	Heterozygota	1
10	Ala 423 Pro	Ekson 10	Kodująca	G / C (GCC / CCC)	Heterozygota	1
11	Val 655 Met	Ekson 15	Kodująca	G / A (GTG / ATG)	Heterozygota	1
12	Ala 658 Ser	Ekson 15	Kodująca	G / T (GCG / TCT)	Heterozygota	1
13	Thr 761 Ser	Ekson 17	Kodująca	A / T (ACT / TCT)	Heterozygota	1
14	Arg 1008 Lys	Ekson 22	Kodująca	G / A (AGA / AAA)	Heterozygota	3
15	Arg 1088 Gln	Ekson 24	Kodująca	G / A (CGG / CAG)	Heterozygota	1
16	Ser 1157 Phe	Ekson 27	Kodująca	C / T (TCT / TTT)	Heterozygota	1

4.3.1.2. Analiza mutacji punktowych w genie *NPHS2*

Drugim genem poddanym analizie mutacji był gen kodujący podocynę, *NPHS2*. Gen podocyny zbudowany jest z 8 eksonów, z których każdy namnożono w osobnej reakcji PCR. Ze względu na dużą fizyczną odległość eksonów nie była możliwa amplifikacja kilku fragmentów kodujących w pojedynczym amplikonie.

W wyniku przeprowadzonych analiz w rejonach kodujących genu podocyny u pacjentów chorujących na NS zidentyfikowano łącznie 5 mutacji: 4 kodujące oraz 1 niekodującą. Wszystkie wykryte mutacje zidentyfikowano u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na leczenie glikokortykosteroidami (SRNS). Dwie mutacje w eksonie 3 zostały wykryte u tego samego pacjenta (K107). W eksonie 3 wykryto 2 mutacje, pozostałe zlokalizowane były w eksonie 5 i intronie 7. Mutację kodującą w eksonie 5 zidentyfikowano u pojedynczego pacjenta, a niekodującą w intronie 7 zidentyfikowano u 3 pacjentów z SRNS. Mutacja niekodująca w intronie 1 została zidentyfikowana u 2 pacjentów z zespołem nerczycowym oraz u 1 pacjenta z grupy kontrolnej. Pozostałe mutacje nie zostały zidentyfikowane w grupie kontrolnej. W sumie w genie podocyny mutacje zidentyfikowano u sześciu pacjentów, spośród których jeden posiadał dodatkowo dwie mutacje w genie nefryny. Podłoże molekularne w przypadku genu *NPHS2*

wykryto zatem u 27% pacjentów poddanych analizie genetycznej podocyny. Szczegółowy opis mutacji przedstawia Tabela 22.

Tabela 22. Informacje dotyczące mutacji zidentyfikowanych w genie *NPHS2* u pacjentów w zespole nerczycowym.

Lp.	Nazwa	Lokalizacja	Typ zmiany	Zmiana nukleotydowa	Charakter zmiany	Liczba pacjentów z mutacją
1	Pro 150 Pro	Ekson 3	Kodująca	T / A (CCT / CCA)	Heterozygota	1
2	Leu 139 Gln	Ekson 3	Kodująca	T / A (CTG ./ CAG)	Heterozygota	1
3	Arg 229 Gln	Ekson 5	Kodująca	G / A (CGA / CAA)	Heterozygota	1
4	Val 290 Met	Ekson 7	Kodująca	G / A (GTG / ATG)	Heterozygota	1
5	c.217C>T	Intron 7	Niekodująca	A / G	Heterozygota	3

4.3.1.3. Analiza mutacji punktowych w genie *WT1*

Trzecim genem poddanym analizie mutacji był gen kodujący białko guza Wilmsa 1, *WT1*. Gen *WT1* zbudowany jest z 10 eksonów, które namnożono w dziewięciu reakcjach PCR. Fragment drugi (*WT1_2*) umożliwił poznanie sekwencji dwóch eksonów, drugiego i trzeciego, dzięki ich fizycznej bliskości. Pozostałe eskony amplifikowano w osobnych reakcjach PCR. Analizie poddano cały fragment kodujący, w przeciwieństwie do większości opublikowanych prac, w których badano jedynie ekson 8 i 9 (116).

W wyniku przeprowadzonych analiz, w rejonach kodujących genu *WT1* u pacjentów chorujących na NS zidentyfikowano dwie kodujące mutacje zlokalizowane w eksonie 1 i 2. Każdą wykryto u pojedynczego pacjenta z SRNS, zatem mutacje w genie *WT1* dotyczyły 14% przebadanych dzieci. Szczegóły dotyczące znalezionych mutacji przedstawia Tabela 23. Znalezione mutacje nie zostały wykryte u żadnego pacjenta z grupy kontrolnej.

Tabela 23. Informacje dotyczące mutacji zidentyfikowanych w genie *WT1* u pacjentów w zespole nerczycowym.

Lp.	Nazwa	Lokalizacja	Typ zmiany	Zmiana nukleotydowa	Charakter zmiany	Liczba pacjentów z mutacją
1	Pro 257 Pro	Ekson 1	Kodująca	A / T (CCA / CCT)	Heterozygota	1
2	Val 303 Ile	Ekson 2	Kodująca	G / A (GTT / ATT)	Heterozygota	1

4.3.2. Analiza polimorfizmów SNP

Drugim etapem badań była analiza polimorfizmów SNP w obrębie genów *NPHS1*, *NPHS2* oraz *WT1*.

4.3.2.1. Analiza polimorfizmów SNP w genie *NPHS1*

Uzyskane sekwencje pozwoliły na wykrycie 26 polimorfizmów SNP: 15 zlokalizowanych w eksonach oraz 11 zlokalizowanych w intronach. Najwięcej polimorfizmów występowało w eksonie 10 (4 SNP). Z kolei amplikon Nef10 zawierał najwięcej SNP (7), zaś fragmenty Nef1 i Nef4 pozwoliły wykryć po 5 SNP. Szczegółowe informacje o wariantach nukleotydowych oraz ich lokalizacji przedstawia Tabela 24.

Tabela 24. Polimorfizmy SNP w genie nefryny wykryte w wyniku sekwencjonowania.

Lp.	Nazwa SNP	Warianty nukleotydowe	Lokalizacja w genie	Lokalizacja w produkcie PCR
1	rs2285450	C / T	Ekson 3	Nef1
2	rs3814995	G / A	Ekson 3	Nef1
3	rs412175	A / G	Intron 3	Nef 1
4	rs8113675	T / C	Intron 3	Nef 1
5	rs396178	G / A	Intron 3	Nef 1
6	rs34673364	G / C	Ekson 6	Nef 3
7	rs35238405	A / G	Ekson 6	Nef 3
8	rs34982899	C / T	Ekson 7	Nef 3
9	rs417786	C / T	Intron 9	Nef 4
10	rs34320609	T / C	Ekson 10	Nef 4
11	rs33950747	A / G	Ekson 10	Nef 4
12	rs392702	C / T	Ekson 10	Nef 4
13	rs28939695	G / A	Ekson 10	Nef 4
14	rs34761059	C / T	Ekson 14	Nef 5
15	rs528950	G / A	Intron 14	Nef 5
16	rs2073901	C / A	Ekson 17	Nef 6
17	rs437168	C / T	Ekson 17	Nef 6
18	rs10426635	G / C	Intron 21	Nef 8
19	rs34277375	C / T	Ekson 23	Nef 9
20	rs4806213	A / G	Ekson 24	Nef 10
21	rs466452	C / T	Intron 24	Nef 10
22	rs4805141	G / A	Intron 24	Nef 10
23	g.25440C>T	C / T	Intron 24	Nef 10
24	rs28538468	T / G	Intron 25	Nef 10
25	rs2071327	A / G	Ekson 27	Nef 10
26	rs731934	C / T	Intron 27	Nef 10

Wyniki dla pacjentów z NS przedstawiające odczyty genotypów stanowią Załącznik nr 5, a osób z populacji kontrolnej – Załącznik nr 6. Załączniki te były podstawą do analizy statystycznej.

Spośród zbadanych polimorfizmów 19 występowało w 1 wariacie allelicznym, a 7 w dwóch wariantach allelicznych. Do SNP występujących w jednym wariacie allelicznym należały: rs2285450 (C), rs412175 (A), rs8113675 (T), rs396178 (G), rs34673364 (G), rs35238405 (A), rs34982899 (C), rs417786 (C), rs34320609 (T), rs392702 (C), rs28939695 (G), rs34761059 (C), rs528950 (G), rs273901 (C), rs437168 (C), rs10426635 (G), rs34277375 (C), rs4806213 (A), rs28538468 (T). W nawiasie podano wariant alleliczny wykryty u wszystkich przebadanych osób z grupy badanej i kontrolnej. SNP występujące w dwóch wariantach allelicznych obejmowały: rs3814995, rs33950474, rs466452, rs4805141, g.25440C>T, rs2071327, rs731934.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono w odniesieniu do siedmiu SNP występujących w dwóch wariantach allelicznych. W oparciu o dane genotypowania obliczono częstości występowania poszczególnych wariantów allelicznych oraz genotypowych w grupie badanej i kontrolnej. W przypadku dwóch polimorfizmów, rs33950474 (nr 2) i rs4805141 (nr 4), u pacjentów z NS zidentyfikowano dwa warianty alleliczne, a u osób zdrowych tylko wariant natywny. Te SNP nie są zatem zróżnicowane w przebadanej grupie osób zdrowych, zaś są zróżnicowane u przebadanych pacjentów z NS. Częstości alleli i genotypów w każdym zbadanym SNP były różne w grupie badanej i kontrolnej. U pacjentów z NS cztery polimorfizmy (rs3814995, rs466452, rs2071327, rs731934) występowały w 3 wariantach genotypowych, a trzy polimorfizmy (rs33950474, rs4805141, g.25440C>T) w dwóch wariantach genotypowych. Z kolei w grupie kontrolnej trzy SNP (rs3814995, rs2071327, rs731934) występowały w trzech wariantach genotypowych, dwa polimorfizmy (rs466452, g.25440C>T) w dwóch wariantach genotypowych i dwa polimorfizmy (rs33950474, rs4805141) w jednym wariacie genotypowym. Wyniki przedstawiono w Tabeli 25.

Tabela 25. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie nefryny u osób z grupy badanej i kontrolnej.

Lp.	Nazwa SNP	Częstości alleli		Częstości genotypów	
		Grupa badana	Grupa kontrolna	Grupa badana	Grupa kontrolna
1	rs3814995	G: 0.69, A: 0.31	G: 0.68, A: 0.32	GG: 0.46, AA: 0.08 GA: 0.46	GG: 0.50, AA: 0.15, GA: 0.35
2	rs33950474	G: 0.96, A: 0.04	G: 1.00, A: 0.00	GG: 0.92, AA: 0.00, GA: 0.08	GG: 1.00, AA: 0.00, GA: 0.00
3	rs466452	C: 0.81, T: 0.19	C: 0.80, T: 0.20	CC: 0.69, TT: 0.08, CT: 0.23	CC: 0.60, TT: 0.00, CT: 0.40
4	rs4805141	G: 0.96, A: 0.04	G: 1.00, A: 0.00	GG: 0.92, AA: 0.00, GA: 0.08	GG: 1.00, AA: 0.00, GA: 0.00
5	g.25440C>T	C: 0.81, T: 0.19	C: 0.90, T: 0.10	CC: 0.92, TT: 0.00, CT: 0.38	CC: 0.80, TT: 0.00, CT: 0.20
6	rs2071327	A: 0.50, G: 0.50	A: 0.53, G: 0.47	AA: 0.31, GG: 0.31, AG: 0.38	AA: 0.35, GG: 0.30, AG: 0.35
7	rs731934	C: 0.65, T: 0.35	C: 0.60, T: 0.40	CC: 0.54, TT: 0.23, CT: 0.23	CC: 0.45, TT: 0.25, CT: 0.30

W dwóch przypadkach (rs33950474, rs4805141) dla grupy kontrolnej nie otrzymano wyniku odnośnie zgodności z niezrównoważeniem Hardy-Weinberga (ang. Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE), ponieważ SNP w tej grupie występowały w jednym wariacie allelicznym. Wszystkie pozostałe SNP w obu badanych grupach były zgodne z prawem HWE. Otrzymane wyniki nie wykazały istotnych statystycznie różnic w częstości występowania wariantów SNP między pacjentami z NS i osobami zdrowymi. Otrzymane wartości P były większe od 0,05; mieściły się w granicach od 0,3009 do 1. Obliczone wartości ilorazu szans (ang. odds ratio, OR) wynosiły od 0,201 do 1,259. Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej zostały przedstawione w Tabeli 26.

Tabela 26. Obliczenia statystyczne dotyczące SNP w genie nefryny.

Lp.	Nazwa SNP	Badana grupa	X^2 testu P	X^2	Zgodność z prawem HWE (P<0,05)	P	OR (95% CI)
1	rs3814995	Grupa badana	0,764	0,090	Tak	1,0000	1,083
		Grupa kontrolna	0,366	0,818	Tak		
2	rs33950474	Grupa badana	0,885	0,021	Tak	0,3939	0,201
		Grupa kontrolna	brak	brak	-		
3	rs466452	Grupa badana	0,354	0,860	Tak	1,0000	1,050
		Grupa kontrolna	0,264	1,250	Tak		
4	rs4805141	Grupa badana	0,885	0,021	Tak	0,3939	0,210
		Grupa kontrolna	brak	brak	-		
5	g.25440C>T	Grupa badana	0,391	0,737	Tak	0,3009	0,467
		Grupa kontrolna	0,619	0,247	Tak		
6	rs2071327	Grupa badana	0,405	0,692	Tak	1,0000	1,105
		Grupa kontrolna	0,182	1,779	Tak		
7	rs731934	Grupa badana	0,077	3,123	Tak	0,7963	1,259
		Grupa kontrolna	0,094	2,813	Tak		

4.3.2.2. Analiza polimorfizmów SNP w genie *NPHS2*

Zweryfikowano 6 polimorfizmów SNP w genie *NPHS2*. Cztery polimorfizmy (rs12568913, rs5005771, rs3818587, rs4399118) znajdowały się w niedalekiej odległości od mutacji opisanych u pacjentów z NS. Trzy spośród tych polimorfizmów (rs5005771, rs3818587, rs4399118) zlokalizowane były w eskonie 8. Dwa SNP (rs2026014, rs3829795) zlokalizowane były w rejonie promotorowym genu. Lista polimorfizmów przeanalizowanych z wykorzystaniem sond typu TaqMan oraz ich lokalizację i odległość od znanych mutacji punktowych podocyny zawiera Tabela 27. Wyniki otrzymane tą metodą posłużyły do wybrania pacjentów poddanych w kolejnym etapie sekwencjonowaniu genów.

Tabela 27. Polimorfizmy SNP przeanalizowane metodą sond TaqMan.

Lp.	Nazwa SNP	Lokalizacja w genie	Sąsiadująca mutacja	Odległość od mutacji (pz)
1	rs2026014	Promotor	-	-
2	rs3829795	Promotor	-	-
3	rs12568913	Ekson 5	V180atg Q215X	47 56
4	rs5005771	Ekson 8	A297V E310V	1 37
5	rs3818587	Ekson 8	R322G	73
6	rs4399118	Ekson 8	R322G	170

Spośród 6 polimorfizmów, 3 występowały w jednym wariacie allelicznym, należały do nich: rs2026014 (A), rs5005771 (C), rs4399118 (C), w nawiasie podano wariant nukleotydowy wykryty u wszystkich przebadanych osób. Polimorfizm rs5005771 znajduje się blisko dwóch mutacji, jednak nie był zróżnicowany w przebadanej grupie osób. Trzy SNP wystąpiły w dwóch wariantach allelicznych, należały do nich: rs3829795 (A / G), rs12568913 (A / G), rs3818587 (C / T). Polimorfizm rs12568913 jest położony blisko dwóch mutacji skojarzonych w NS i był polimorficzny w badanej grupie osób.

Wśród zróżnicowanych polimorfizmów, zmiana rs3829795 występowała w układzie heterozygotycznym (AG) u 18 pacjentów z NS, w tym u 14 z SRNS, 3 z I rzutem NS i 1 z III rzutem NS. Z kolei polimorfizm rs3818587 wystąpił w wariacie heterozygotycznym (CT) u 10 dzieci chorujących na zespół nerczycowy, w tym u 7 pacjentów z SRNS i 3 z I rzutem NS. Trzeci zróżnicowany polimorfizm, rs12568913, wystąpił u wszystkich zbadanych pacjentów w układzie heterozygotycznym, co zaprzecza prawu równowagi HWE. Polimorfizm rs12568913 został ponownie zbadany metodą sekwencjonowania wykazując, że wszystkie osoby posiadały

genotyp CC. Oznacza to, że sonda TaqMan przyłączała się niespecyficycznie zatem nie spełniała swojej funkcji. Problem ten dotyczył także wszystkich osób z grup kontrolnej. Fakt ten został zgłoszony producentowi sondy.

Wyniki dla pacjentów z NS stanowią Załącznik nr 7, a dla populacji kontrolnej – Załącznik nr 8. Załączniki te przedstawiają tabele z odczytanymi genotypami badanych sześciu SNP dla każdej przeanalizowanej osoby w grupie badanej i kontrolnej.

Analizę polimorfizmów w oparciu o wyniki sekwencjonowania przeprowadzono na grupie 22 pacjentów z zespołem nerczycowym (21 dzieci z SRNS, 1 dziecka z I rzutem NS) oraz u 30 dzieci bez objawów NS. Zbadano 15 polimorfizmów SNP, w tym 14 kodujących i 1 niekodujący. Najwięcej SNP, w ilości 5, zlokalizowanych było w eksonie 8, natomiast w eksonie 4 zbadano 4 polimorfizmy. Szczegółowe informacje o wariantach nukleotydowych oraz ich lokalizacji przedstawia Tabela 28.

Tabela 28. Polimorfizmy SNP w genie podocyny wykryte w wyniku sekwencjonowania.

Lp.	Nazwa SNP	Warianty nukleotydowe	Lokalizacja w genie	Lokalizacja w produkcie PCR
1	rs12748598	T / G	Intron 1	Pod 1
2	rs3738423	C / T	Ekson 2	Pod 2
3	rs12240233	T / C	Ekson 3	Pod 3
4	rs6687787	A / T	Ekson 4	Pod 4
5	rs12401711	C / T	Ekson 4	Pod 4
6	rs16854341	T / C	Ekson 4	Pod 4
7	rs12401708	C / T	Ekson 4	Pod 4
8	rs12568913	C / T	Ekson 5	Pod 5
9	rs61747728	G / A	Ekson 5	Pod 5
10	rs11808359	A / G	Ekson 7	Pod 7
11	rs5005771	G / A	Ekson 8	Pod 8
12	rs1410592	C / T	Ekson 8	Pod 8
13	rs3818587	A / G	Ekson 8	Pod 8
14	rs4399118	C / T	Ekson 8	Pod 8
15	rs1410591	C / G	Ekson 8	Pod 8

Wyniki dla pacjentów z NS w postaci tabel przedstawiających genotypy osobno dla każdego pacjenta z NS stanowią Załącznik nr 9, a grupy kontrolnej – Załącznik nr 10. Genotypy stanowiły punkt wyjścia do obliczeń statystycznych.

Spośród zbadanych 15 polimorfizmów, 7 występowało w jednym wariacie allelicznym, należały do nich: rs12748598 (T), rs12240233 (T), rs6687787 (A), rs16854341 (T), rs12568913

(C), rs5005771 (G), rs4399118 (C). W nawiasie podano wariant nukleotydowy wykryty u wszystkich przebadanych osób z grupy badanej i kontrolnej. Osiem polimorfizmów występowało w dwóch wariantach allelicznych, należały do nich: rs3738423, rs12401711, rs12401708, rs61747728, rs11808359, rs1410592, rs3818587, rs1410591.

Przeprowadzona analiza dwoma technikami pozwoliła w sumie na uzyskanie genotypów 17 polimorfizmów SNP, ponieważ 4 polimorfizmy (rs12568913, rs5005771, rs3818587, rs4399118) zostały zbadane obiema technikami. Dzięki temu możliwa była weryfikacja otrzymanych genotypów.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono w odniesieniu do dziewięciu polimorficznych SNP. W oparciu o dane genotypowania obliczono częstości występowania poszczególnych wariantów w grupie badanej i kontrolnej. Wszystkie polimorficzne SNP występowały w obu wariantach allelicznych zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. W grupie badanej cztery polimorfizmy (rs12401711, rs12401708, rs1410592, rs1410591) występowały w trzech wariantach genotypowych, a pięć polimorfizmów (rs3829795, rs3738423, rs61747728, rs11808359, rs3818587) występowało w dwóch wariantach genotypowych. Z kolei w grupie kontrolnej sześć polimorfizmów (rs12401711, rs12401708, rs61747728, rs11808359, rs1410592, rs1410591) występowało w trzech wariantach genotypowych, a trzy polimorfizmy (rs3829795, rs3738423, rs3818587) występowały w dwóch wariantach genotypowych. Żaden polimorfizm nie występował w jednym wariantie genotypowym. Wyniki przedstawiono w Tabeli 29.

