



## ARTÍCULO ORIGINAL

# Identificación de variantes del gen NPHS2 en niños con síndrome nefrótico corticorresistente



Marta Azocar<sup>a,\*</sup>, Álvaro Vega<sup>b</sup>, Mauricio Farfán<sup>c</sup> y Francisco Cano<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Nefrología, Servicio de Pediatría, Hospital Luis Calvo Mackenna, Departamento Pediatría y Cirugía Infantil Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>b</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Médicas asociado a Especialidad Clínica (Pediatría), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Hospital Luis Calvo Mackenna, Santiago, Chile

<sup>c</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Luis Calvo Mackenna, Departamento de Pediatría Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Recibido el 16 de mayo de 2015; aceptado el 15 de junio de 2015

Disponible en Internet el 9 de octubre de 2015

### PALABRAS CLAVE

Síndrome nefrótico;  
Corticorresistencia;  
Podocina;  
NPHS2;  
Diafragma de  
filtración glomerular

**Resumen** La podocina es una proteína localizada en el diafragma de filtración glomerular donde participa en la regulación de la filtración glomerular. Las mutaciones del gen NPHS2, que codifica a la podocina, son la principal causa de síndrome nefrótico corticorresistente (SNCR) autosómico recesivo en niños.

**Objetivos:** Identificar mutaciones de NPHS2 en niños chilenos con SNCR, y establecer la prevalencia de las variantes más frecuentes en un grupo de adultos sanos.

**Pacientes y método:** Análisis mutacional de NPHS2 en 34 niños chilenos con SNCR. Una vez identificadas las dos variantes de NPHS2 de mayor frecuencia, se realizó un screening de estas mutaciones en 223 adultos sanos. El análisis mutacional se realizó por secuenciación directa de los ocho exones codificantes amplificados por reacción de polimerasa en cadena. La secuenciación del DNA se realizó mediante método fluorométrico y las secuencias fueron evaluadas con el software SeqPilot. La asociación entre la presencia de variantes de NPHS2 y SNCR se calculó comparando las frecuencias alélicas entre los pacientes con SNCR y los voluntarios sanos utilizando prueba exacta de Fisher. Se consideró significativo  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Se detectaron mutaciones patogénicas de NPHS2 en siete de los 34 pacientes (21%) estudiados, de los cuales seis resultaron heterocigotos para p.R229Q y p.A284V. En voluntarios sanos la prevalencia de p.R229Q fue de 2,46%.

**Conclusiones:** Este estudio muestra que p.R229Q y p.A284V son las variantes de NPHS2 más frecuentes en niños chilenos con SNCR. Por primera vez se describe esta asociación en niños chilenos, en base a la cual es posible proponer una estrategia de screening para estudio genético

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [maazocar@med.uchile.cl](mailto:maazocar@med.uchile.cl) (M. Azocar).

**KEYWORDS**

Nephrotic syndrome;  
Steroid-resistant;  
Podocin;  
NPHS2;  
Glomerular slit  
diaphragm

en pacientes con SNCR y sus familias. Se propone una estrategia de búsqueda de p.R229Q y p.A284V en forma paralela o secuencial en estos pacientes.

© 2015 Sociedad Chilena de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**NPHS2 Mutation analysis study in children with steroid-resistant nephrotic syndrome**

**Abstract** Podocin is a protein located in the glomerular slit diaphragm where it takes part in the regulation of glomerular filtration. Mutations of the NPHS2 gene that codes podocin are the main cause of autosomal recessive steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS).

**Objectives:** To identify the NPHS2 mutations in Chilean children with SRNS, and to determine the prevalence of the most common variants in a group of healthy adults.

**Patients and methods:** Mutation analysis of NPHS2 in 34 Chilean children with SRNS. Once the two most common variants of NPHS2 were identified, screening for these mutations was performed on 233 healthy adults. The mutation analysis was performed by the direct sequencing of the eight coding exons by polymerase chain reaction amplification. The DNA sequencing was performed using a fluorometric method, and then evaluated with SeqPilot™ software. The relationship between the presence of NPHS2 variants and SRNS was calculated by comparing the allele frequency between patients with SRNS and those of the healthy volunteers using the exact Fisher test. A  $P < .05$  was considered significant.

**Results:** Pathogenic NPHS2 mutations were detected in 7 (21%) of the 34 patients studied, of which 6 were heterozygotes for p.R229Q and p.A284V. The presence of p.R229Q was 2.46% in the healthy volunteers.

**Conclusions:** This study shows that p.R229Q and p.A284V are the most frequent variants in Chilean children with SRNS. It is the first time that this relationship has been reported in Chilean children. Based on this, a screening strategy is proposed for the genetic study in patients with SRNS and their families. A parallel or sequential search strategy for p.R229Q and p.A284V in these patients is proposed.

© 2015 Sociedad Chilena de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introducción**

El síndrome nefrótico (SN) se define como la asociación de proteinuria ( $>40 \text{ mg/m}^2/\text{h}$ ), hipoalbuminemia ( $<2,5 \text{ mg/dl}$ ) y la presencia de edema. La hiperlipidemia anteriormente se consideraba criterio diagnóstico, pero esta es secundaria a la hipoalbuminemia<sup>1</sup>. La incidencia anual de SN idiopático en niños en Estados Unidos y Europa se ha estimado en 1-3 por 100.000 niños, con una prevalencia acumulada de 16 por 100.000 niños. En base a la respuesta a la terapia corticoesteroidal, se ha dividido en dos categorías, los que responden a la terapia corticoide: SN córticosensible, que incluye el SN corticodependiente y el SN recaedor frecuente y SN recaedor infrecuente; y los que no responden al tratamiento con corticoides: corticorresistente (SNCR)<sup>1,2</sup>. Aproximadamente 10-20% de los niños con SN idiopático no logran remisión con el tratamiento con corticoides<sup>2</sup>. Mientras que la mayoría de los casos con SNCS muestra en la biopsia renal enfermedad de cambios mínimos (ECM), los casos de SNCR presentan principalmente glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) o esclerosis mesangial difusa<sup>3,4</sup>. El SNCR representa una entidad clínica desafiante para el nefrólogo infantil, dado que el 50% de los niños progresan a la enfermedad renal terminal dentro de los 15 años<sup>5</sup>.

En los últimos años se han identificado mutaciones en genes que codifican proteínas del podocito en varias formas de SNCR<sup>3</sup>. Dentro de estos, mutaciones del gen *NPHS2*, que codifica la proteína podocina, representa la causa más frecuente de SNCR autosómico recesivo en niños<sup>4</sup>. La podocina es una proteína localizada en el diafragma de filtración glomerular, donde participa en la organización estructural y en la regulación de la filtración glomerular<sup>4</sup>. Por medio del clonamiento posicional, Boute<sup>1</sup> logró encontrar una nueva proteína específica del podocito, la podocina, codificada por *NPHS2* en el cromosoma 1q25-31 y que se asociaba con formas autosómicas