Tabela 29. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie podocyny u osób z grupy badanej i kontrolnej.

Lp.	Nazwa SNP	Częstości alleli		Częstości genotypów	
		Grupa badana	Grupa kontrolna	Grupa badana	Grupa kontrolna
1	rs3829795	A: 0.33, G: 0.67	A: 0.28, G: 0.72	AA: 0.00, GG: 0.34, AG: 0.66	AA: 0.00, GG: 0.44, AG: 0.56
2	rs3738423	C: 0.91, T: 0.09	C: 0.88, T: 0.12	CC: 0.82, TT: 0.00, CT: 0.18	CC: 0.76, TT: 0.00, CT: 0.24
3	rs12401711	C: 0.71, T: 0.29	C: 0.72, T: 0.28	CC: 0.50, TT: 0.09, CT: 0.41	CC: 0.53, TT: 0.10, CT: 0.37
4	rs12401708	C: 0.73, T: 0.27	C: 0.72, T: 0.28	CC: 0.55, TT: 0.09, CT: 0.36	CC: 0.53, TT: 0.10, CT: 0.37
5	rs61747728	G:0.98, A:0.02	G:0.93, A: 0.07	GG:0.96, AA: 0.00, GA:0.04	GG: 0.90, AA:0.03, GA: 0.07
6	rs11808359	A: 0.98, G :0.02	A: 0.83, G: 0.17	AA: 0.95, GG: 0.00, AG: 0.05	AA: 0.70, GG: 0.03, AG: 0.27
7	rs1410592	C: 0.36, T: 0.64	C: 0.35, T: 0.65	CC: 0.14, TT: 0.41, CT: 0.45	CC: 0.06, TT: 0.37, CT: 0.57
8	rs3818587	C: 0.11, T: 0.89	C: 0.07, T: 0.93	CC: 0.00, TT: 0.77, CT: 0.23	CC: 0.00, TT: 0.85, CT: 0.15
9	rs1410591	C: 0.50, G: 0.50	C: 0.63, G: 0.37	CC: 0.32, GG: 0.32, CG: 0.36	CC: 0.37, GG: 0.10, CG: 0.53

W przypadku jednego polimorfizmu, rs3829795, otrzymany rozkład genotypów nie był zgodny w prawem Hardy-Weinberga, zarówno dla pacjentów z NS, jak i dla osób zdrowych. Rozkład pozostałych ośmiu SNP był zgodny z prawem H-W w obu badanych grupach. W przypadku jednego SNP, rs11808359, otrzymano wynik istotny statystycznie, poziom istotności wynosił 0,023, natomiast iloraz szans osiągnął wartość 8,6 (przedział ufności: 1,057-69,961). Wariant tego polimorfizmu wystąpił u 21 spośród badanych 22 pacjentów z NS, wariant nie wystąpił u jednego pacjenta z SRNS. W przypadku siedmiu polimorfizmów nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania alleli między grupami badaną i kontrolną. Otrzymane wartości P były większe od 0,05, mieściły się w granicach od 0,2280 do 1.

Obliczone wartości OR wynosiły od 0,579 do 1,581. Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej zostały przedstawione w Tabeli 30.

Tabela 30. Analiza statystyczna SNP w genie podocyny u pacjentów z zespołem nerczycowym i u osób zdrowych.

Lp.	Nazwa SNP	Badana grupa	X ² testu P	X ²	Zgodność z prawem HWE (P<0,05)	P	OR (95% CI)
1	rs3829795	Grupa badana	0,009	6,883	Nie	Brak	brak
		Grupa kontrolna	0,0004	12,461	Nie		
2	rs3738423	Grupa badana	0,639	0,222	Tak	0,7533	1,370
		Grupa kontrolna	0,460	0,546	Tak		
3	rs12401711	Grupa badana	0,935	0,007	Tak	1,0000	0,948
		Grupa kontrolna	0,595	0,283	Tak		
4	rs12401708	Grupa badana	0,696	0,153	Tak	1,0000	1,054
		Grupa kontrolna	0,595	0,283	Tak		
5	rs61747728	Grupa badana	0,913	0,012	Tak	0,3931	1,047
		Grupa kontrolna	0,011	6,467	Tak		
6	rs11808359	Grupa badana	0,913	0,012	Tak	0,0230	8,600
		Grupa kontrolna	0,827	0,048	Tak		
7	rs1410592	Grupa badana	0,933	0,007	Tak	1,0000	1,061
		Grupa kontrolna	0,179	1,807	Tak		
8	rs3818587	Pacjenci ZN	0,548	0,361	Tak	0,3730	1,581
		Grupa kontrolna	0,468	0,526	Tak		
9	rs1410591	Pacjenci ZN	0,201	1,636	Tak	0,2280	0,579
		Grupa kontrolna	0,417	0,660	Tak		

4.3.2.3. Analiza polimorfizmów SNP w genie *WT1*

Uzyskane sekwencje pozwoliły na określenie genotypów 21 polimorfizmów SNP: 11 kodujących i 10 niekodujących. Najwięcej polimorfizmów, w liczbie trzech, było zlokalizowanych w eksonie 6, eksonie 7 i eksonie 9. Szczegółowe informacje o wariantach nukleotydowych oraz ich lokalizacji przedstawia Tabela 31.

Tabela 31. Polimorfizmy SNP w genie *WT1* wykryte w wyniku sekwencjonowania.

Lp.	Nazwa SNP	Warianty nukleotydowe	Lokalizacja w genie	Lokalizacja w produkcie PCR
1	rs2234583	C / T	Ekson 1	WT1_1
2	rs9332973	G / A	Ekson 1	WT1_1
3	rs9332974	C / T	Ekson 2	WT1_2
4	rs2234584	C / T	Ekson 2	WT1_2
5	rs5030168	G / T	Intron 2	WT1_2
6	rs2295081	A / G	Intron 4	WT1_3
7	rs61889223	A / G	Intron 4	WT1_4
8	rs5030208	C / T	Intron 5	WT1_4
9	rs2234590	A / G	Ekson 6	WT1_5
10	rs17855567	A / G	Ekson 6	WT1_5
11	rs5030274	T / C	Intron 6	WT1_6
12	rs16754	A / G	Ekson 7	WT1_6
13	rs2234592	C / T	Intron 7	WT1_6
14	rs2234593	A / C	Intron 7	WT1_7
15	rs28942089	C / T	Ekson 8	WT1_7
16	rs28941777	T / C	Ekson 9	WT1_8
17	rs28941779	T / C	Ekson 9	WT1_8
18	rs28941778	G / A	Ekson 9	WT1_8
19	rs1799937	C / T	Intron 9	WT1_9
20	rs2234594	G / A	Intron 10	WT1_9
21	rs5030315	A / G	Intron 10	WT1_9

Wyniki dla pacjentów z NS w postaci tabel przedstawiających genotypy osobno dla każdego pacjenta z NS stanowią Załącznik nr 11, a grupy kontrolnej – Załącznik nr 12. Genotypy stanowiły punkt wyjścia do obliczeń statystycznych. Spośród analizowanych polimorfizmów u zbadanych osób 15 występowało w jednym wariantcie allelicznym, należały do nich: rs9332973 (G), rs9332974 (C), rs2234584 (C), rs5030168 (G), rs61889223 (A), rs5030208 (C), rs2234590 (A), rs17855567 (A), rs5030274 (T), rs2234592 (C), rs28942089 (C), rs28941777 (T),

rs28941779 (T), rs28941778 (G), rs2234594 (G). W nawiasie podano wariant nukleotydowy wykryty u wszystkich przebadanych osób z grupy badanej i kontrolnej. Sześć SNP występowało w dwóch wariantach allelicznych, należały do nich: rs2234583, rs2295081, rs16754, rs2234593, rs1799937, rs5030315. Obliczenia statystyczne przeprowadzono w odniesieniu do sześciu zróżnicowanych SNP. W oparciu o dane genotypowania obliczono częstości występowania poszczególnych wariantów w grupie badanej i kontrolnej.

Wszystkie zróżnicowane SNP występowały w obu wariantach allelicznych zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. W grupie badanej trzy polimorfizmy (rs2295081, rs16754, rs1799937) występowały w trzech wariantach genotypowych, a trzy polimorfizmy (rs2234583, rs2234593, rs5030315) występowało w dwóch wariantach genotypowych. Z kolei w grupie kontrolnej dwa polimorfizmy (rs2295081, rs1799937) występowały w trzech wariantach genotypowych, a cztery polimorfizmy (rs2234583, rs16754, rs2234593, rs5030315) występowały w dwóch wariantach genotypowych. Żaden polimorfizm nie występował w jednym wariantcie genotypowym. Wyniki przedstawiono w Tabeli 32.

Tabela 32. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie *WT1* u osób z grupy badanej i kontrolnej.

Lp.	Nazwa SNP	Częstości alleli		Częstości genotypów	
		Grupa badana	Grupa kontrolna	Grupa badana	Grupa kontrolna
1	rs2234583	C: 0.93, T: 0.07	C: 0.88, T: 0.12	CC: 0.86, CT: 0.14, TT: 0.00	CC: 0.75, CT: 0.25, TT: 0.00
2	rs2295081	A: 0.75, G: 0.25	A: 0.75, G: 0.25	AA: 0.57, AG: 0.36, GG: 0.07	AA: 0.55, AG: 0.40, GG: 0.05
3	rs16754	A: 0.89, G: 0.11	A: 0.90, G: 0.10	AA: 0.86, AG: 0.07, GG: 0.07	AA: 0.80, AG: 0.20, GG: 0.00
4	rs2234593	C: 0.93, A: 0.07	C: 0.93, A: 0.07	CC: 0.86, CA: 0.14, AA: 0.00	CC: 0.85, CA: 0.15, AA: 0.00
5	rs1799937	T: 0.79, C: 0.21	T: 0.75, C: 0.25	TT: 0.64, CT: 0.29, CC: 0.07	TT: 0.55, TC: 0.40, CC: 0.05
6	rs5030315	A: 0.96, G: 0.04	A: 0.93, G: 0.07	AA: 0.93, AG: 0.07, GG: 0.00	AA: 0.85, AG: 0.15, GG: 0.00

Rozkład wszystkich sześciu SNP był zgodny z prawem HWE w obu badanych grupach. Otrzymane wyniki nie wykazały istotnych statystycznie różnic w częstości występowania wariantów SNP między pacjentami z NS i osobami zdrowymi. Otrzymane wartości P były większe od 0,05; mieściły się w granicach od 0,6380 do 1. Obliczone wartości OR wynosiły od 0,926 do 2,189. Wyniki przeprowadzonych obliczeń statystycznych zostały przedstawione w Tabeli 33.

Tabela 33. Obliczenia statystyczne dotyczące SNP w genie *WT1*.

Lp.	Nazwa SNP	Badana grupa	X ² testu P	X ²	Zgodność z prawem HWE (P<0,05)	P	OR (95% CI)
1	rs2234583	Pacjenci ZN	0,773	0,083	Tak	0,6912	1,857
		Grupa kontrolna	0,523	0,408	Tak		
2	rs2295081	Pacjenci ZN	0,859	0,032	Tak	1,0000	1,000
		Grupa kontrolna	0,766	0,089	Tak		
3	rs16754	Pacjenci ZN	0,020	5,498	Nie	1,0000	0,926
		Grupa kontrolna	0,619	0,247	Tak		
4	rs2234593	Pacjenci ZN	0,773	0,083	Tak	1,0000	1,054
		Grupa kontrolna	0,717	0,131	Tak		
5	rs1799937	Pacjenci ZN	0,432	0,617	Tak	0,7797	1,222
		Grupa kontrolna	0,766	0,089	Tak		
6	rs5030315	Pacjenci ZN	0,890	0,019	Tak	0,6380	2,189
		Grupa kontrolna	0,717	0,131	Tak		

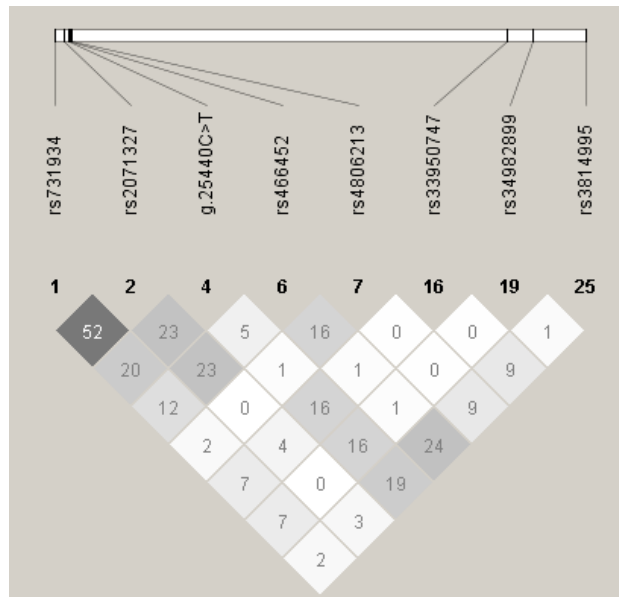
4.3.3. Badanie niezrównoważenia sprzężeń na podstawie bloków haplotypowych

4.3.3.1. Badanie struktury genu *NPHS1*

Na bazie genotypów obliczono wartości D', LOD (logD), R², Chi², które wykorzystano do zbadania niezrównoważenia sprzężeń. Wyniki te stanowią odpowiednio: dla grupy badanej załącznik nr 13, dla grupy kontrolnej – załącznik nr 14, a dla obu grup razem – załącznik nr 15.

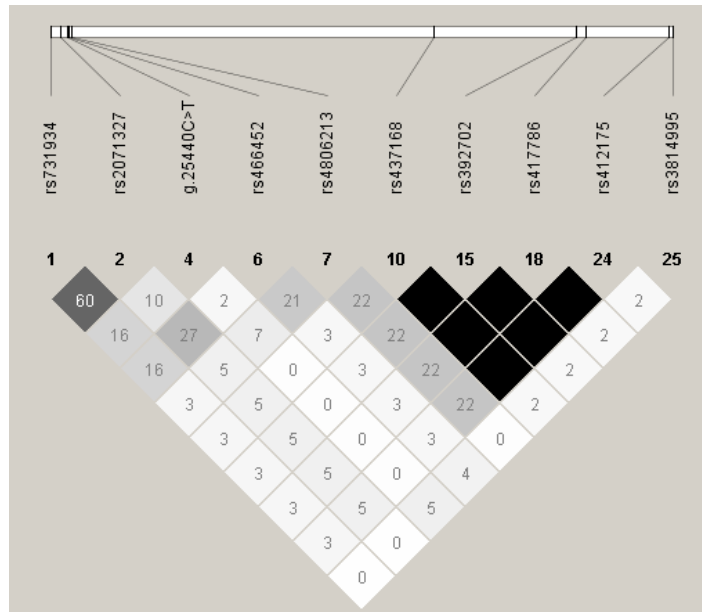
Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla 13 pacjentów z NS (12 dzieci z SRNS i 1 dziecka z I rzutem NS) otrzymaną w oparciu o algorytm Gabriel et al. przedstawia Rycina 13, dla grupy kontrolnej – Rycina 14, a dla połączonych grup badanej i kontrolnej, Rycina 15. W oparciu o program Haploview, algorytm Gabriel et al. w genie *NPHS1* nie zidentyfikowano bloków haplotypowych zarówno w grupie badanej, kontrolnej jak i po połączeniu obu grup.

Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla pacjentów z NS obejmuje osiem SNP: rs731934, rs2071327, g.25440C>T, rs466452, rs4806213, rs33950747, rs34982899, rs3814995. W przypadku dwóch SNP (rs731934, rs2071327) otrzymano wartość R² równą 52, co świadczy o dość wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R² mieszczące się w granicach od 0 do 24, co wskazuje na brak powiązania polimorfizmów w genie nefryny u pacjentów z NS.



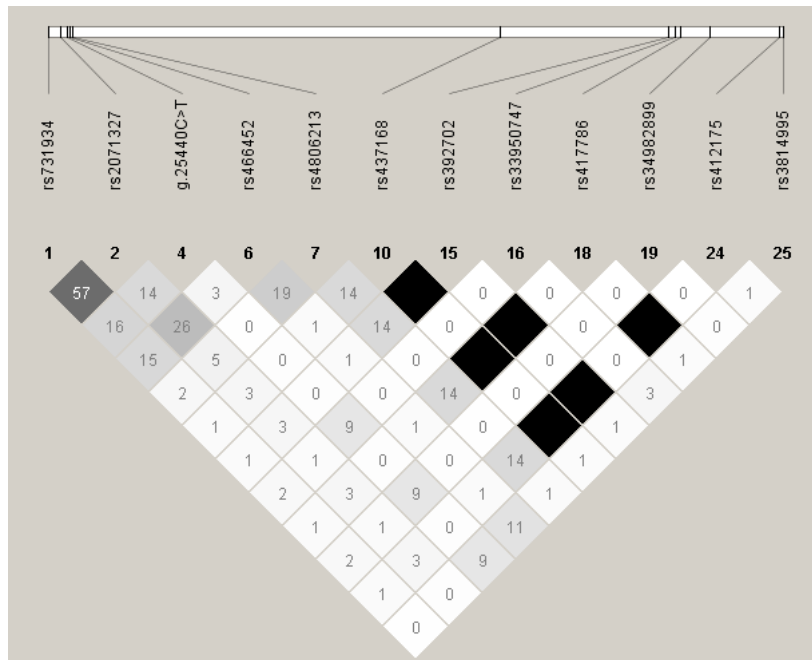
Ryc. 13. Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla osób zdrowych obejmuje dziesięć SNP: rs731934, rs2071327, g.25440C>T, rs466452, rs4806213, rs437168, rs392702, rs417786, rs412175, rs3814995. W przypadku czterech SNP (rs437168, rs392702, rs417786, rs412175) otrzymano wartości R^2 równe 100, co świadczy o bardzo wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u osób zdrowych. Wynik taki otrzymano dla każdej możliwej kombinacji par SNP spośród czterech wymienionych polimorfizmów. W przypadku dwóch SNP (rs731934, rs2071327) otrzymano wartość R^2 równą 60, co świadczy o dość wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u osób zdrowych. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 27, co wskazuje na brak powiązania tych polimorfizmów w genie nefryny u osób zdrowych.



Ryc. 14. Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla gupy kontrolnej, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla pacjentów z NS i osób zdrowych obejmuje dwanaście SNP: rs731934, rs2071327, g.25440C>T, rs466452, rs4806213, rs437168, rs392702, rs33950747, rs417786, rs34982899, rs412175, rs3814995. W przypadku czterech SNP (rs437168, rs392702, rs417786, rs412175) otrzymano wartości R^2 równe 100, co świadczy o bardzo wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u przebadanych pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie. Wynik taki otrzymano dla każdej możliwej kombinacji par SNP spośród czterech wymienionych polimorfizmów. W przypadku dwóch SNP (rs731934, rs2071327) otrzymano wartość R^2 równą 57, co świadczy o dość wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u przebadanych pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 26, co wskazuje na brak powiązania tych polimorfizmów w genie nefryny u przebadanych pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie.



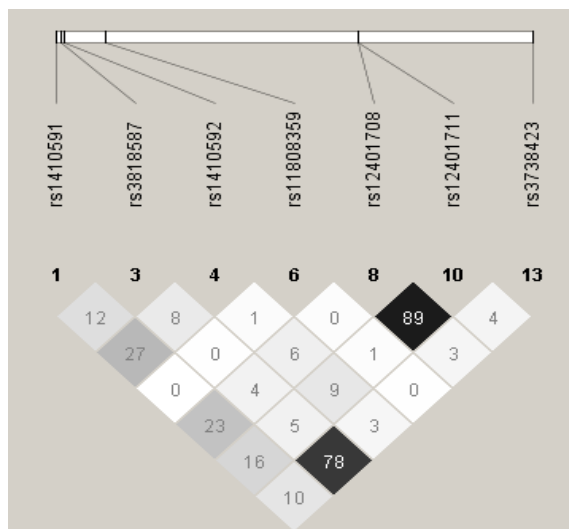
Ryc. 15. Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

4.3.3.2. Badanie niezrównoważenia sprzężeń w genie *NPHS2*

Obliczone wartości D' , LOD ($\log D$), R^2 , χ^2 zestawiono w postaci załącznika 16 dla grupy badanej, załącznika 17 dla grupy kontrolnej, oraz załącznika 18 dla obu grup razem.

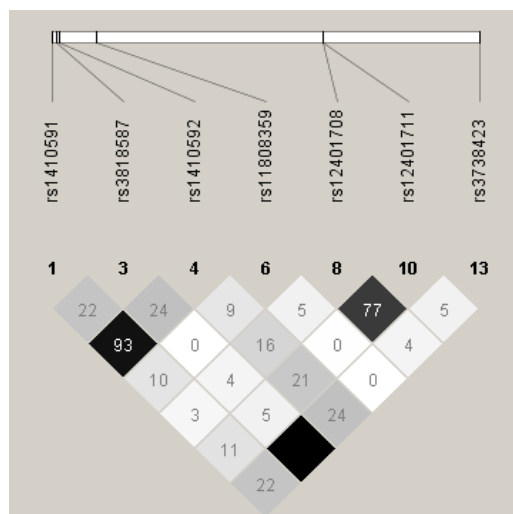
Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla pacjentów z NS otrzymaną w oparciu o algorytm Gabriel et al. przedstawia Rycina 16, dla grupy kontrolnej – Rycina 17, a dla połączonych grup badanej i kontrolnej, Rycina 18.

Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla 22 pacjentów z NS (21 dzieci z SRNS, 1 dziecka z I rzutem NS) obejmuje siedem SNP: rs1410591, rs3818587, rs1410592, rs11808359, rs12401708, rs12401711, rs3738423. W przypadku pary SNP rs3818587 i rs3738423 otrzymano wartość R^2 równą 78, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS. W przypadku pary SNP rs12401708 i rs12401711 otrzymano wartość R^2 równą 89, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 27, co wskazuje na brak powiązania polimorfizmów w genie podocyny u pacjentów z NS.



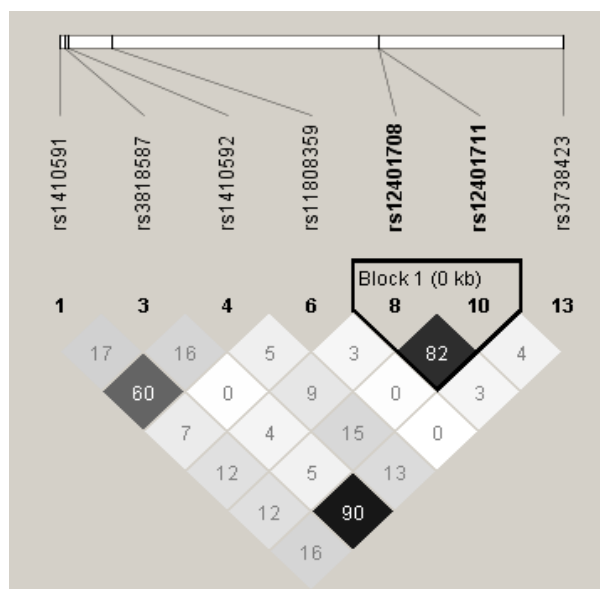
Ryc. 16. Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla pacjentów chorujących na zespół nerzycowy, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla osób zdrowych obejmuje siedem SNP: rs1410591, rs3818587, rs1410592, rs11808359, rs12401708, 12401711, rs3738423. W przypadku pary SNP rs3818587 i rs3738423 otrzymano wartość R^2 równą 100, co świadczy o bardzo wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u osób zdrowych. W przypadku pary SNP rs1410591 i rs1410592 otrzymano wartość R^2 równą 93, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u osób zdrowych. W przypadku pary SNP rs12401708 i 12401711 otrzymano wartość R^2 równą 77, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u osób zdrowych. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 24, co wskazuje na brak powiązania polimorfizmów w genie podocyny u osób zdrowych.



Ryc. 17. Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla grupy kontrolnej, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

Nieznrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla pacjentów z NS oraz osób zdrowych ujętych wspólnie obejmuje siedem SNP: rs1410591, rs3818587, rs1410592, rs11808359, rs12401708, 12401711, rs3738423. W przypadku pary SNP rs3818587 i rs3738423 otrzymano wartość R^2 równą 90, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie. W przypadku pary SNP rs12401708 i 12401711 otrzymano wartość R^2 równą 82, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie. W przypadku pary SNP rs1410591 i rs1410592 otrzymano wartość R^2 równą 60, co świadczy o dość wysokim niezrównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 17, co wskazuje na brak powiązania polimorfizmów w genie podocyny u pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie. Zidentyfikowano jeden blok haplotypowy obejmujący dwa SNP (rs12240233, rs12401711).



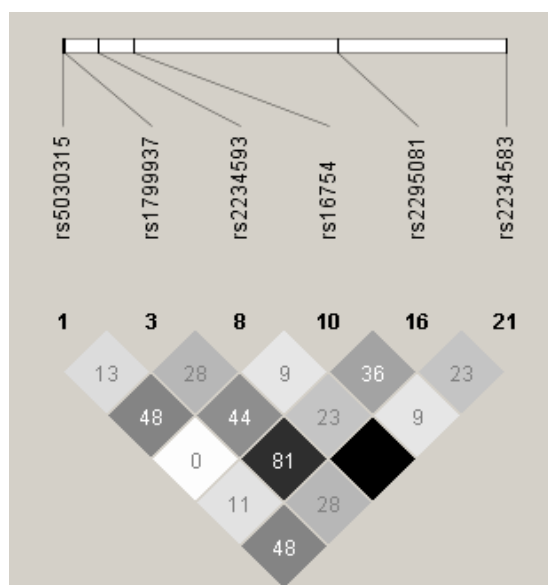
Rys. 18. Nieznrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

4.3.3.3. Badanie niezrównoważenie sprzężeń w genie *WT1*

Obliczone wartości D' , LOD ($\log D$), R^2 , χ^2 zestawiono w postaci załącznika 19 dla grupy badanej, załącznika 20 dla grupy kontrolnej, oraz załącznika 21 dla obu grup razem.

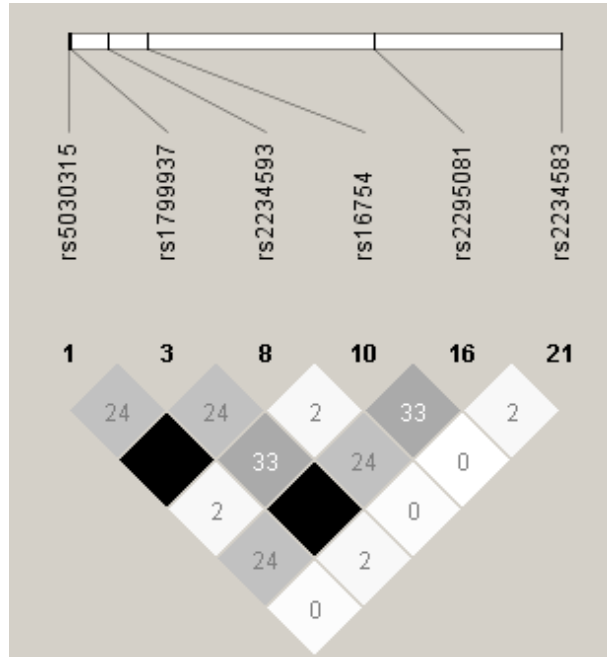
Nieznrównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla 14 pacjentów z NS (12 dzieci z SRNS, 2 dzieci z I rzutem NS) otrzymaną w oparciu o algorytm Gabriel et al. przedstawia Rycina 19, dla grupy kontrolnej – Rycina 20, a dla połączonych grup badanej i kontrolnej, Rycina 21.

Nieznównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla pacjentów z NS obejmuje sześć SNP: rs5030315, rs1799937, rs2234593, rs16754, rs2295081, rs2234583. W przypadku pary SNP rs2234593 i rs2234583 otrzymano wartość R^2 równą 100, co świadczy o bardzo wysokim niezównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS. W przypadku pary SNP rs1799937 i rs2295081 otrzymano wartość R^2 równą 81, co świadczy o wysokim niezównoważeniu sprzężeń u pacjentów z NS. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 48, co wskazuje na brak powiązania polimorfizmów w genie *WT1* u pacjentów z NS.



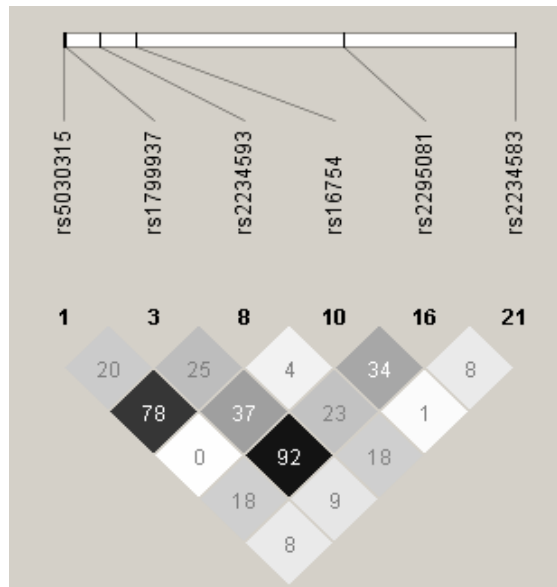
Ryc. 19. Nieznównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla pacjentów z zespołem nerczycowym, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

Nieznównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla osób zdrowych obejmuje sześć SNP: rs5030315, rs1799937, rs2234593, rs16754, rs2295081, rs2234583. W przypadku pary SNP rs5030315 i rs2234593 oraz pary rs1799937 i rs2295081 otrzymano wartości R^2 równe 100, co świadczy o bardzo wysokim niezównoważeniu sprzężeń u osób zdrowych. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 33, co wskazuje na brak powiązania polimorfizmów w genie *WT1* u osób zdrowych.



Ryc. 20. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla gupy kontrolnej, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

Niezrównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla pacjentów z NS i osób zdrowych obejmuje sześć SNP: rs5030315, rs1799937, rs2234593, rs16754, rs2295081, rs2234583. W przypadku pary rs1799937 i rs2295081 otrzymano wartość R^2 równą 92, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń dla pacjentów z NS i osób zdrowych. W przypadku pary SNP rs5030315 i rs2234593 otrzymano wartość R^2 równą 78, co świadczy o wysokim niezrównoważeniu sprzężeń dla pacjentów z NS i osób zdrowych. W przypadku pozostałych par SNP otrzymano wartości R^2 mieszczące się w granicach od 0 do 37, co wskazuje na brak powiązania polimorfizmów w genie *WT1* u pacjentów z NS i osób zdrowych ujętych wspólnie.



Ryc. 21. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *WTI* dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych, w oparciu o algorytm Gabriel et al.

5. Omówienie wyników i dyskusja

Przeprowadzona analiza miała na celu zbadanie podłoża genetycznego zespołu nerczycowego u dzieci z Polski oraz wykazanie, czy zmiany na poziomie DNA pozwalają na wyjaśnienie patogenezы NS. Badania molekularne wymagają ścisłej współpracy ośrodków badawczych oraz klinicystów, ponieważ ich powodzenie w dużej mierze zależy od właściwego doboru homogennej grupy pacjentów oraz przeprowadzenia szczegółowego wywiadu rodzinnego. W dobie ery sekwencjonowania ludzkiego genomu medycyna pokłada wielkie nadzieje w badaniach genetycznych, gdyż stanowią one klucz do wyjaśnienia licznych chorób dziedzicznych. Zmiany w DNA, tak odziedziczone jak i powstałe *de novo*, ukazują bowiem czy pacjent posiada prawidłowe, funkcjonalne białko, czy też dochodzi do jego uszkodzenia. Co więcej, poznanie typu mutacji pozwala na oszacowanie konsekwencji dla funkcjonowania bariery filtracyjnej, co dla nefrologa jest kluczową informacją i pozwala na podjęcie najlepszej decyzji odnośnie zastosowania terapii.

Nadrzędną rolą badań genetycznych jest wskazanie, czy u danego pacjenta występują poważne mutacje, zaburzające funkcjonowanie białka. Sekwencjonowanie informuje dodatkowo o zmianach polimorficznych, które pojedynczo nie stanowią o rozwoju choroby, jednak analizowane w zespołach, mogą wskazać na obniżone lub podwyższone ryzyko zachorowania. Kompleksowa analiza genów pozwala także na określanie relacji między polimorfizmami leżącymi w jednym genie, co wyrażone jest poprzez niezrównoważenie sprzężeń. Taka analiza wymaga przebadania wielu pacjentów i wówczas może wskazać różnice w sposobie dziedziczenia polimorfizmów między osobami zdrowymi, a chorującymi na daną chorobę. Identyfikacja takich różnic mogłaby stanowić nowe podejście w diagnostyce molekularnej. Testy oparte o różnice w niezrównoważeniu sprzężeń na bazie SNP mogłyby służyć badaniu podatności na zachorowanie, a zatem dotyczyłyby głównie członków rodzin pacjentów chorujących na chorobę dziedziczną.

Przeprowadzona analiza trzech genów, *NPHS1*, *NPHS2* i *WT1* pozwoliła na weryfikację zarówno mutacji, jak i polimorfizmów, a także umożliwiła zbadanie nizerównoważenia sprzężeń genów *NPHS1*, *NPHS2* i *WT1* na bazie SNP zlokalizowanych w eksonach.

Dane literaturowe wskazują, że mutacje genu nefryny są dużo bardziej poważne w skutkach w porównaniu z innymi genami zaangażowanymi w kłębuszkową barierę filtracyjną. W badaniach Hinkes i wsp. wykazano, że wśród pacjentów z mutacją obecną w genie nefryny, u około 20% pacjentów doszło do schyłkowej niewydolności nerek, a w konsekwencji do śmierci

(120). Najczęstszymi, występującymi w 94% przypadków, mutacjami genu nefryny w populacji fińskiej są: delecja 2 par zasad w eksonie 2, nazwana "Fin major" oraz mutacja typu nonsensownego w eksonie 26, nazwana "Fin minor" (92). Ich następstwem jest powstanie nefryny o mniejszej masie cząsteczkowej i zmienionej strukturze (93). Wśród pacjentów nie posiadających fińskich korzeni, mutacje Fin major i Fin minor występują niezwykle rzadko. Wśród zidentyfikowanych mutacji w genie nefryny nie znalazły się mutacje Fin major (L41fsX90) ani Fin minor (R1109X). Co więcej zidentyfikowane zmiany nie skutkowały skróceniem białka, czyli kodonem STOP, ale zamianą jednego aminokwasu na inny. Ponadto tylko jedna spośród 15 zidentyfikowanych mutacji występowała w układzie homozygotycznym, pozostałe zaś występowały w układzie heterozygotycznym. Jest to niezwykle istotne z punktu widzenia konsekwencji klinicznych, ponieważ zmiany w układzie heterozygotycznym oznaczają, że pewna pula białka powstaje w natywnej, niezmienionej formie i może pełnić swoją funkcję w komórce. Pewną pulę produkowanego białka stanowi jednak cząsteczka powstała ze zmutowanego genu. Wykryta zmiana homozygotyczna, insercja adeniny, powodowała substytucję kwasu asparaginowego na asparaginę w aminokwasie 310 w trzeciej domenie immunoglobulinowej nefryny. W konsekwencji w miejscu tym doszło do zmiany ładunku z ujemnego na neutralny. Mutacja ta wystąpiła u pacjenta K103, u którego mimo wieloletniego leczenia (GK, CF, CsA, MMF), wciąż zachowana jest funkcja nerek. Nasuwa się zatem wniosek, iż wykryta mutacja nie prowadzi do schyłkowej niewydolności nerek przed ukończeniem dwudziestego roku życia. Zidentyfikowana zmiana homozygotyczna jest jednocześnie jedyną zidentyfikowaną mutacją w miejscu splicingowym, na granicy intronu 7 i eksonu 8. W literaturze natomiast zmiany na granicy intron/ekson są częste. W pracy Mbarek i wsp. u pacjentów z CNF opisano bowiem cztery mutacje genu nefryny, w tym dwie w miejscu splicingowym przy eksonie 9 (118). Zmiany wpływające na prawidłowe dojrzewanie mRNA stanowiły zatem połowę znalezionych zmian u pacjentów z Tunezji, natomiast w badaniach przeprowadzonych u pacjentów z Wielkopolski, stanowiły one zaledwie 7% zidentyfikowanych mutacji.

W przypadku mutacji heterozygotycznych nefryny najprawdopodobniej dochodzi do zmian konformacyjnych i zatrzymania zmienionego białka w retikulum endoplazmatycznym (ER) (96), można zatem przypuszczać, że u pacjentów posiadających takie zmiany tylko pula prawidłowego białka zostaje wbudowana w błonę podocytów, gdzie pełni swoją molekularną funkcję. Zatem faktyczna rola mutacji heterozygotycznych ogranicza się do zmniejszenia ilości cząsteczek nefryny budujących barierę filtracyjną w porównaniu z osobami, u których wszystkie cząsteczki są prawidłowe i mogą opuścić ER.

Wcześniejsze badania wykazały, że w u pacjentów z CNF mutacje nefryny dotyczą w głównej mierze domen immunoglobulinowych (85), co potwierdzają otrzymane wyniki. W obrębie genu zidentyfikowano kilka gorących miejsc (ang. hot spot), w których potencjalnie występuje dużo mutacji. Są one zlokalizowane w rejonach istotnych z punktu widzenia funkcji nefryny, a zatem między innymi w domenach immunoglobulinowych (85). Liczne mutacje zlokalizowane są w domenach immunoglobulinowych numer 2, 4 i 7, które są prawdopodobnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania białka. Co więcej, przeprowadzone przez Koziell i wsp. analizy wskazują, że wszystkie mutacje typu missense zlokalizowane są w domenie zewnątrzkomórkowej (85).

Wśród zidentyfikowanych 14 mutacji kodujących *NPHSI*, dziesięć zlokalizowanych było w domenach immunoglobulinowych, które są istotne dla zachowania prawidłowej struktury białka. We wspomnianych domenach numer 2, 4 i 7 zidentyfikowano 6 mutacji, co stanowiło 43% znalezionych zmian w genie nefryny. Spośród pozostałych zmian kodujących, jedna zlokalizowana była w domenie transbłonowej i jedna w ogonie cytozolowym. Obecność zmian w różnych częściach białka potwierdzają wyniki innych badaczy, którzy wykazali obecność zmian zarówno w domenach cytoplazmatycznych, jak i zewnątrzkomórkowych (85).

Jedna ze zidentyfikowanych mutacji w genie *NPHSI*, zlokalizowana w ostatnim 27 eksonie, dotyczyła aminokwasu seryny o numerze 1157 i wystąpiła u dwóch pacjentów, jednego z SRNS i drugiego z III rzutem NS. Jak wspomniano powyżej, znaleziona zmiana nie powodowała przedwczesnej terminacji łańcucha białkowego, ale skutkowała substytucją na inny aminokwas (fenyloalaninę). Z kolei w literaturze wielokrotnie opisano inną mutację dotyczącą eksonu 27, opisaną jako R1160X, która powodowała nieznaczne skrócenie białka. Badania Koziell i wsp. pokazują, że zmutowany allel występuje we wszystkich badanych rodzinach z Malty, a także u części pacjentów pochodzących z Azji. R1160X to mutacja nonsensowna, która ma charakter recesywny, gdyż u zdrowych rodziców oraz rodzeństwa pacjentów zidentyfikowano tą mutację w postaci heterozygotycznej (85).

Zmiany w łańcuchu proteinowym nie zawsze powodują zaburzenia funkcji białka. Szczególnie istotne jest zachowanie ładunku oraz polarności cząsteczki, co wpływa na jej konformację. W związku z tym szczególnie istotne są mutacje, które zmieniają aminokwas o danych cechach na aminokwas o cechach przeciwnych. Zidentyfikowano cztery mutacje heterozygotyczne i jedną homozygotyczną zmieniające ładunek aminokwasu oraz cztery mutacje wpływające na polarność cząsteczki. Szczególnie ciekawe są dwie heterozygotyczne mutacje: Pro 227 Arg oraz Gly 270 Asp, które zmieniają zarówno ładunek, jak i polarność w łańcuchu proteinowym. Pierwsza mutacja (Pro 227 Arg), zlokalizowana jest w drugiej domenie Ig, zmienia

aminokwas hydrofobowy na hydrofilowy oraz ładunek neutralny na dodatni. Została ona zidentyfikowana u pacjenta K128 z SRNS. Z kolei zmiana Gly 270 Asp zlokalizowana jest w trzeciej domenie immunoglobulinowej, podobnie powoduje substytucję reszty niepolarniej na polarną, ale tym razem przenosi ładunek ujemny. Mutacja ta została zidentyfikowana u chorego na SRNS pacjenta K147. Mutacja w glicynie 270 została już wielokrotnie opisana u pacjentów z CNF, jednak w literaturze opisano przypadki zmiany na cysteinę, a nie kwas asparaginowy. Co ciekawe, ta mutacja często występuje w układzie heterozygotycznym i współwystępuje z innymi mutacjami heterozygotycznymi, co jest analogiczne z otrzymanymi wynikami pacjenta K147. U tego opornego na leczenie steroidami pacjenta zidentyfikowano bowiem aż 3 mutacje w układzie heterozygotycznym w genie nefryny, z których dwie powodowały zmianę polarności białka. Dodatkowo materiał DNA pacjenta K147 sprawiał trudności podczas analizy eksonu 8 i 11.

W literaturze opisano także ciekawą mutację typu zmiany sensu, N188I, która najprawdopodobniej zaburza miejsce N-glikozylacji pełniące istotną rolę w mechanizmie lokalizacji nefryny w błonie komórkowej (119). W przebadanej grupie dzieci z zespołem nerczycowym takiej zmiany nie znaleziono, jednak zidentyfikowano położoną blisko mutację aminokwasu numer 183. Mutacja Ile 183 Leu zidentyfikowana u jednego pacjenta SRNS (K103) być może również związana z prawidłowym dołączeniem reszt cukrowych do cząsteczki białka.

Przeprowadzona analiza genetyczna ujawniła grupę sześciu pacjentów, którzy posiadają więcej niż jedną mutację w układzie heterozygotycznym w genie nefryny, u czterech zidentyfikowano dwie mutacje (K100, K103, K119, K132), a u dwóch - trzy mutacje (K147, K139). Spośród tej grupy pacjent K132 przeszedł nefrektomię i jest obecnie dializowany, natomiast pacjent K119 zmarł w wyniku nawrotu choroby. Jakże może mieć to konsekwencje dla terapii oraz obrazu klinicznego choroby? Istnieje kilka hipotez, ponieważ mutacje mogą występować na tej samej kopii genu lub na różnych kopiach. Wspomniano, że zdecydowana większość zmian w genie nefryny zatrzymuje białko w ER i nie pozwala na jego włączenie do błony podocytów. Można zatem przypuszczać, że u pacjentów posiadających więcej mutacji ilość prawidłowych cząsteczek jest jeszcze mniejsza niż u pacjentów dotkniętych pojedynczą zmianą w DNA. Skala zmiany oraz ilość uwalnianych cząsteczek powinna być proporcjonalna do liczby mutacji, jednak w przypadku wspomnianych pacjentów nie zaobserwowano takiej zależności. Pacjent K103 pomimo dwóch mutacji rozwinął zespół nerczycowy w trzecim miesiącu życia, zatem wcześniej niż pacjent K147 posiadający trzy zmiany w DNA genu nefryny.

Analiza genu nefryny wykazała zmiany o charakterze heterozygotycznym, z jednym wyjątkiem zmiany homozygotycznej. Wykazano zatem wpływ sekwencji genu *NPHS1* na

steroidooporny zespół nerczycowy. Natomiast przeprowadzone przez Koziell i in. badania innych niż CNF zespołów nerczycowych, po przeanalizowaniu 29 eksonów, intronów oraz promotora genu, wykazały, że pacjenci z wczesnym steroidoopornym zespołem nerczycowym nie posiadali żadnej mutacji (85).

Analiza niezrównoważenia sprzężeń trzech genów, *NPHS1*, *NPHS2* i *WT1*, zwraca uwagę na różnice między badanymi grupami. Różnice są widoczne przede wszystkim w genie nefryny po porównaniu pacjentów z NS i osób zdrowych. U pacjentów zależności między parami SNP są słabsze niż u osób zdrowych, co może sugerować, iż na poziomie DNA zachodzą silniejsze relacje w przypadku braku choroby, są to jednak jedynie przypuszczenia, ponieważ struktura genu podlega modyfikacjom w wyniku powstania mutacji oraz jest wrażliwa nawet na małe zmiany.

Dotychczas opisano ponad 30 różnych mutacji chorobotwórczych w genie podocyny, z których większość dotyczy domeny stomatyny w c-końcowej części białka (101, 103). Wśród poznanych zmian ponad połowę stanowią mutacje missensowne, część z nich dotyczy zmiany ramki odczytu, co skraca powstający łańcuch polipeptydowy. Obecne są także mutacje w miejscu splicingowym generujące nieprawidłowy mRNA podczas transkrypcji (102).

W przypadku przeanalizowanych pacjentów z NS, nie wykryto tak licznych mutacji. Zidentyfikowano 4 zmiany w eksonach i jedną w intronie. Mutacje wpływające na zmianę aminokwasu zlokalizowane były w domenie stomatynowej podobnie jak większość opisanych zmian w genie *NPHS2* (101). W przebadanej grupie pacjentów steroidoopornych nie wystąpiły dwie najczęstsze mutacje R138Q o potencjalnym zastosowaniu diagnostycznym oraz R229Q, która zwykle współwystępuje z innymi zmianami w podocynie. Mutacja R138Q zaburza zdolność podocyny do przekazywania nefryny do tratw lipidowych (104) i jest powiązana z ujawnieniem się choroby we wczesnym dzieciństwie (103). Zmiana R138Q leży w gorącym miejscu szczególnie silnie powiązonym ze steroidoopornym zespołem nerczycowym typu 1 (97). Ze względu na jej obecność nawet u 30% pacjentów, mutacja R138Q została zaproponowana jako test skriningowy do diagnostyki SRNS. Z kolei zupełnie inny charakter ma mutacja R229Q, która przez niektórych badaczy określana jest jako polimorfizm, gdyż obecna jest u około 3% ogólnej populacji ludzkiej (105). Co ciekawe, wykazano powiązanie między obecnością wariantu R229Q, a przebiegiem klinicznym choroby. U niektórych pacjentów z SRNS, obecność innej mutacji podocyny w połączeniu ze zmianą R229Q wiąże się z późniejszym wystąpieniem objawów choroby, w porównaniu z osobami nie posiadającymi zmiany R229Q (106). Obserwacje te sugerują, że zmiana nukleotydomowa w loci R229Q powoduje złagodzenie objawów zespołu nerczycowego. Z drugiej jednak strony, zmianę R229Q powiązano z wystąpieniem

mikroalbuminurii, (107) oraz wykazano, iż jej obecność obniża zdolność podocyny do wiązania z nefryną (106).

Mimo braku dwóch najczęstszych mutacji podocyny, otrzymane wyniki także wskazują na powiązanie zmian w genie *NPHS2* z zespołem nerczycowym. Ciekawy jest pacjent K119, który posiada dwie mutacje w nefrynie oraz jedną w podocynie. Stanowi zatem przykład powiązania zmian dwóch genów struktury podocytów z występowaniem SRNS. Wspomniany model trójalleliczny opisuje takich pacjentów jako przykład złożonych relacji na poziomie DNA poprzez współdziałanie grupy genów w powstawaniu lub modyfikacji choroby. U pacjenta K119 w biopsji nerki opisano zmiany FSGS, zaś pierwszy rzut NS wystąpił w pierwszym roku życia. Pacjent choruje od roku i wykazuje częściową remisję po zastosowaniu cyklosporynyA, jednak trudno na tej podstawie ocenić, czy rzeczywiście zmiana w dwóch genach w istotny sposób wpływa na obraz kliniczny choroby.

Spośród pięciu zidentyfikowanych mutacji podocyny, jedna zmienia ładunek wprowadzonego aminokwasu (Arg 229 Gln) u wspomnianego pacjenta K119, a jedna wpływa na polarność (Leu 139 Gln) u pacjenta K107. Pacjent K107 posiada dwie mutacje w genie podocyny, jednak biorąc pod uwagę dotychczasowy przebieg choroby, nie wpływa to negatywnie na odpowiedź na leczenie. Z kolei, jak wspomniano powyżej, pacjent K119 zmarł w wyniku powikłań NS. Ciekawa jest również mutacja niekodująca w intronie 7 podocyny. Została ona zidentyfikowana u trzech pacjentów z NS (K108, K126, K134), spośród których dwóch ma ciężki przebieg choroby. U pacjenta K126 NS trwa nieprzerwanie od listopada 2009 roku, natomiast pacjent K134 jako jedyny w badanej grupie rozwinął ESRD i jest obecnie dializowany. Trudno jednak w tak ciężkich w leczeniu przypadkach dopatrywać się kluczowej roli zmiany DNA, która nie powoduje zmiany w łańcuchu białkowym. Przykład ten obrazuje zatem rolę, innych niż genetyczne, czynników w rozwoju NS. Wniosek ten opiera się na analizie trzech wybranych genów, należy zatem pamiętać o możliwych zmianach DNA zlokalizowanych w innych genach powiązanych z zespołem nerczycowym.

W omawianej pracy analizę mutacji przeprowadzono u pacjentów z Polski, co jest istotne, gdyż wielokrotnie wykazano zależność populacyjną zmian w genie *NPHS2*. Hinkes i wsp. w badaniu zmian w obrębie genów podocyny, nefryny, *WT1* i *LAMB2* wykazali, że wśród pacjentów o pochodzeniu europejskim mutacje genu *NPHS2* stanowiły 48% wszystkich zmian w sekwencji DNA, natomiast u pacjentów z Turcji ich odsetek stanowił zaledwie 13% (120). Co więcej, Maruyama i wsp. wykonali analizę 36 pacjentów z SRNS z populacji japońskiej, w wyniku której nie została wykryta żadna mutacja podocyny, co wskazuje na wpływ czynnika pochodzenia geograficznego grupy badanej. Spostrzeżenia te nasuwają przypuszczenia, że mutacje podocyny

posiadają pewne cechy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, których częstość jest ściśle uzależniona od pochodzenia populacji (121).

Poszukiwanie mutacji w genie podocyny jest dodatkowo uzasadnione poprzez powiązanie zmian w DNA z powodzeniem transplantacji nerki u pacjentów z NS. Wykazano, że u pacjentów, którzy posiadali mutacje podocyny i przeszli zabieg przeszczepienia nerki, ryzyko nawrotu zespołu nerczycowego było znacznie niższe w porównaniu z pacjentami nie posiadającymi takich zmian. Prawdopodobieństwo nawrotu białkomoczu było na poziomie 8% u pacjentów posiadających mutacje podocyny, w porównaniu z wartością 35% , u osób nie posiadających takich mutacji (122). Taka korelacja byłaby niezwykle pomocna w skutecznym planowaniu ewentualnego zabiegu, choć jak niemal w każdym przypadku wyników badań genetycznych, badania nie są jednoznaczne. Bertelli w swoich badaniach polemizuje z doniesieniami o roli mutacji w podocynie, wskazując, że zmiany w genie *NPHS2* nie zwiększają szans na powodzenie przeszczepu. Wskazuje bowiem, że u ponad 40% przebadanych pacjentów z mutacjami w podocynie, po transplantacji nerki doszło do ponownego rozwoju FSGS (123). Niemniej jednak wskazanie podłoża molekularnego zespołu nerczycowego u dzieci może stanowić kryterium kwalifikacji pacjenta do przeszczepu narządu. Prawidłowa diagnostyka jest w tym przypadku szczególnie istotna ze względu na wiek pacjenta.

Wykonane badania genetyczne dotyczyły oprócz mutacji także polimorfizmów SNP. W genie podocyny analiza polimorfizmów została wykonana w oparciu o wyniki sekwencjonowania oraz sond typu TaqMan. Analiza sond została wykorzystana jako wstępny etap, który pozwolił na wyselekcjonowanie pacjentów do etapu sekwencjonowania. Co więcej, w przypadku polimorfizmów SNP w podocynie, dzięki zastosowaniu sond, cztery SNP zostały zbadane dwukrotnie; z wykorzystaniem techniki TaqMan oraz sekwencjonowania. Podejście to pozwoliło na weryfikację specyficzności zakupionych sond. Analiza wykazała, że jedna sonda TaqMan nie spełnia prawidłowo swojej funkcji, ponieważ przyłącza się do DNA zarówno w przypadku pełnej zgodności sekwencji, jak i w przypadku pojedynczej niezgodności, co nie powinno mieć miejsca. W przypadku zbadanych polimorfizmów SNP w genie podocyny, tylko jedna zmiana była istotna statystycznie. Polimorfizm rs11808359 był jedynym przypadkiem, w których częstość występowania była istotnie większa u pacjentów z NS niż u osób zdrowych. Ponadto otrzymany wynik OR na poziomie 8,6 wskazuje na prawdopodobną rolę w rozwoju zespołu nerczycowego. Iloraz szans istotnie mniejszy od jedności wskazuje, iż wariant polimorfizmu jest czynnikiem chroniącym przed wystąpieniem choroby, zaś istotnie większe od jedności może świadczyć o podwyższonym ryzyku zachorowania. Pojedynczy polimorfizm nie jest jednak wystarczającym dowodem na rolę zmian w genie podocyny na podatność wystąpienia zespołu nerczycowego. Co

wiecej, w przypadku innych chorób wielogenowych, wartości OR świadczące o roli SNP są na poziomie 2-3. Niezwykle rzadko otrzymuje się iloraz szans wynoszący >8. W przypadku przeprowadzonych analiz otrzymany wynik $OR=8,6$ może wynikać z małej liczby przebadanych pacjentów i istnieje duże prawdopodobieństwo, iż zwiększenie liczby pacjentów z NS oraz zdrowych dzieci spowodowałoby obniżenie wartości ilorazu szans dla polimorfizmu rs11808359 (50). Mimo to, wynik ten zasługuje na uwagę i wymaga dalszego badania na liczniejszej grupie pacjentów i osób zdrowych. Należy jednak mieć na uwadze fakt, iż z pewnością pojedynczy polimorfizm SNP nie stanowi potencjalnego testu diagnostycznego, ponieważ zmiany tego typu nie powodują choroby, ale mogą informować o zwiększonym lub obniżonym ryzyku rozwoju choroby.

W przypadku badania struktury w genie podocyny ciekawy jest fakt, iż dopiero połączenie grupy pacjentów i osób zdrowych powoduje identyfikację bloku haplotypowego według algorytmu Gabriel i in., natomiast obie grupy analizowane indywidualnie takiego bloku nie posiadają. Ponadto, wyraźnie zaznacza się relacja dwóch SNP: rs1410591 oraz rs3818587, która u osób zdrowych jest bardzo silna ($R^2=93$), a u pacjentów z NS znacznie spada ($R^2=27$). Jest to wyraźny przykład zmiany w sile kosegregacji polimorfizmów SNP u osób chorujących na zespół nerczycowy w porównaniu z grupą kontrolną.

Trzecim analizowanym genem był *WT1*, który jako czynnik transkrypcyjny pozytywnie kontroluje ekspresję genu nefryny (125). Mutacje genu *WT1*, które poprzez skrócenie białko prowadziły do utraty jego funkcji, zostały początkowo zidentyfikowane u pacjentów z guzem Wilmsa (111). Następnie, zmiany genu *WT1* zostały powiązane z DDS (126), ZF (116) oraz NS (127).

Dominujące mutacje *WT1* dotyczą w znacznej mierze eksonu 8 i 9 i powstają de novo, a zatem nie są dziedziczone od rodziców. W konsekwencji powodują zaburzenia domeny palca cynkowego (112, 116). Analiza genu *WT1* została jednak przeprowadzona w oparciu o sekwencje wszystkich fragmentów kodujących. Dzięki temu uzyskano pełne spektrum informacji o zmianach w DNA genu guza Wilmsa.

Spośród opisanych mutacji w genie *WT1* najczęściej występującą mutacją jest R394W, która powoduje zmianę argininy na tryptofan w pozycji 394 (113). Zmiana ta nie została znaleziona u żadnego z przebadanych pacjentów z zespołem nerczycowym. Zidentyfikowano dwie, inne niż R394W, mutacje heterozygotyczne niewystępujące w domenach palców cynkowych. Żadna ze znalezionych zmian nie powodowała także zaburzenia ładunku ani polarności w łańcuchu proteinowym. Zmiana w prolinie 257 nie powoduje co prawda zmiany aminokwasowej, ale u pacjenta K128 współwystępuje z pojedynczą heterozygotyczną mutacją w

nefrynie. Trudno uznać taką sytuację za przykład trójallelicznego modelu NS, ponieważ w genie *WT1* nie dochodzi do zmiany aminokwasu, gdyż zmiana nukleotydowa występuje w trzecim nukleotydzie kodonu, co często skutkuje zachowaniem prawidłowego aminokwasu.

Także w genie *WT1* różnice w niezrównoważeniu sprzężeń genu są widoczne, co ciekawe, w tym genie zaobserwowano dwa przeciwne zjawiska. Jedna para polimorfizmów kosegreguje u pacjentów z NS, czego nie obserwuje się u osób zdrowych. Druga para, odwrotnie, wspólnie dziedziczy się w grupie kontrolnej, zaś relacja ta zanika u osób z NS.

Czy takie pojedyncze różnice w profilu kosegregacji są jednak istotne z klinicznego punktu widzenia? Z pewnością nie są to różnice, które można uznać za przyczynę rozwoju NS lub też wykorzystać w molekularnych badaniach diagnostycznych. Zmiany w strukturze genu mają inny charakter niż mutacje punktowe, nie dotyczą one danego pacjenta, ale całej grupy. Zatem bardzo trudno udowodnić ich wpływ na rozwój oraz rolę w przebiegu choroby. Powiązanie wyników w postaci znalezionych mutacji, zbadanych polimorfizmów oraz zbadanych na ich podstawie struktury genów niezaprzeczalnie uwidacznia jednak rolę zmian na poziomie DNA dla rozwoju zespołu nerczycowego w wybranej grupie pacjentów. Oznacza to, iż czynnik genetyczny z pewnością odgrywa pewną rolę w patogenezie choroby i nie pozostaje bez znaczenia dla rokowania oraz odpowiedzi pacjenta na zastosowane leczenie. Z drugiej jednak strony, w przypadku zespołu nerczycowego wyniki badań genetycznych należy traktować jako uzupełnienie diagnostyki oraz element, który powinien być uwzględniany podczas doboru terapii. NS nie jest chorobą monogenową, w której wykonanie testów genetycznych daje jednoznaczny wynik, gdyż w tym przypadku istnieje wiele elementów, których współlistnienie determinuje przebieg choroby oraz rokowanie pacjenta.

Wykonane badania genetyczne wykazały zmiany na poziomie DNA u pacjentów z NS, jednak ze względu na złożoność choroby jaką jest zespół nerczycowy, nie udało się zidentyfikować zmian o potencjalnym zastosowaniu diagnostycznym. Co więcej, trudno o jasną korelację mutacji z odpowiedzią na zastosowane leczenie. Jest to spowodowane po części tym, że NS ma jedynie częściowo podłoże genetyczne. Ponadto białkomocz będący głównym objawem NS może być wywołany zaburzeniem licznych białek, zaś analizie poddano trzy proteiny odgrywające ważną rolę w prawidłowej filtracji kłębuszkowej.

Pomimo wielu problemów jakie stwarza analiza podłoża genetycznego NS, należy takie badania konsekwentnie kontynuować. Przeprowadzone badania mimo ograniczonej liczby pacjentów oraz analizy trzech wybranych, przyczyniają się do pełniejszego poznania molekularnych zmian istotnych dla przebiegu NS. Ukazują ponadto, że, obok prostych mutacji,

prawdopodobnie także złożone zmiany na poziomie struktury genów wpływają na rozwój choroby.

Dynamicznie rozwijająca się genetyka i biologia molekularna pozwoliły na dokonanie w ciągu ostatnich kilku lat przełomowych odkryć w dziedzinie glomerulopatii. Wiele jest jeszcze aspektów niewyjaśnionych, a do nich należy ostateczne opisanie budowy kłębuszka i funkcjonowania błony ściennej podocytów. Należy oczekiwać, że najbliższe lata wyjaśnią te wątpliwości oraz doprowadzą do poznania kolejnych genów. Mogłoby to w sposób zasadniczy zmienić postępowanie terapeutyczne, ograniczając na przykład nieefektywne leczenie immunosupresyjne (124). Wczesna i kompleksowa diagnostyka oparta na metodach biologii molekularnej, a także poradnictwo genetyczne w rodzinach obciążonych mogą zyskać powszechne zastosowanie już w okresie najbliższej dekady.

6. Wnioski

- 6.1. U dzieci z zespołem nerczycowym z Polski, w porównaniu z grupą kontrolną, występują różnice w sekwencji trzech zbadanych genów: nefryny, podocyny i białka guza Wilmsa.
- 6.2. U dzieci z zespołem nerczycowym występują polimorfizmy SNP w genach nefryny, podocyny i białka guza Wilmsa. Zbadane polimorfizmy były zlokalizowane w rejonach kodujących lub blisko granicy intron/ekson.
- 6.3. Dla każdego z trzech genów ujawniono różnice w niezrównoważeniu sprzężeń genów między dziećmi z zespołem nerczycowym i osobami zdrowymi, co wskazuje na odmienny potencjał przekazywania cech dziedzicznych.
- 6.4. Poprzez wskazanie obecności mutacji, które determinują prawidłową budowę białek błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego, wykazano udział czynnika genetycznego w patogenezie zespołu nerczycowego u dzieci.
- 6.5. Zidentyfikowano 23 nowe mutacje punktowe w badanych genach, w tym 16 mutacji w genie nefryny, 5 w genie podocyny oraz 2 w genie białka guza Wilmsa. Wśród zidentyfikowanych zmian nie znaleziono mutacji charakterystycznych dla wrodzonego zespołu nerczycowego typu fińskiego w genie nefryny oraz dla steroidoopornego zespołu nerczycowego w genie podocyny.

7. Piśmiennictwo

1. Carter CO: Monogenic disorders. *J Med Genet*, 1977, 14: 316-320.
2. Liu L, Li Y, Tollefsbol TO: Gene-Environment Interactions and Epigenetic Basis of Human Diseases. *Curr Issues Mol Biol*, 2008, 10: 25–36.
3. Botstein D, White RL, Skolnick M i in.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331.
4. Donis-Keller H, Green P, Helms C i in.: A genetic linkage map of the human genome. *Cell*, 1987, 51: 319-337.
5. Weissenbach J, Gyapay G, Dib C i in.: A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 1992, 359: 794-801.
6. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B i in.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989, 245: 1066-1073.
7. Kopp JB, Smith MW, Nelson GW i in.: MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 2008, 40: 1175–84.
8. Jaenisch R, Bird A: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, 33(Suppl): 245–254.
9. Risch N, Merikangas K: The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 1996, 273: 1516-1517.
10. Torra R, Badenas C, Darnell A i in.: Linkage, clinical features, and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2, *J Am Soc Nephrol* 7: 2142–2151, 1996
11. Tory K, Lacoste T, Burglen L i in.: High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18: 1566–75.
12. Lupski JR: Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*. 1998, 14: 417–22.
13. Stankiewicz P, Lupski JR: Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*, 2010, 61: 437-55.
14. Conrad DF, Hurles ME: The population genetics of structural variantion, *Nat Genet*, 2007, 39: 30-36.
15. Feuk L, Carson AR, Scherer SW: Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*, 2006, 7: 85-97.

16. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN i in.: Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*, 2004, 36: 949-951.
17. Levy S, Sutton G, Ng PC: The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol*, 2007, 5: e254.
18. Lupski JR, Stankiewicz P: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 2005, 1:e49.
19. Lupski JR, Stankiewicz P: Genomic Disorders Totowa, New Jersey: 2006, *Humana Press*.
20. Lupski JR: Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*, 1998, 14: 417-422.
21. Sebat J, Lakshmi B, Troge J i in.: Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 2004, 305: 525–28.
22. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS: A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest*, 2008, 118: 1590–1605.
23. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF i in.: Segmental duplications: organization and impact within the current Human Genome Project assembly. *Genome Res*, 2001, 11: 1005–17.
24. Pai GS: Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet*, 1980, 18: 436–444.
25. Warburton D: De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet*, 1991, 49: 995–1013.
26. Vermeulen S: Molecular cytogenetic analysis of complex chromosomal rearrangements in patients with mental retardation and congenital malformations: delineation of 7q21.11 breakpoints. *Am J Med Genet*, 2004, 124A: 10–18.
27. Lee JA: A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, 2007, 131: 1235–1247.
28. Gu W, Zhang F, Lupski JR: Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics*, 2008, 1:4.
29. Waldman AS, Liskay RM: Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology. *Mol Cell Biol*, 1998, 8: 5350-5357.
30. Shaw CJ, Lupski JR: Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet*, 2004, 13: R57-64.
31. Stankiewicz P, Lupski JR: Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet*, 2002, 18: 74-82.

32. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U i in.: Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 712-720.
33. Lieber MR: The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*, 2008, 283: 1-5.
34. Lee JA, Inoue K, Cheung SW i in.: Role of genomic architecture in PLP1 duplication causing Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mol Genet*, 2006, 15: 2250-2265.
35. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR: A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, 2007, 131: 1235-1247.
36. Slack A, Thornton PC, Magner DB i in.: On the mechanism of gene amplification induced under stress in Escherichia coli. *PLoS Genet*, 2006, 2: e48.
37. Zhang F: The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate human genomic, genic, and exonic complex rearrangements. *Nat Genet*, 2009, 15: 231-46.
38. Balakirev ES, Ayala FJ: Pseudogenes: are they 'junk' or functional DNA? *Annu Rev Genet*, 2003, 37: 123-151.
39. Superti-Furga A, Bonafe L, Rimoin DL: Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton. *Am J Med Genet*, 2001, 106: 282-93.
40. Andersen PS, Jespersgaard C, Vuust J: Capillary electrophoresis-based single strand DNA conformation analysis in high-throughput mutation screening. *Hum Mutat*, 2003, 21: 455-465.
41. Iida K, Nishimura I: Gene expression profiling by DNA microarray technology. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13: 35-50.
42. Novellia G, Ciccaccia C, Borgiana P i in.: Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2008, 5: 149-154.
43. Kreindler JL: Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther*, 2007, 125: 219-29.
44. Van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB i in.: Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*, 2007, 357: 2677-2686.
45. Botstein D, Risch N: Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003, 33(Suppl): 228-237.
46. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ i in.: Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet*, 2003, 33: 518-521.
47. Cordell HJ, Clayton DG: A unified stepwise regression procedure for evaluating the relative effects of polymorphisms within a gene using case/control or family data: application of HLA in type I diabetes. *Am J Hum Genet*, 2002, 70: 124-141.

48. Zhao LP, Li SS, Khalid N: A method for assessment of disease associations with single nucleotide polymorphism haplotypes and environmental variables in case-control studies. *Am J Hum Genet*, 2003, 72: 1231-1250.
49. Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM i in.: Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, 2002, 419: 832-837, 2002.
50. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE i in.: Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet*, 2002, 70: 425-434.
51. Pritchard JK, Przeworski M: Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet*, 2001, 69: 1–14.
52. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG i in.: Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 109–118.
53. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H i in.: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 2002, 296: 2225–2229.
54. Sebastiani P, Lazarus R, Weiss ST i in.: Minimal haplotype tagging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9900–9905.
55. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA i in.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 1989, 245: 1073–1080.
56. Laird N, Kraft P, Lange C i in.: Testing for association in genetic studies. In: Silverman E.K. Respiratory genetics. 2005, London: Hodder Arnold. pp. 27–46.
57. The International HapMap Consortium: A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 2007, 449: 851–861.
58. International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. *Nature*, 2005, 437: 1299–1320.
59. Niaudet P: Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. In Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Editors: Pediatric nephrology, Philadelphia, 2004, Lippincott Williams & Wilkins.
60. Sharples PM, Poulton J, White RH: Steroid Responsive nephrotic syndrome is more common in Asians. *Arch Dis Child*, 1985, 60: 1014-17.
- 61 Garin EH, West L, Zheng W: Interleukin-8 alters glomerular heparan sulfate glycosaminoglycan chain size and charge in rats. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14: 284-287.
- 62 Pickering M, Cook HT: Complement and glomerular disease: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011 Mar 18. [Epub ahead of print]

- 63 Shalhoub RJ: Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet*, 1974, 7: 556-60.
64. Cotran RS, Rennke HG: Anionic sites and the mechanisms of proteinuria, *N Engl J Med*, 1983, 27: 1050-52.
65. Kriz W, Gretz N, Lemley K: Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int.*, 1998, 54: 687-97.
66. Kihara I, Tsuchida S, Yaoita E i in.: Podocyte detachment and epithelial cell reaction in focal segmental glomerulosclerosis with cellular variants. *Kidney Int Suppl*, 1997, 63: S171-76.
67. Woroniecki RP, Kopp JB: Genetics of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22: 638-44.
68. Eddy AA, Symons JM: Nephrotic syndrome in childhood. Review. *Lancet*, 2003, 23 :629-39.
69. Shih I: Congenial nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 1999, 286: 312-315.
70. Mucha B: Members of the APN Study Group. Mutations in the Wilm's tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9, *Pediatr Res*, 2006, 59: 325-31.
71. Daniels BS: The role of glomerular epithelial cells in the maintenance of the glomerular filtration barrier. *Am J Nephrol*, 1993, 13: 318-23.
72. Caulfield JP, Farquhar MG: The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane as the primary filtration barrier. *J Cell Biol*, 1974, 63: 883-903.
73. Kerjaschki D: Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest*, 2001, 108: 1583-87.
74. Smoyer WE, Mundel P: Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med*, 1998, 76: 172-83.
75. Kobayashi N, Mominoki K, Wakisaka H i in.: Morphogenetic activity of extracellular matrices on cultured podocytes, Laminin accelerates podocyte process formation in vitro, *Ital J Anat Embryol*, 2001, 106: 423-30.
76. Abrahamson DR: Glomerulogenesis in the developing kidney. *Semin Nephrol*, 1991, 11: 375-89.
77. Yang Y, Gubler MC, Beauvils H: Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron*, 2002, 91: 416-23.
78. Matsui K, Breitender-Geleff S, Soleiman A i in.: Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14(Suppl.1): 9-11.

79. Mundel P, Kriz W: Structure and function of podocytes: an update, *Anat Embryol*, 1995, 192: 385–97.
80. Thomas P, Wharram BL, Goyal M i in.: GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J Biol Chem*, 1994, 269: 19953–62.
81. Mundel P, Heid HW, Mundel TM i in.: Synaptopodin: an actin associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol*, 1997, 139: 193–204.
82. Nangaku M, Johnson RJ, Couser WG: Glomerulonephritis and complement regulatory proteins. *Exp Nephrol*, 1997, 5: 345–54.
83. Pavenstadt H: Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278: F173–79.
84. Rodewald R, Karnovsky MJ: Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and the mouse. *J Cell Biol*, 1974, 60: 423–33.
85. Koziell A, Gech V, Hussain S i in.: Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet*, 2002, 11:379-88.
86. Wernerson A, Duner F, Petterson E i in.: Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18: 70–76.
87. Miner J: Focusing on glomerular slit diaphragm. *Am J Pathol*, 2002, 160: 3–5.
88. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M i in.: Positionally cloned gene for novel glomerular protein-nephrin is mutated in congenial nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1998, 1:575-82.
89. Holthöfer H, Ahola H, Solin ML i in.: Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol*, 1999, 155: 1681–87.
90. Rapola J: Congenial nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1987, 1: 441-46.
91. Patrakka J, Martin P, Salonen R i in.: Proteinuria and prenatal diagnosis of congenital nephrosis in fetal carriers of nephrin gene mutations. *Lancet*, 2002, 359: 1575–77.
92. Beltcheva O, Martin P, Lenkkeri U: Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenial nephrotic syndrome. *Hum Mutat*, 2001, 17: 368-73.
93. Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P: Structure of the gene of congenial nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet*, 1999, 64: 51-61.
94. Koziell A, Iyer VK, Moghul NE i in.: Congenial nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2001, 16: 185–89.

95. Zhang J, Ofevrsedt L, Khoshnoodi J: Molecular structure of recombinant nephrin by electron tomography, Abstract A2924, presented at the ASN/ISN World Congress of Nephrology, 2001, San Francisco, CA, USA.
96. Liu L, Done S, Khoshnoodi J: Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: Insight into the mechanisms of congenial nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 2637-44.
97. Boute N, Gribouval O, Roselli S: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 2000, 24:349-54.
98. Jalanko H: Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18: 487-91.
99. Fuchshuber A, Gribouval O, Ronner V i in.: Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12: 374-78.
100. Weber S: Hereditary Nephrotic Syndrome In: Comprehensive pediatric nephrology, Philadelphia, Elsevier, 2008, 219-27.
101. Winn MP: Not all in the family: Mutations of podocin in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 577-79.
102. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM i in.: Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 722-32.
103. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL i in.: NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int*, 2004, 66: 571-79.
104. Huber TB, Simons M, Hartleben B i in.: Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: Mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet*, 2003, 12: 3397-405.
105. Franceschini N, North KE, Kopp JB i in.: NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review. *Genet Med*, 2006, 8: 63-75.
106. Tsukaguchi H., Sudhakar A., Le TC i in.: NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest*, 2002, 110: 1659-66.
107. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF i in.: NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int*, 2004, 65:1026-30.
108. Antignac C: Genetic models: clues for understanding the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 2002, 109: 447-49.

109. Barisoni L, Kriz W, Mundel P i in.: The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10: 51–61.
110. Wagner KD, Wagner N, Schedl A: The complex life of WT1. *J Cell Sci*, 2003, 16: 1653–58.
111. Gessler M, Poustka A, Cavenee W i in.: Homozygous deletion in Wilm's tumours of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*, 1990, 343: 774-78.
112. Schumacher V, Schneider S, Figge A i in.: Correlation of germ-like mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. *Proc Nat Acad Sci*, 1997, 94: 3972-77.
113. Gao F, Maiti S, Sun G i in.: The Wt1+/R394W mouse displays glomerulosclerosis and early-onset renal failure characteristic of human Denys-Drash syndrome. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 9899-910.
114. Guo JK, Menke AL, Gubler MC i in.: WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 651–59.
115. Ito S, Takata A, Hataya H i in.: Isolated diffuse mesangial sclerosis and Wilms tumor suppressor gene. *J Pediatr*, 2001, 138: 425–27.
116. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC i in.: Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet*, 1997, 17: 467-70.
117. Koziell AB, Grundy R, Barratt TM i in.: Evidence for genetic heterogeneity of nephropathic phenotypes associated with Denys-Drash and Frasier syndrome. *Am J Hum Genet*, 1994, 64: 1778–81.
118. Mbarek IB, Abroung S, Omezzine A i in.: Novel mutations in steroid-resistant nephritic syndrome diagnosed in Tunisian children. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26: 241-249.
119. Yan K, Khoshnoodi J, Routsalainen V: N-linked glycosylation is critical for plasma membrane localisation of nephrin, Abstract A0326 presented at the ASN/ISN World Congress of Nephrology, San Francisco, CA, 2001.
120. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos i in.: Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics*, 2007, 119: 907-19.
121. Maruyama K, Iijima K, Ikeda M i in.: NPHS2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18: 412-16.
122. Ichikawa I, Fogo A: Focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 1996, 10: 374-91.
123. Bertelli R, Ginevri F, Caridi G: Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in patients with mutations of podocin. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41: 1314-21.

124. Maruniak-Chudek I, Niemir ZI, Swietlicki J: Podłoże genetyczne zespołów nerczycowych u dzieci. *Postepy Hig Med Dosw*, 2004, 58: 405-15.

125. Wagner N, Wagner D, Xing Y i in.: The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 3044-51.

126. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE: Germline mutations in the Wilms tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*, 1991, 67: 437-47.

127. Jeanpierre C, Denamur E, Henry I i in.: Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of computerized mutation database. *Am J Hum Genet*, 1998, 62: 824-33.

8. Streszczenie

U podłoża zespołu nerczycowego u dzieci leżą zmiany molekularne białek powiązanych z podocytami błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego. Prowadzone badania nad przyczyną białkomoczu nie wskazują jednoznacznie, czy jest on konsekwencją nieprawidłowych reakcji immunologicznych, czy też zmian w sekwencji DNA dla tych białek. W związku z tym trwają badania nad identyfikacją zmian w genach odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie kłębuszkowej bariery filtracyjnej.

W wykonanej pracy analizie poddano trzy geny, które zostały wcześniej powiązane z dziedzicznym zespołem nerczycowym, w tym dwa geny strukturalne podocytów: nefrynę i podocynę, oraz jeden czynnik transkrypcyjny WT1 u dzieci z zespołem nerczycowym. Analizie molekularnej wybranych trzech genów poddano 124 osoby, w tym 33 pacjentów z NS, którzy nie odpowiadali na leczenie glikokortykosteroidami. U większości badanych dzieci choroba ujawniła się przed ukończeniem czwartego roku życia. Podstawową techniką służącą analizie genów było sekwencjonowanie eksonów, czyli fragmentów kodujących. Dodatkową metodą badawczą były sondy typu TaqMan, które posłużyły do zbadania wybranych polimorfizmów SNP w podocynie. Sekwencjonowanie przeprowadzono w oparciu o produkty uprzednio przeprowadzonych reakcji PCR.

Analiza genetyczna została podzielona na dwa etapy: poszukiwanie mutacji punktowych oraz analizę polimorfizmów SNP służącą do określenia struktury genów.

Obecność mutacji punktowych we fragmentach kodujących genów jest najczęstszą przyczyną zaburzenia ich prawidłowej funkcji. W literaturze opisano dziesiątki mutacji przyczynowych w genach nefryny, podocyny oraz *WT1*. Przeprowadzona analiza doprowadziła do identyfikacji 16 mutacji w genie *NPHS1*, 5 mutacji w genie *NPHS2* oraz 2 mutacji w genie *WT1*.

Analiza genu *NPHS1* nie ujawniła obecności dwóch najczęstszych zmian w tym genie: Fin major i Fin minor, które są odpowiedzialne za rozwój CNF. W genie nefryny zmiany nie skutkowały skróceniem białka, czyli kodonem STOP, ale zamianą jednego aminokwasu na inny. Co więcej, tylko jedna mutacja nefryny występowała w układzie homozygotycznym, pozostałe zaś występowały w układzie heterozygotycznym. Zmiany w genie *NPHS1* obecne były u ponad 70% analizowanych pacjentów, u których NS wystąpił przed końcem trzeciego roku życia, co potwierdza rolę zmian genetycznych w rozwoju zespołu nerczycowego. Mutacje obecne były

między innymi u pacjenta, u którego wykonano nefrektomię i prowadzono leczenie nerkozastępcze oraz u pacjenta, który zmarł.

W genie podocyny zidentyfikowano pięć zmian i, podobnie jak w przypadku nefryny, nie skutkowały one przedwczesną terminacją łańcucha białkowego. Ponadto, w przebadanej grupie liczącej 22 pacjentów, nie zidentyfikowano zmiany R138Q, która opisywana jest w literaturze u ponad 20% pacjentów ze steroidoopornym zespołem nerczycowym. Wspomniana zmiana została zaproponowana jako test skriningowy dla dzieci chorujących na SRNS. Przeprowadzona analiza doprowadziła do identyfikacji zmian u sześciu pacjentów, co stanowiło 27% przebadanych dzieci. Mutacje obecne były między innymi u pacjenta, który jest obecnie dializowany oraz u dziecka, które zmarło. Pacjent, który zmarł posiadał dwie mutacje nefryny oraz jedną podocyny.

W genie *WT1* znaleziono dwie mutacje, występujące w układzie heterozygotycznym, które obecne były u pacjentów steroidoopornych.

Analiza polimorfizmów SNP pozwoliła zbadać częstości alleli oraz genotypów u osób zdrowych z populacji Wielkopolski oraz u pacjentów z NS. Dzięki temu możliwa była ocena zróżnicowania badanej populacji oraz zbadanie ewentualnych różnic w częstości występowania wariantów SNP między osobami zdrowymi i pacjentami chorującymi na zespół nerczycowy.

W genie nefryny analizie poddano 26 polimorfizmów SNP, jednak żaden nie charakteryzował się istotną statystycznie różnicą w częstości występowania między grupą kontrolną, a pacjentami z NS.

Z kolei w genie podocyny zbadano 17 polimorfizmów SNP, wśród których jeden (rs11808359) występował z różną częstością w badanych grupach. Otrzymany wynik był istotny statystycznie na poziomie $P < 0,05$. Wartość ilorazu szans dla tego polimorfizmu wynosiła 8,6, co wskazuje na potencjalną rolę w określeniu podatności na rozwój zespołu nerczycowego.

Przeprowadzona analiza w genie *WT1* pozwoliła na zbadanie 21 polimorfizmów SNP, jednak żaden nie występował u pacjentów z częstością istotnie różną, niż u osób zdrowych.

Otrzymane wyniki dotyczące polimorfizmów SNP posłużyły do zbadania struktury trzech badanych genów w oparciu o program Haploview. Zbadano relacje między parami SNP występującymi w danym genie w celu określenia, czy są one dziedziczone wspólnie. Analizę przeprowadzono osobo dla pacjentów z NS oraz dla osób zdrowych. Dodatkowo wykonano trzeci wariant obliczeń, w którym wszystkie osoby ujęto jako jedną grupę.

We wszystkich trzech genach zidentyfikowano pewne różnice na poziome struktury genu. Siłę oddziaływania między sąsiadującymi SNP zbadano na podstawie niezrównoważenia sprzężeń (LD) i wyrażono w postaci wartości R^2 . W przypadku nefryny u pacjentów z NS struktura genu była słabsza niż u osób zdrowych, co wskazuje na wpływ choroby na osłabienie oddziaływań w

nici DNA. W przypadku podocyny u osób zdrowych obecna była dodatkowa para silnie oddziałujących SNP, która u pacjentów z NS nie wskazywała wspólnego dziedziczenia. Co ciekawe, połączenie grupy pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych pozwoliło na identyfikację pojedynczego bloku haplotypowego, którego obecności nie stwierdzono badając każdą grupę indywidualnie. Także w genie *WT1* otrzymane struktury genu nieznacznie różniły się w grupie pacjentów chorujących na NS i osób zdrowych.

Przeprowadzone badania molekularne pozwoliły na wielopłaszczyznową analizę podłoża genetycznego zespołu nerczycowego u dzieci z Wielkopolski. Otrzymane wyniki potwierdziły rolę czynnika dziedzicznego w patogenezie NS, jednak nie pozwoliły na wskazanie zmian o potencjalnym zastosowaniu diagnostycznym.

9. Abstract

Molecular basis of nephrotic syndrome was associated with modifications of podocyte proteins bearing filtration membrane of glomeruli. Despite numerous research, the reason of proteinuria is unclear. It may result from disturbances in immunological reactions or DNA mutations, which is an incentive for scientists to identify new genes engaged in functioning of glomeruli filtration barrier.

Presented work is the first study in Poland aiming to analyze molecular basis of nephrotic syndrome in children. The analysis included three genes previously associated with inherited form of nephrotic syndrome in children; these were two genes supporting podocyte structure: nephrin and podocin, and one transcription factor – *WT1*.

The study included analysis of 124 individuals, with 33 steroid-resistant NS patients. Most of children developed NS before the age of five. The obtained results based on sequencing of exons, however additional method – TaqMan probes were applied for selected SNP polymorphisms in podocin gene. Sequencing analysis was based on previously amplified products of PCR reaction.

The first step aimed to find point mutations. In order to define gene structure, the study included polymorphic analysis.

The most frequent reason of disturbed protein functioning are coding mutations. So far, dozens of mutations in nephrin, podocin and *WT1* are well known and described. Presented study identified 16 nephrin mutations, 5 podocin mutations and 2 *WT1* mutations.

Among analyzed children, there were no causative CNF mutations named Fin major and Fin minor. Moreover identified nephrin mutations did not result in premature termination of protein chain and with one exception, these were heterozygote substitutions. Disturbances in nephrin gene were identified in over 70% of analyzed NS patients confirming importance of genetic factor in development of nephrotic syndrome. Among children with nephrin mutations, one underwent nephrectomy and is now being dialyzed, and one died.

In podocin there were five mutations identified, however they did not result in stop codon substitution. Moreover, the most frequent mutation, present in 20% of SRNS children with potential diagnostic use, R1328Q, was not identified in any of analyzed patients. Podocin mutations were identified in 6 NS patients, which included 27% of analyzed children. Genetic disturbances were present in dialyzed patient and a child, who died. Patient who died was stressed with two nephrin and one podocin mutation.

Analysis of *WT1* gene led to identification of two heterozygote mutations in SRNS patients.

Allele and genotype frequencies of analyzed SNP polymorphisms were calculated for NS patients and healthy Wielkopolska population. It enabled to assess significant differences between children with nephrotic syndrome and healthy individuals in terms of chosen polymorphisms.

Analysis of 26 SNPs in nephrin did not reveal significant differences between two analyzed groups. However, in podocin gene, among 17 analyzed polymorphisms, one (rs11808359) was significantly more frequent in NS patients with $P < 0,05$. Odds ratio value for this SNP was equal to 8,6, which points at potential NS susceptibility factor. In *WT1* gene among 21 analyzed SNP polymorphisms there was no significant difference between patients and healthy individuals.

Results of polymorphic sites was subsequently utilized for gene structure analysis, based on Haploview software. Reciprocal interaction between pairs of SNPs was studied in three genes engaged in glomerular filtration barrier, separate analyses was conducted for NS patients, healthy controls and both groups combined.

Three genes, nephrin, podocin and *WT1*, were characterized by certain differences in gene structure between patients and healthy individuals. Linkage disequilibrium (LD) was used as a measure of interaction between pairs of SNPs, LD value was expressed by R^2 .

Structure of nephrin was weaker in children with NS than in healthy group. Thus, disease may influence gene structure by weakening DNA interactions. In podocin, children with nephrotic syndrome were characterized by pair of SNPs that co-segregate and do not interact in control group. There was only one haplotype block identified in podocin for NS patients and healthy individuals put together in one group. Third gene, *WT1*, was characterized by gentle structure differences between studied groups.

Presented study allowed to characterize molecular basis of nephrotic syndrome in children from Wielkopolska. The importance of genetic factor in NS was confirmed, however despite broad analysis it was not possible to point at genetic disturbances with potential diagnostic use.

Lista tabel

Tabela 1. Odczynniki wykorzystane do izolacji całkowitego genomowego DNA.

Tabela 2. Odczynniki wykorzystane do reakcji PCR.

Tabela 3. Startery wykorzystane do reakcji PCR.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR dla genów NPHS1, NPHS2 oraz WT1.

Tabela 5. Szczegółowe parametry programów amplifikacyjnych reakcji PCR.

Tabela 6. Odczynniki wykorzystane do rozdziału produktów reakcji PCR w żelu agarozowym.

Tabela 7. Długości produktów PCR dla genów NPHS1, NPHS2 oraz WT1.

Tabela 8. Odczynniki oraz zestaw wykorzystane do oczyszczania produktów PCR.

Tabela 9. Odczynniki wykorzystane do reakcji sekwencjonowania przedstawia.

Tabela 10. Skład mieszaniny w reakcji sekwencjonowania.

Tabela 11. Parametry programu reakcji sekwencjonowania.

Tabela 12. Odczynniki oraz płytka wykorzystane do oczyszczenia produktów sekwencjonowania.

Tabela 13. Odczynniki wykorzystane do elektroforezy kapilarnej.

Tabela 14. Odczynniki wykorzystane do reakcji real time PCR z sondami typu TaqMan.

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej real time PCR z sondami typu TaqMan

Tabela 16. Parametry programu amplifikacyjnego reakcji real time PCR z sondami TaqMan.

Tabela 17. Informacje dotyczące stężenia oraz czystości izolatów DNA pacjentów z NS.

Tabela 18. Informacje dotyczące stężenia oraz czystości izolatów DNA grupy kontrolnej.

Tabela 19. Szczegółowe informacje dotyczące przebiegu klinicznego choroby oraz podłoża molekularnego zespołu nerczycowego.

Tabela 20. Lokalizacja poszczególnych eksonów genu nefryny w produktach PCR.

Tabela 21. Informacje dotyczące mutacji zidentyfikowanych w genie NPHS1 u pacjentów z zespołem nerczycowym.

Tabela 22. Informacje dotyczące mutacji zidentyfikowanych w genie NPHS2 u pacjentów w zespole nerczycowym.

Tabela 23. Informacje dotyczące mutacji zidentyfikowanych w genie WT1 u pacjentów w zespole nerczycowym.

Tabela 24. Informacje dotyczące wariantów nukleotydowych oraz lokalizacji zbadanych SNP w genie nefryny.

Tabela 25. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie nefryny u osób z grupy badanej i kontrolnej.

Tabela 26. Obliczenia statystyczne dotyczące polimorficznych SNP w genie nefryny.

Tabela 27. Informacje o polimorfizmach SNP przeanalizowanych metodą sond TaqMan.

Tabela 28. Informacje dotyczące polimorfizmów SNP w genie podocyny zbadanych w wyniku sekwencjonowania.

Tabela 29. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie podocyny u osób z grupy badanej i kontrolnej.

Tabela 30. Analiza statystyczna polimorficznych SNP w genie podocyny u pacjentów z zespołem nerczycowym i u osób zdrowych.

Tabela 31. Informacje dotyczące wariantów nukleotydowych oraz lokalizacji zbadanych SNP w genie WT1.

Tabela 32. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie WT1 u osób z grupy badanej i kontrolnej.

Tabela 33. Obliczenia statystyczne dotyczące polimorficznych SNP w genie WT1.

Lista rycin

- Ryc. 1. Przykładowy odczyt sekwencji fragmentu genu podocyny w postaci pliku tekstowego.
- Ryc. 2. Przykładowy elektroforegram dobrej jakości fragmentu genu podocyny przedstawiający wysokości pików fluorescencyjnych sekwencji DNA.
- Ryc. 3. Przykładowy elektroforegram fragmentu genu podocyny przedstawiający wysokości pików fluorescencyjnych sekwencji DNA z pojedynczymi pikami słabszej jakości.
- Ryc. 4. Rozdział produktów PCR (fragment Nef 6, 1181 p.z.).
- Ryc. 5. Rozdział produktów PCR (fragment Nef 8, 579 p.z.).
- Ryc. 6. Rozdział produktów PCR (fragment Pod3, 412 p.z.).
- Ryc. 7. Rozdział produktów PCR (fragment Pod8, 544 p.z.).
- Ryc. 8. Rozdział produktów PCR (fragment WT1_5, 353 p.z.).
- Ryc. 9. Rozdział produktów PCR (fragment WT1_9, 416 p.z.).
- Ryc. 10. Odczyt sekwencji fragmentu genu podocyny u pacjenta z zespołem nerczycowym w postaci pliku tekstowego, fragment Pod3, pacjent K72.
- Ryc. 11. Elektroforegram dobrej jakości fragmentu genu podocyny u pacjenta K72 z zespołem nerczycowym przedstawiający wysokości pików fluorescencyjnych sekwencji DNA, fragment Pod3.
- Ryc. 12. Elektroforegram fragmentu genu podocyny u pacjenta K72 z zespołem nerczycowym przedstawiający wysokości pików fluorescencyjnych sekwencji DNA z pojedynczymi pikami słabszej jakości, fragment Pod3.
- Ryc. 13. Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym (algorytm Gabriel et al.).
- Ryc. 14. Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla gupy kontrolnej (algorytm Gabriel et al.).
- Ryc. 15. Niezrównoważenie sprzężeń w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych, (algorytm Gabriel et al.).
- Ryc. 16. Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla pacjentów chorujących na zespół nerczycowy (algorytm Gabriel et al.).
- Ryc. 17. Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla grupy kontrolnej (algorytm Gabriel et al.).
- Rys. 18. Niezrównoważenie sprzężeń w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych (algorytm Gabriel et al.).
- Ryc. 19. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla pacjentów z zespołem nerczycowym (algorytm Gabriel et al.).
- Ryc. 20. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla gupy kontrolnej (algorytm Gabriel et al.).
- Ryc. 21. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *WT1* dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych (algorytm Gabriel et al.).

Lista załączników

Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych.

Załącznik 2. Świadoma zgoda na udział w badaniach genetycznych.

Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 4. Ankieta dla osób zdrowych.

Załącznik 5. Genotypy polimorfizmów SNP w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 6. Genotypy polimorfizmów SNP w genie nefryny dla osób zdrowych.

Załącznik 7. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny otrzymane w oparciu o sondy typu TaqMan dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 8. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny otrzymane w oparciu o sondy typu TaqMan dla osób zdrowych.

Załącznik 9. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 10. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny dla osób zdrowych.

Załącznik 11. Genotypy polimorfizmów SNP w genie WT1 dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 12. Genotypy polimorfizmów SNP w genie WT1 dla osób zdrowych.

Załącznik 13. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 14. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla osób zdrowych.

Załącznik 15. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych.

Załącznik 16. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 17. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla osób zdrowych.

Załącznik 18. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych.

Załącznik 19. Wartości wyrażające LD w genie WT1 dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Załącznik 20. Wartości wyrażające LD w genie WT1 dla osób zdrowych.

Załącznik 21. Wartości wyrażające LD w genie WT1 dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych.

Załącznik 1. Zgoda Komisja Etycznej na prowadzenie badań naukowych, część I



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 974/09

Na podstawie przepisów ustawy z dnia 8 grudnia 1998 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (Dz. U. 1997, Nr 78, poz. 1320) Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 17 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad postępowania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. 1999, poz. 480), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 marca 2001 r. w sprawie szczegółowych wytycznych Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2001, Nr 27, poz. 308), ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2001 r. Nr 53, poz. 513 ze zm.), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i opiekuna (Dz. U. 2004 nr 26, poz. 1929 z późn. zm.), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i opiekuna (Dz. U. Nr 181, poz. 145), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2006 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem pacjentów (Dz. U. 2006 Nr 204, poz. 2184), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2006 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem pacjentów (Dz. U. Nr 184, poz. 1475), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008 r. w sprawie sposobu dokonywania przedklinicznych w ocenie i badaniach klinicznych produktów leczniczych oraz w sprawie wytycznych i sposobu udzielenia opinii na requesty o badanie kliniczne (Dz. U. Nr 201, poz. 1245), Zarządzie Zarządu Promocji i Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanej w sprawie o Deklaracji Wyświadczenia

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 05 listopada 2009 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

dr hab. n. med. Danuta Ostalska-Nowicka

w sprawie prowadzenia badań w

Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej UM w Poznaniu

Główny badacz: mgr Małgorzata Jaroniec

Członkowie zespołu

badawczego:

dr hab. n. med. Michał Nowicki

dr n. med. Witold Szaffarski

prof. dr hab. n. med. Elżbieta Kaczmarek

Temat badań: "Analiza zmian sekwencyjnych w kluczowych genach dla rozwoju zespołu nerczycowego u dzieci".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Załącznik 1. Zgoda Komisja Etycznej na prowadzenie badań naukowych, część II

KOMISJA BIOETYCZNA
 przy
 UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
 im. Karola Mirowskiego w Poznaniu
 61-701 Poznań, ul. Fredry 10
 tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
 fax (+48 61) 854 61 11

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

05.11.2009r.

z dnia



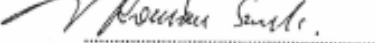
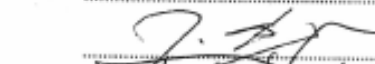


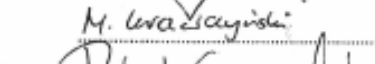
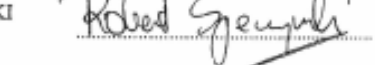

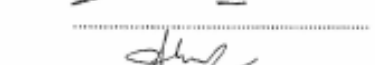
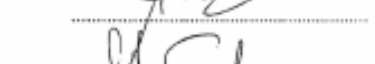
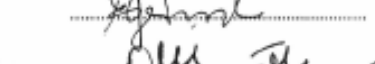
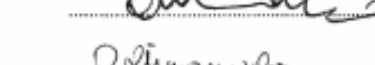
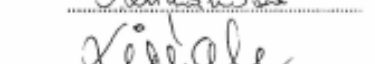

Lp	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Zygmunt Przybylski	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Święcickiego 6, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Roman Szulc	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4.	prof. dr hab. Janusz Szymań	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5.	prof. dr hab. Wojciech Szustewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7.	prof. UM dr hab. med. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8.	dr hab. n. med. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
9.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
10.	prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
11.	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Święcickiego 6
12.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wjeżowa 2/4, Poznań
13.	dr hab. Jerzy W. Ochmański	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
14.	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15.	Barbara Lipińk	pielęgniarka	ZOZ Grunwald

Załącznik 1. Zgoda Komisja Etycznej na prowadzenie badań naukowych, część III

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax (+48 61) 854 61 07

LISTA OBECNOŚCI
KOMISJI BIOETYCZNEJ
PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU

Posiedzenie Komisji dnia: 05 listopada 2009 r.

Przewodniczący:	prof. zw. dr hab. ZYGMUNT PRZYBYLSKI	
Zastępca Przewodniczącego:	prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI	
Członkowie:	prof. dr hab. ROMAN SZULC	
	prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ	
	prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI	
	prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI	
	prof. UM dr hab. med. MACIEJ KRAWCZYŃSKI	
	dr hab. n. med. ROBERT SPACZYŃSKI	
	dr med. PIOTR TOMCZAK	
	prof. dr hab. PAWEŁ CHĘCIŃSKI	
	prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK	
	ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA	
	dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI	
	dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA	
	BARBARA LIPIAK	

Załącznik 2. Świadoma zgoda na udział w badaniach genetycznych.

Wersja 2/maj 2009

**INFORMACJE O UDZIALE W BADANIU NAUKOWYM W SZCZEGÓLNOŚCI O BADANIU MOLEKULARNEGO
PODŁOŻA ZESPOŁU NERCZYCOWEGO**

Cel badania

Zespół nerczycowy (ZN) to złożona choroba, która objawia się białkomoczem oraz licznymi jego następstwami (hipercholesterolemia, hipoproteinemia, nadkrzepliwość). U podłoża ZN leżą klebuszkowe zapalenia nerek. Dotychczasowe badania wykazały, że ZN może mieć podłoże genetyczne. Zidentyfikowany został szereg genów kluczowych dla rozwoju ZN. W naszym laboratorium, postanowiliśmy zbadać, jakie polimorfizmy (różnice) DNA w tych genach wpływają na zapadalność na tę chorobę. W prowadzonych analizach, skupimy się na mutacjach typu SNP, czyli zmianach dotyczących pojedynczego nukleotydu. Otrzymane wyniki pozwolą na głębsze poznanie sposobu, w jaki rozwija się choroba, co w przyszłości być może pozwoli na udoskonalenie doboru odpowiedniej terapii. Aby było to możliwe niezbędne jest odniesienie otrzymanych wyników do grupy kontrolnej (osób chorujących na dane schorzenia). Państwa udział polega na reprezentowaniu grupy kontrolnej.

Procedura badania

Będzie Pani/Pan proszona/y o udzielenie odpowiedzi na kilka pytań zawartych w ankiecie, w tym historii chorób w rodzinie.

Pobrana zostanie próbka krwi (10ml).

Poufność

Dane zebrane w czasie Pani/Pana uczestnictwa w badaniu, łącznie z Pani/Pana danymi osobowymi, będą traktowane jako poufne. Identyfikacja Pani/Pana danych będzie dokonana poprzez nadanie im numeru ewidencyjnego, co pozwoli na zachowanie ich anonimowości. Weryfikacja Pani/Pana danych osobowych będzie odbywać się tylko w ośrodku badawczym i będzie dokonana przez lekarzy i badaczy uczestniczących w projekcie, pod rygorem zachowania tajemnicy służbowej. Dane te nie będą udostępniane innym podmiotom.

Wyniki badania naukowego, w którym bierze Pani/Pana udział, mogą być publikowane lub prezentowane w trakcie spotkań naukowych, jednakże również w tych przypadkach wszelkie dane dotyczące Pani/Pana osoby pozostaną anonimowe.

ŚWIADOMA ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIU

Wyrażam zgodę na udział mojego dziecka w badaniu naukowym dotyczącym molekularnego podłoża zespołu nerczycowego.

Zapoznałam/em się z informacją o badaniu i rozumiem jej treść.

Wyrażam zgodę na przechowywanie i przetwarzanie moich / mojego dziecka danych osobowych zebranych dla celów badania. Zostałam/em poinformowana/y, że mam prawo do wglądu do moich / mojego dziecka danych osobowych, do ich poprawiania, uzupełniania bądź wycofania z bazy danych.

Imię i nazwisko:.....

Data:..... Czytelny podpis.....

Idiopatyczny Zespół Nerczycowy

Ankieta mgr Małgorzata Jaroniec, listopad 2009 (według Prof. Dr. F. Hildebrandt)

Informacje ogólne o pacjencie

Nazwisko: _____ Imię: _____ data ur.: ____ / ____ / ____

K M Wzrost: _____ cm Masa ciała przed chorobą: ____ kg

Zespół nerczycowy Tak Nie
 wśród rodziców / krewnych Matka Brat
 Ojciec Siostra
 Inni: _____

Pochodzenie: polskie Inne europejskie Inne _____

I. Wstępne badanie kliniczne: _____MM/____DD/____YYYY

1. Objawy (początkowe)

- wiek w chwili zachorowania (lata + miesiące).....
- ostry przypadek obrzęk (obwodowe/ płuc/ OUN)
- podczas rutynowego badania wysokie ciśnienie krwi (przed terapią steroidami)
- wymaga leczenia
- krwimocz
- inne objawy: _____

2. Wyniki laboratoryjne (początkowe)

- Badania krwi: Kreatyna: ____ mg/dl
- Analiza moczu: Białkomocz: ____ mg/kg mc/24h lub GFR: ____ ml/min/1.73m² białko mg/crea mg
- Białka surowicy: ____ g/l selektywne nie-selektywne
- Albumina: ____ g/l
- Nieprawidłowości immunologiczne (immunoglobuliny / składniki dopełniacza)
- ANA ANCA dsDNA
- obniżony C₃ obniżony C₄
- Krwinkomocz

3. Biopsja nerki

	1 Biopsja /_____ MM / YYYY	2 Biopsja /_____ MM / YYYY
MCD (zmiany minimalne)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
FSGS (ognisk. i segm. sklerotyzacja kłębuszków)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Cechy niedojrzałości kłębuszków nerkowych	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Mezangialna proliferacja	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Inne: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
IgA	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
IgM	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Ig G	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nerczycowym, część II

C₃

C₄

II. Leczenie

1. Kortykosteroidy

Tak Nie

Steroidowrażliwość

Pełna odpowiedź

Nawrót

Tak Nie

Częściowa odpowiedź

Nawrót

Tak Nie

Steroidooporność

10. Leki cytotoksyczne Tak Nie Nazwa leku: _____ + czas leczenia

Odpowiedź (remisja) kliniczna: _____

Odpowiedź (remisja) biochemiczna: _____

11. _____ Cyklosporyna A (CsA) Tak Nie Czas leczenia

CsA.....

Odpowiedź (remisja) kliniczna: _____

Odpowiedź (remisja) biochemiczna: _____

4. Dializa / Transplantacja nerki MM / YYYY

Data końcowej niewydolności nerek: ____ / ____ Niepowodzenie transplantacji z powodu:

1. transplantacja: ____ / ____ Nawrotu

2. transplantacja: ____ / ____

Utraty przeszczepu z powodu: Nawrotu Odrzucenia

Data niepowodzenia przeszczepu: ____ / ____

III. Dodatkowe informacje

Pacjent choruje / chorował na następujące choroby:

Głuchota Niski wzrost Anomalie układu moczowego

Ślepota Dyzmorfia twarzy Wrodzona wada serca

Małogłowie Sześciopalczałość Alergie

Opóźnienie rozwoju psychoruchowego Dysplazja Kręgowo-nasadowa

Nowotwory / (guz Wilmsa) Cukrzyca typ I

Cukrzyca typ II Choroby autoimmunologiczne (RZS, SLE, CU, ch. Crohna)

Wirusowe zapalenie wątroby

Inne:

Czy ktoś z bliskich pacjenta choruje na wymienione wyżej choroby? Jeśli tak, kto i na jakie?

1.

2.

3.

IV. Uwagi

(opis biopsji, rozmazu, spostrzeżenia)

Załącznik 4. Ankieta dla osób zdrowych.

Idiopatyczny Zespół Nerczycowy - Populacja kontrolna
Ankieta, wersja listopad 2009 (według Prof. Dr. F. Hildebrandt)

Informacje ogólne o pacjencie		
Nazwisko: _____	Imię: _____	data ur.: ____ / ____ / ____
<input type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> M	Wzrost: _____ cm
Zespół nerczycowy wśród rodziców / krewnych	<input type="checkbox"/> Tak	<input type="checkbox"/> Nie
	<input type="checkbox"/> Matka	<input type="checkbox"/> Brat
	<input type="checkbox"/> Ojciec	<input type="checkbox"/> Siostra
	<input type="checkbox"/> Inni: _____	
Pochodzenie:	<input type="checkbox"/> polskie <input type="checkbox"/> Inne europejskie	<input type="checkbox"/> Inne _____

Dodatkowe informacje

Pacjent choruje / chorował na następujące choroby:

- | | | |
|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Głuchota | <input type="checkbox"/> Niski wzrost | <input type="checkbox"/> Anomalie układu moczowego |
| <input type="checkbox"/> Ślepotą | <input type="checkbox"/> Dyzmorfia twarzy | <input type="checkbox"/> Wrodzona wada serca |
| <input type="checkbox"/> Małogłowie | <input type="checkbox"/> Sześciopalczałość | <input type="checkbox"/> Alergie |
| <input type="checkbox"/> Opóźnienie rozwoju psychoruchowego | <input type="checkbox"/> Dysplazja Kręgowo-nasadowa | |
| <input type="checkbox"/> Nowotwory / (guz Wilmsa) | <input type="checkbox"/> Cukrzyca typ I | |
| <input type="checkbox"/> Cukrzyca typ II | <input type="checkbox"/> Choroby autoimmunologiczne (RZS, SLE, CU, ch. Crohna) | |
| <input type="checkbox"/> Wirusowe zapalenie wątroby | | |
| <input type="checkbox"/> Inne: | | |

Czy ktoś z bliskich pacjenta choruje na wymienione wyżej choroby? Jeśli tak, kto i na jakie?

- 1.
- 2.
- 3.

Załącznik 5. Genotypy polimorfizmów SNP w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Lp.	Kod pacjenta	rs2285450	rs3814995	rs412175	rs8113675	rs396178	rs34673364	rs35238405	rs34982899	rs417786	rs34320609	rs33950747	rs392702	rs28939695	rs34761059	rs528950	rs2073901	rs437168	rs10426635	rs34277375	rs4806213	rs466452	rs4805141	pol c/t	rs28538468	rs2071327	rs731934
1	K77	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	cc	cc	gg	cc	cc	aa	cc	gg	ct	tt	aa	tt
2	K94	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	ag	ct
3	K100	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	gg	cc
4	K103	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	cc	tt	gg	cc
5	K115	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	ct	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	ct	tt	ag	ct
6	K119	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	ct	tt	aa	tt
7	K123	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	ag	ct	ag	cc	tt	ag	cc
8	K128	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	ag	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	ct	tt	aa	tt
9	K132	cc	aa	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	tt	gg	cc	tt	gg	cc
10	K147	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	aa	cc
11	K131	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	ag	ct
12	K107	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	gg	cc
13	K139	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	ct	tt	ag	cc

Załącznik 6. Genotypy polimorfizmów SNP w genie nefryny dla osób zdrowych.

Lp.	Kod pacjenta	rs2285450	rs3814995	rs412175	rs8113675	rs396178	rs34673364	rs35238405	rs34982899	rs417786	rs34320609	rs33950747	rs392702	rs28939695	rs34761059	rs528950	rs2073901	rs437168	rs10426635	rs34277375	rs4806213	rs466452	rs4805141	pol c/t	rs28538468	rs2071327	rs731934
1	C8	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	gg	cc	
2	C11	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	aa	ct
3	C12	cc	aa	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	ag	ct	gg	ct	tt	ag	ct
4	C13	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	cc	tt	ag	ct
5	C14	cc	ag	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	ag	ct
6	C15	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	ag	cc
7	C36	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	aa	tt
8	C39	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	ct	tt	ag	ct
9	C51	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	ag	cc
10	C52	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	cc	tt	gg	cc
11	C53	cc	gg	gg	tt	gg	gg	aa	cc	tt	tt	gg	tt	gg	cc	gg	cc	tt	gg	cc	ag	ct	gg	cc	tt	gg	cc
12	C54	cc	aa	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	aa	ct
13	C68	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	cc	tt	gg	cc
14	C69	cc	aa	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	cc	tt	ag	cc
15	C70	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	aa	tt
16	C71	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	ct	tt	aa	tt
17	C73	cc	gg	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	cc	tt	gg	cc
18	C74	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	ct	gg	cc	tt	gg	cc
19	C75	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	ct	tt	aa	tt
20	C76	cc	ga	aa	tt	gg	gg	aa	cc	cc	tt	gg	cc	gg	cc	gg	cc	cc	gg	cc	aa	cc	gg	cc	tt	aa	tt

Załącznik 7. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny otrzymane w oparciu o sondy typu TaqMan dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Lp.	Kod pacjenta	rs2026014	rs3829795	rs12568913	rs5005771	rs3818587	rs4399118
1	K72	AA	AG	AG	CC	CT	GG
2	K75	AA	AG	AG	CC	CT	GG
3	K77	AA	AG	AG	CC	TT	GG
4	K81	AA	GG	AG	CC	TT	GG
5	K82	AA	GG	AG	CC	TT	GG
6	K83	AA	AG	AG	CC	CT	GG
7	K84	AA	AG	AG	CC	TT	GG
8	K85	AA	GG	AG	CC	TT	GG
9	K89	AA	GG	AG	CC	TT	GG
10	K94	AA	AG	AG	CC	TT	GG
11	K96	AA	GG	AG	CC	TT	GG
12	K98	AA	AG	AG	CC	TT	GG
13	K100	AA	GG	AG	CC	TT	GG
14	K102	AA	AG	AG	CC	TT	GG
15	K103	AA	AG	AG	CC	TT	GG
16	K104	AA	GG	AG	CC	TT	GG
17	K106	AA	GG	AG	CC	TT	GG
18	K107	AA	AG	AG	CC	CT	GG
19	K108	AA	AG	AG	CC	TT	GG
20	K110	AA	AG	AG	CC	TT	GG
21	K111	AA	AG	AG	CC	CT	GG
22	K115	AA	GG	AG	CC	TT	GG
23	K119	AA	GG	AG	CC	TT	GG
24	K122	AA	AG	AG	CC	CT	GG
25	K123	AA	AG	AG	CC	CT	GG
26	K126	AA	GG	AG	CC	TT	GG
27	K128	AA	GG	AG	CC	CT	GG
28	K131	AA	AG	AG	CC	TT	GG
29	K132	AA	GG	AG	CC	CT	GG
30	K134	AA	AG	AG	CC	CT	GG
31	K139	AA	GG	AG	CC	TT	GG
32	K147	AA	GG	AG	CC	TT	GG
33	K162	AA	AG	AG	CC	TT	GG

Załącznik 8. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny otrzymane w oparciu o sondy typu TaqMan dla osób zdrowych.

Lp.	Kod pacjenta	rs2026014	rs3829795	rs12568913	rs5005771	rs3818587	rs4399118	Lp.	Kod pacjenta	rs2026014	rs3829795	rs12568913	rs5005771	rs3818587	rs4399118
1	C1	AA	GG	AG	CC	TT	GG	47	C47	AA	GG	AG	CC	TT	GG
2	C2	AA	AG	AG	CC	TT	GG	48	C48	AA	GG	AG	CC	TT	GG
3	C3	AA	GG	AG	CC	TT	GG	49	C49	AA	AG	AG	CC	TT	GG
4	C4	AA	AG	AG	CC	TT	GG	50	C50	AA	AG	AG	CC	TT	GG
5	C5	AA	AG	AG	CC	TT	GG	51	C51	AA	GG	AG	CC	TT	GG
6	C6	AA	AG	AG	CC		GG	52	C52	AA	GG	AG	CC	TT	GG
7	C7	AA	GG	AG	CC	TT	GG	53	C53	AA	AG	AG	CC	TT	GG
8	C8	AA	AG	AG	CC	CT	GG	54	C54	AA	AG	AG	CC	CT	GG
9	C9	AA	AG	AG	CC	CT	GG	55	C55	AA	GG	AG	CC	TT	GG
10	C10	AA	GG	AG	CC	TT	GG	56	C56	AA	AG	AG	CC	TT	GG
11	C11	AA	AG	AG	CC	TT	GG	57	C57	AA	GG	AG	CC	TT	GG
12	C12	AA	AG	AG	CC	TT	GG	58	C58	AA	GG	AG	CC	TT	GG
13	C13	AA	AG	AG	CC	TT	GG	59	C59	AA	AG	AG	CC	TT	GG
14	C14	AA	AG	AG	CC	TT	GG	60	C60	AA	GG	AG	CC	TT	GG
15	C15	AA	AG	AG	CC	TT	GG	61	C61	AA	GG	AG	CC	TT	GG
16	C16	AA	AG	AG	CC	TT	GG	62	C62	AA	GG	AG	CC	TT	GG
17	C17	AA	AG	AG	CC	TT	GG	63	C63	AA	AG	AG	CC	TT	GG
18	C18	AA	GG	AG	CC	TT	GG	64	C64	AA	AG	AG	CC	CT	GG
19	C19	AA	GG	AG	CC	TT	GG	65	C65	AA	AG	AG	CC	TT	GG
20	C20	AA	AG	AG	CC	TT	GG	66	C66	AA	AG	AG	CC	TT	GG
21	C21	AA	AG	AG	CC	TT	GG	67	C67	AA	GG	AG	CC	TT	GG
22	C22	AA	AG	AG	CC	TT	GG	68	C68	AA	GG	AG	CC	TT	GG
23	C23	AA	GG	AG	CC	TT	GG	69	C69	AA	AG	AG	CC	TT	GG
24	C24	AA	GG	AG	CC	CT	GG	70	C70	AA	GG	AG	CC	TT	GG
25	C25	AA	AG	AG	CC	CT	GG	71	C71	AA	AG	AG	CC	TT	GG
26	C26	AA	GG	AG	CC	TT	GG	72	C72	AA	AG	AG	CC	CT	GG
27	C27	AA	GG	AG	CC	TT	GG	73	C73	AA	GG	AG	CC	TT	GG
28	C28	AA	AG	AG	CC	TT	GG	74	C74	AA	AG	AG	CC	CT	GG
29	C29	AA	AG	AG	CC	TT	GG	75	C75	AA	AG	AG	CC	CT	GG
30	C30	AA	AG	AG	CC	TT	GG	76	C76	AA	AG	AG	CC	CT	GG
31	C31	AA	AG	AG	CC	TT	GG	77	C77	AA	GG	AG	CC	TT	GG
32	C32	AA	GG	AG	CC	TT	GG	78	C78	AA	AG	AG	CC	TT	GG
33	C33	AA	GG	AG	CC	TT	GG	79	C79	AA	GG	AG	CC	TT	GG
34	C34	AA	GG	AG	CC	TT	GG	80	C80	AA	GG	AG	CC	TT	GG
35	C35	AA	GG	AG	CC	TT	GG	81	C81	AA	AG	AG	CC	CT	GG
36	C36	AA	AG	AG	CC	TT	GG	82	C82	AA	AG	AG	CC	TT	GG
37	C37	AA	AG	AG	CC	TT	GG	83	C83	AA	AG	AG	CC	CT	GG
38	C38	AA	GG	AG	CC	TT	GG	84	C84	AA	AG	AG	CC	TT	GG
39	C39	AA	GG	AG	CC	TT	GG	85	C85	AA	AG	AG	CC	TT	GG
40	C40	AA	AG	AG	CC	TT	GG	86	C86	AA	AG	AG	CC	TT	GG
41	C41	AA	AG	AG	CC	TT	GG	87	C87	AA	GG	AG	CC	TT	GG
42	C42	AA	GG	AG	CC	TT	GG	88	C88	AA	AG	AG	CC	CT	GG
43	C43	AA	AG	AG	CC	TT	GG	89	C89	AA	AG	AG	CC	TT	GG
44	C44	AA	GG	AG	CC	TT	GG	90	C90	AA	GG	AG	CC	TT	GG
45	C45	AA	GG	AG	CC	TT	GG	91	C91	AA	GG	AG	CC	CT	GG
46	C46	AA	GG	AG	CC	TT	GG								

Załącznik 9. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Lp.	Kod pacjenta	rs12748598	rs3738423	rs12240233	rs6687787	rs12401711	rs16854341	rs12401708	rs12568913	rs11808359	rs5005771	rs1410592	rs3818587	rs4399118	rs1410591
1	K72	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	GA	CC	GG
2	K75	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	GA	CC	GG
3	K82	TT	CC	TT	AA	TT	TT	TT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
4	K84	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
5	K94	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
6	K98	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
7	K100	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
8	K102	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
9	K103	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
10	K107	TT	CT	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CC	GA	CC	GG
11	K108	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CC
12	K109	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CC	GA	CC	GG
13	K111	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	TT	GA	CC	GG
14	K115	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	GA	GG	TT	AA	CC	CG
15	K119	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
16	K123	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CC	AA	CC	GG
17	K126	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CC
18	K128	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
19	K132	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CC	CC	AA	GG	TT	AA	CC	GG
20	K134	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CG
21	K139	TT	CC	TT	AA	TT	TT	TT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
22	K162	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG

Załącznik 10. Genotypy polimorfizmów SNP w genie podocyny dla osób zdrowych.

Lp.	Kod pacjenta	rs12748598	rs3738423	rs12240233	rs6687787	rs12401711	rs16854341	rs12401708	rs12568913	rs11808359	rs5005771	rs1410592	rs3818587	rs4399118	rs1410591
1	C8	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AG	CC	CG
2	C11	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
3	C12	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AG	GG	CT	AA	CC	CG
4	C13	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
5	C14	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
6	C15	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
7	C36	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AG	GG	CT	AA	CC	CG
8	C39	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
9	C51	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
10	C52	TT	CC	TT	AA	TT	TT	TT	CC	AG	GG	TT	AA	CC	CC
11	C53	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AG	GG	TT	AA	CC	CC
12	C54	TT	CT	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AG	CC	CG
13	C68	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
14	C69	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
15	C70	TT	CC	TT	AA	TT	TT	TT	CC	AG	GG	TT	AA	CC	CC
16	C71	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
17	C73	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AG	GG	TT	AA	CC	CC
18	C74	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CC	AG	CC	GG
19	C75	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AG	GG	CT	AG	CC	CG
20	C76	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AG	GG	CT	AG	CC	CG
21	C77	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	GG	GG	TT	AA	CC	CC
22	C78	TT	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
23	C79	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
24	C80	TT	CC	TT	AA	TT	TT	TT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
25	C81	TT	CT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	AA	GG	CC	AG	CC	GG
26	C83	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
27	C84	TT	CT	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AG	CC	GG
28	C85	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG
29	C86	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	TT	AA	CC	CC
30	C87	TT	CC	TT	AA	CT	TT	CT	CC	AA	GG	CT	AA	CC	CG

Załącznik 11. Genotypy polimorfizmów SNP w genie WT1 dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

Lp.	Kod pacjenta	rs2234583	rs9332973	rs9332974	rs2234584	rs5030168	rs2295081	rs61889223	rs5030208	rs2234590	rs17855567	rs5030274	rs16754	rs2234592	rs2234593	rs28942089	rs28941777	rs28941779	rs28941778	rs1799937	rs2234594	rs5030315
1	K94	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
2	K100	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
3	K103	ct	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	ca	cc	tt	tt	gg	ct	gg	ag
4	K115	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
5	K119	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
6	K123	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
7	K128	ct	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	ag	cc	ca	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
8	K132	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
9	K147	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
10	K131	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
11	K107	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
12	K139	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
13	K72	cc	gg	cc	cc	gg	gg	aa	cc	aa	aa	tt	gg	cc	cc	cc	tt	tt	gg	cc	gg	aa
14	K111	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa

. Załącznik 12. Genotypy polimorfizmów SNP w genie WT1 dla osób zdrowych.

Lp.	Kod pacjent	rs2234583	rs9332973	rs9332974	rs2234584	rs5030168	rs2295081	rs61889223	rs5030208	rs2234590	rs17855567	rs5030274	rs16754	rs2234592	rs2234593	rs28942089	rs28941777	rs28941779	rs28941778	rs1799937	rs2234594	rs5030315
1	C8	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
2	C11	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
3	C12	ct	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
4	C13	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
5	C14	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
6	C15	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	ag	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
7	C36	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
8	C39	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
9	C51	cc	gg	cc	cc	gg	gg	aa	cc	aa	aa	tt	ag	cc	ca	cc	tt	tt	gg	cc	gg	ag
10	C52	ct	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	ca	cc	tt	tt	gg	ct	gg	ag
11	C53	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
12	C54	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
13	C68	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
14	C69	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
15	C70	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	ca	cc	tt	tt	gg	ct	gg	ag
16	C71	cc	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
17	C73	ct	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
18	C74	ct	gg	cc	cc	gg	aa	aa	cc	aa	aa	tt	aa	cc	cc	cc	tt	tt	gg	tt	gg	aa
19	C75	cc	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	ag	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa
20	C76	ct	gg	cc	cc	gg	ag	aa	cc	aa	aa	tt	ag	cc	cc	cc	tt	tt	gg	ct	gg	aa

Załącznik 13. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla pacjentów z NS

L1	L2	D'	LOD	R2	Cllow	Clhi	DIST	T-int
rs731934	rs2071327	1	2,9	0,53	0,51	1	360	5,55
rs731934	g.25440C>T	0,67	0,92	0,2	0,15	0,91	546	-
rs731934	rs466452	1	1,06	0,13	0,17	0,99	599	-
rs731934	rs4806213	1	0,19	0,02	0,05	0,97	691	-
rs731934	rs33950747	1	0,48	0,08	0,08	0,98	17337	-
rs731934	rs34982899	1	0,18	0,08	0,05	0,97	18277	-
rs731934	rs3814995	0,17	0,11	0,03	0,01	0,55	20302	-
rs731934	g.25440C>T	1	1,16	0,24	0,19	0,99	186	5,46
rs731934	rs466452	1	1,16	0,24	0,19	0,99	239	-
rs731934	rs4806213	0	0	0	0,04	0,97	331	-
rs731934	rs33950747	1	0,31	0,04	0,06	0,98	16977	-
rs731934	rs34982899	0	0	0	0,04	0,97	17917	-
rs731934	rs3814995	0,26	0,08	0,03	0,02	0,75	19942	-
g.25440C>T	rs466452	1	0,22	0,06	0,05	0,97	53	5,14
g.25440C>T	rs4806213	1	0,09	0,01	0,04	0,97	145	-
g.25440C>T	rs33950747	1	0,45	0,17	0,08	0,98	16791	-
g.25440C>T	rs34982899	1	0,45	0,17	0,08	0,98	17731	-
g.25440C>T	rs3814995	0,61	0,36	0,2	0,06	0,89	19756	-
rs466452	rs4806213	1	0,45	0,17	0,08	0,98	92	4,22
rs466452	rs33950747	1	0,09	0,01	0,04	0,97	16738	-
rs466452	rs34982899	1	0,09	0,01	0,04	0,97	17678	-
rs466452	rs3814995	0,67	0,89	0,24	0,14	0,91	19703	-
rs4806213	rs33950747	1	0,02	0	0,04	0,97	16646	3,76
rs4806213	rs34982899	1	0,02	0	0,04	0,97	17586	-
rs4806213	rs3814995	1	0,23	0,09	0,05	0,97	19611	-
rs33950747	rs34982899	1	0,02	0	0,04	0,97	940	2,37
rs33950747	rs3814995	1	0,23	0,09	0,05	0,97	2965	-
rs34982899	rs3814995	1	0,16	0,02	0,05	0,97	2025	1,87

Załącznik 14. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla osób zdrowych.

L1	L2	D'	LOD	R2	CI _{low}	CI _{hi}	DIST	T-int
rs731934	rs2071327	1	5,48	0,6	0,7	0,01	360	8,7
rs731934	g.25440C>T	1	1,14	0,17	0,18	1	546	-
rs731934	rs466452	1	1,46	0,17	0,25	0,99	599	-
rs731934	rs4806213	1	0,16	0,04	1	1	691	-
rs731934	rs437168	1	0,46	0,04	0,05	0,97	12509	-
rs731934	rs392702	1	0,46	0,04	0,07	0,98	17153	-
rs731934	rs417786	1	0,46	0,04	0,07	0,98	17475	-
rs731934	rs412175	1	0,46	0,07	0,98	0,98	20193	-
rs731934	rs3814995	0,05	0,01	0	0,07	0,57	20302	-
rs2071327	g.25440C>T	1	0,6	0,1	0,09	0,99	186	8,16
rs2071327	rs466452	1	2,17	0,28	0,4	1	239	-
rs2071327	rs4806213	1	0,37	0,06	0,07	0,98	331	-
rs2071327	rs437168	1	0,67	0,06	0,1	0,99	12149	-
rs2071327	rs392702	1	0,67	0,06	0,1	0,99	16793	-
rs2071327	rs417786	1	0,67	0,06	0,1	0,99	17115	-
rs2071327	rs412175	1	0,67	0,06	0,1	0,99	19833	-
rs2071327	rs3814995	0,04	0	0	0	0,51	19942	-
g.25440C>T	rs466452	1	0,11	0,03	0,04	0,97	53	8,16
g.25440C>T	rs4806213	0,39	0,23	0,07	0,04	0,84	145	-
g.25440C>T	rs437168	1	0,09	0,01	0,04	0,97	11963	-
g.25440C>T	rs392702	1	0,09	0,01	0,04	0,97	16607	-
g.25440C>T	rs417786	1	0,09	0,01	0,04	0,97	16929	-
g.25440C>T	rs412175	1	0,09	0,01	0,04	0,97	19647	-
g.25440C>T	rs3814995	0,51	0,27	0,06	0,05	0,87	19756	-
rs466452	rs4806213	1	0,89	0,21	0,14	0,99	92	7,37
rs466452	rs437168	0,38	0,21	0,03	0,04	0,85	11910	-
rs466452	rs392702	0,38	0,21	0,03	0,04	0,85	16554	-
rs466452	rs417786	0,38	0,21	0,03	0,04	0,85	16876	-
rs466452	rs412175	0,38	0,21	0,03	0,04	0,85	19594	-
rs466452	rs3814995	0,31	0,23	0,05	0,03	0,69	19703	-
rs4806213	rs437168	0,47	0,84	0,22	0,1	0,82	11818	9,65
rs4806213	rs392702	0,47	0,84	0,22	0,1	0,82	16462	-
rs4806213	rs417786	0,47	0,84	0,22	0,1	0,82	16784	-
rs4806213	rs412175	0,47	0,84	0,22	0,1	0,82	19502	-
rs4806213	rs3814995	0,26	0,06	0,01	0,03	0,83	19611	-
rs437168	rs392702	1	3,45	1	0,45	1	4644	16,69
rs437168	rs417786	1	3,45	1	0,45	1	4966	-
rs437168	rs412175	1	3,45	1	0,45	1	7684	-
rs437168	rs3814995	1	0,35	0,03	0,06	0,98	7793	-
rs392702	rs417786	1	3,45	1	0,45	1	322	17,34
rs392702	rs412175	1	3,45	1	0,45	1	3040	-
rs392702	rs3814995	1	0,35	0,03	0,06	0,98	3149	-
rs417786	rs412175	1	3,45	1	0,45	1	2718	12,74
rs417786	rs3814995	1	0,35	0,03	0,06	0,98	2827	-
rs412175	rs3814995	1	0,35	0,03	0,06	0,98	109	1,46

Załącznik 15. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych, część I

L1	L2	D'	LOD	R2	CI _{low}	CI _{hi}	DIST	T-int
rs731934	rs2071327	1	8,38	0,57	0,79	1	360	13,38
rs731934	g.25440C>T	0,79	1,74	0,16	0,29	0,94	546	-
rs731934	rs466452	1	2,5	0,15	0,45	1	599	-
rs731934	rs4806213	1	0,34	0,03	0,06	0,98	691	-
rs731934	rs437168	1	0,42	0,02	0,07	0,98	12509	-
rs731934	rs392702	1	0,42	0,02	0,07	0,98	17153	-
rs731934	rs33950747	1	0,43	0,03	0,07	0,98	17337	-
rs731934	rs417786	1	0,42	0,02	0,07	0,98	17475	-
rs731934	rs34982899	1	0,13	0,03	0,04	0,97	18277	-
rs731934	rs412175	1	0,42	0,02	0,07	0,98	20193	-
rs731934	rs3814995	0,05	0,02	0	0	0,35	20302	-
rs2071327	g.25440C>T	1	1,68	0,15	0,3	1	186	12,08
rs2071327	rs466452	1	3,33	0,26	0,56	1	239	-
rs2071327	rs4806213	1	0,37	0,05	0,07	0,98	331	-
rs2071327	rs437168	1	0,64	0,03	0,1	0,99	12149	-
rs2071327	rs392702	1	0,64	0,03	0,1	0,99	16793	-
rs2071327	rs33950747	1	0,29	0,01	0,06	0,98	16977	-
rs2071327	rs417786	1	0,64	0,03	0,1	0,99	17115	-
rs2071327	rs34982899	1	0,02	0,02	0,04	0,97	17917	-
rs2071327	rs412175	1	0,64	0,03	0,1	0,99	19833	-
rs2071327	rs3814995	0,1	0,04	0,01	0,01	0,48	19942	-
g.25440C>T	rs466452	1	0,33	0,04	0,06	0,98	53	10,57
g.25440C>T	rs4806213	0,09	0,01	0	0,01	0,69	145	-
g.25440C>T	rs437168	1	0,13	0,01	0,04	0,97	11963	-
g.25440C>T	rs392702	1	0,13	0,01	0,04	0,97	16607	-
g.25440C>T	rs33950747	1	0,59	0,1	0,09	0,98	16791	-
g.25440C>T	rs417786	1	0,13	0,01	0,04	0,97	16929	-
g.25440C>T	rs34982899	1	0,59	0,1	0,09	0,98	17731	-
g.25440C>T	rs412175	1	0,13	0,01	0,04	0,97	19647	-
g.25440C>T	rs3814995	0,54	0,55	0,1	0,08	0,83	19756	-
rs466452	rs4806213	1	1,35	0,19	0,23	1	92	7,68
rs466452	rs437168	0,38	0,21	0,02	0,04	0,85	11910	-
rs466452	rs392702	0,38	0,21	0,02	0,04	0,85	16554	-
rs466452	rs33950747	1	0,1	0	0,04	0,97	16738	-
rs466452	rs417786	0,38	0,21	0,02	0,04	0,85	16876	-

Załącznik 15. Wartości wyrażające LD w genie nefryny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych, część II

L1	L2	D'	LOD	R2	CIlow	CIhi	DIST	T-int
rs466452	rs34982899	1	0,1	0	0,04	0,97	17678	-
rs466452	rs412175	0,38	0,21	0,02	0,04	0,85	19594	-
rs466452	rs3814995	0,46	0,94	0,11	0,11	0,73	19703	-
rs4806213	rs437168	0,48	0,83	0,15	0,1	0,85	11818	8,98
rs4806213	rs392702	0,48	0,83	0,15	0,1	0,85	16462	-
rs4806213	rs33950747	1	0,02	0	0,04	0,97	16646	-
rs4806213	rs417786	0,48	0,83	0,15	0,1	0,85	16784	-
rs4806213	rs34982899	1	0,02	0	0,04	0,97	17586	-
rs4806213	rs412175	0,48	0,83	0,15	0,1	0,85	19502	-
rs4806213	rs3814995	0,4	0,15	0,02	0,04	0,85	19611	-
rs437168	rs392702	1	3,89	1	0,46	1	4644	18,85
rs437168	rs33950747	1	0,01	0	0,04	0,97	4828	-
rs437168	rs417786	1	3,89	1	0,46	1	4966	-
rs437168	rs34982899	1	0,01	0	0,04	0,97	5768	-
rs437168	rs412175	1	3,89	1	0,46	1	7684	-
rs437168	rs3814995	1	0,34	0,02	0,06	0,98	7793	-
rs392702	rs33950747	1	0,01	0	0,04	0,97	184	21,68
rs392702	rs417786	1	3,89	1	0,46	1	322	-
rs392702	rs34982899	1	0,01	0	0,04	0,97	1124	-
rs392702	rs412175	1	3,89	1	0,46	1	3040	-
rs392702	rs3814995	1	0,34	0,02	0,06	0,98	3149	-
rs33950747	rs417786	1	0,01	0	0,04	0,97	138	19,78
rs33950747	rs34982899	1	0,01	0	0,04	0,96	940	-
rs33950747	rs412175	1	0,01	0	0,04	0,97	2856	-
rs33950747	rs3814995	1	0,2	0,03	0,05	0,97	2965	-
rs417786	rs34982899	1	0,01	0	0,04	0,97	802	13,94
rs417786	rs412175	1	3,89	1	0,46	1	2718	-
rs417786	rs3814995	1	0,34	0,02	0,06	0,98	2827	-
rs34982899	rs412175	1	0,01	0	0,04	0,97	1916	13,08
rs34982899	rs3814995	1	0,17	0,01	0,05	0,97	2025	-
rs412175	rs3814995	1	0,34	0,02	0,06	0,98	109	1,39

Załącznik 16. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

L1	L2	D'	LOD	R ²	Cllow	Clhi	DIST	T-int
rs1410591	rs3818587	1,000	1,640	0,128	0,290	1,000	168	6,090
rs1410591	rs1410592	0,696	1,710	0,277	0,270	0,890	252	-
rs1410591	rs11808359	0,000	0,000	0,000	0,040	0,960	1430	-
rs1410591	rs12401708	0,794	1,690	0,237	0,290	0,940	8663	-
rs1410591	rs12401711	0,617	1,050	0,160	0,160	0,860	8688	-
rs1410591	rs3738423	1,000	1,290	0,100	0,210	1,000	13661	-
rs3818587	rs1410592	0,601	0,49	0,08	0,08	0,89	84	10,77
rs3818587	rs11808359	1,000	0,05	0	0,04	0,97	1262	-
rs3818587	rs12401708	1,000	0,44	0,05	0,07	0,98	8495	-
rs3818587	rs12401711	1,000	0,52	0,05	0,08	0,98	8520	-
rs3818587	rs3738423	1,000	3,53	0,78	0,55	1	13493	-
rs1410592	rs11808359	1	0,2	0,01	0,05	0,97	1178	9,59
rs1410592	rs12401708	0,53	0,24	0,06	0,05	0,88	8411	-
rs1410592	rs12401711	0,62	0,42	0,09	0,07	0,89	8436	-
rs1410592	rs3738423	0,43	0,16	0,03	0,04	0,86	13409	-
rs11808359	rs12401708	1	0,14	0,01	0,04	0,97	7233	9,67
rs11808359	rs12401711	1	0,15	0,01	0,05	0,97	7258	-
rs11808359	rs3738423	1	0,04	0	0,04	0,97	12231	-
rs12401708	rs12401711	1	7,26	0,89	0,78	1	25	14,7
rs12401708	rs3738423	1	0,28	0,04	0,06	0,98	4998	-
rs12401711	rs3738423	1	0,34	0,04	0,06	0,98	4973	4,35

Załącznik 17. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla osób zdrowych.

L1	L2	D'	LOD	R2	Cllow	Clhi	DIST	T-int
rs1410591	rs3818587	1	2,21	0,23	0,4	1	168	14,1
rs1410591	rs1410592	1	10,29	0,93	0,85	1	252	-
rs1410591	rs11808359	1	0,78	0,1	0,12	0,99	1430	-
rs1410591	rs12401708	0,45	0,13	0,04	0,04	0,87	8663	-
rs1410591	rs12401711	0,7	0,69	0,11	0,11	0,91	8688	-
rs1410591	rs3738423	1	2,21	0,23	0,4	1	13661	-
rs3818587	rs1410592	1	2,08	0,25	0,38	1	84	24,22
rs3818587	rs11808359	0,14	0	0	0,03	0,96	1262	-
rs3818587	rs12401708	1	0,27	0,04	0,06	0,98	8495	-
rs3818587	rs12401711	1	0,49	0,05	0,08	0,98	8520	-
rs3818587	rs3738423	1	7,28	1	0,77	1	13493	-
rs1410592	rs11808359	1	0,66	0,1	0,1	0,99	1178	16,8
rs1410592	rs12401708	1	0,69	0,16	0,1	0,99	8411	-
rs1410592	rs12401711	1	1,52	0,21	0,26	1	8436	-
rs1410592	rs3738423	1	2,08	0,25	0,38	1	13409	-
rs11808359	rs12401708	1	0,54	0,05	0,08	0,98	7233	15,94
rs11808359	rs12401711	0,22	0,04	0	0,02	0,75	7258	-
rs11808359	rs3738423	0,14	0	0	0,03	0,96	12231	-
rs12401708	rs12401711	1	7,4	0,77	0,78	1	25	21,98
rs12401708	rs3738423	1	0,27	0,04	0,06	0,98	4998	-
rs12401711	rs3738423	1	0,49	0,05	0,08	0,98	4973	10,12

Załącznik 18. Wartości wyrażające LD w genie podocyny dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych.

L1	L2	D'	LOD	R2	CIlow	CIhi	DIST	T-int
rs1410591	rs3818587	1	3,75	0,18	0,59	1	168	17,28
rs1410591	rs1410592	0,9	9,38	0,6	0,72	0,97	252	-
rs1410591	rs11808359	1	1,05	0,08	0,17	0,99	1430	-
rs1410591	rs12401708	0,7	1,45	0,12	0,23	0,89	8663	-
rs1410591	rs12401711	0,65	1,65	0,13	0,24	0,85	8688	-
rs1410591	rs3738423	1	3,3	0,16	0,54	1	13661	-
rs3818587	rs1410592	0,83	2,13	0,16	0,36	0,95	84	31,14
rs3818587	rs11808359	0,36	0,02	0	0,04	0,96	1262	-
rs3818587	rs12401708	1	0,71	0,04	0,11	0,99	8495	-
rs3818587	rs12401711	1	1,01	0,05	0,16	0,99	8520	-
rs3818587	rs3738423	1	10,44	0,91	0,81	1	13493	-
rs1410592	rs11808359	1	0,83	0,06	0,13	0,99	1178	24,39
rs1410592	rs12401708	0,72	0,68	0,1	0,11	0,92	8411	-
rs1410592	rs12401711	0,82	1,6	0,15	0,29	0,95	8436	-
rs1410592	rs3738423	0,8	1,65	0,14	0,29	0,94	13409	-
rs11808359	rs12401708	1	0,72	0,04	0,11	0,99	7233	23,31
rs11808359	rs12401711	0,31	0,1	0	0,03	0,77	7258	-
rs11808359	rs3738423	0,14	0	0	0,03	0,96	12231	-
rs12401708	rs12401711	1	14,56	0,82	0,87	1	25	34,87
rs12401708	rs3738423	1	0,56	0,04	0,09	0,98	4998	-
rs12401711	rs3738423	1	0,83	0,05	0,13	0,99	4973	13,48

Załącznik 19. Wartości wyrażające LD w genie WT1 dla pacjentów z zespołem nerczycowym.

L1	L2	D'	LOD	R2	Cllow	Clhi	DIST	T-int
rs5030315	rs1799937	1	0,4	0,14	0,07	0,98	258	2,72
rs5030315	rs2234593	1	0,97	0,48	0,15	0,99	3817	-
rs5030315	rs16754	1	0,05	0	0,04	0,97	7429	-
rs5030315	rs2295081	1	0,33	0,11	0,06	0,98	28522	-
rs5030315	rs2234583	1	0,97	0,48	0,15	0,99	45782	-
rs1799937	rs2234593	1	0,87	0,28	0,13	0,99	3559	9,96
rs1799937	rs16754	2,03	0,44	0,34	1	0,99	7171	-
rs1799937	rs2295081	1	3,87	0,82	0,61	1	28264	-
rs1799937	rs2234583	1	0,87	0,28	0,13	0,99	45524	-
rs2234593	rs16754	0,39	0,21	0,1	0,04	0,83	3612	11,57
rs2234593	rs2295081	1	0,71	0,23	0,11	0,99	24705	-
rs2234593	rs2234583	1	2,53	1	0,42	1	41965	-
rs16754	rs2295081	1	1,76	0,36	0,3	1	21093	11,25
rs16754	rs2234583	0,39	0,21	0,1	0,04	0,83	38353	-
rs2295081	rs2234583	1	0,71	0,23	0,11	0,99	17260	5,29

Załącznik 20. Wartości wyrażające LD w genie WT1 dla osób zdrowych.

L1	L2	D'	LOD	R2	Cllow	Clhi	DIST	T-int
rs5030315	rs1799937	1	1,37	0,24	0,23	1	258	6,57
rs5030315	rs2234593	1	3,72	1	0,56	1	3817	-
rs5030315	rs16754	0,18	0,08	0,02	0,02	0,68	7429	-
rs5030315	rs2295081	1	1,37	0,24	0,23	1	28522	-
rs5030315	rs2234583	0,12	0,03	0,01	0,01	0,68	45782	-
rs1799937	rs2234593	1	1,37	0,24	0,23	1	3559	15,82
rs1799937	rs16754	1,82	0,33	0,32	1	1	7171	-
rs1799937	rs2295081	1	7,36	1	0,8	1	28264	-
rs1799937	rs2234583	0,25	0,07	0,03	0,02	0,74	45524	-
rs2234593	rs16754	0,18	0,08	0,02	0,02	0,68	3612	12,21
rs2234593	rs2295081	1	1,37	0,24	0,23	1	24705	-
rs2234593	rs2234583	0,12	0,03	0,01	0,01	0,68	41965	-
rs16754	rs2295081	1	1,82	0,33	0,32	1	21093	12,05
rs16754	rs2234583	0	0	0	0,03	0,96	38353	-
rs2295081	rs2234583	0,25	0,07	0,03	0,02	0,74	17260	0,2

Załącznik 21. Wartości wyrażające LD w genie WT1 dla pacjentów z zespołem nerczycowym i osób zdrowych.

L1	L2	D'	LOD	R2	Cllow	Cihi	DIST	T-int
rs5030315	rs1799937	1	1,8	0,2	0,31	1	258	8,25
rs5030315	rs2234593	1	4,32	0,79	0,57	1	3817	-
rs5030315	rs16754	0,06	0,01	0	0,01	0,58	7429	-
rs5030315	rs2295081	1	1,68	0,19	0,29	1	28522	-
rs5030315	rs2234583	0,39	0,44	0,08	0,06	0,76	45782	-
rs1799937	rs2234593	1	2,24	0,26	0,4	1	3559	23,87
rs1799937	rs16754	1	3,82	0,37	0,57	1	7171	-
rs1799937	rs2295081	1	10,85	0,92	0,84	1	28264	-
rs1799937	rs2234583	0,51	0,51	0,1	0,07	0,82	45524	-
rs2234593	rs16754	0,26	0,26	0,05	0,03	0,65	3612	20,67
rs2234593	rs2295081	1	2,08	0,24	0,37	1	24705	-
rs2234593	rs2234583	0,52	1,02	0,19	0,13	0,81	41965	-
rs16754	rs2295081	1	3,58	0,34	0,55	1	21093	20,23
rs16754	rs2234583	0,12	0,07	0,01	0,01	0,47	38353	-
rs2295081	rs2234583	0,48	0,4	0,08	0,06	0,81	17260	2,44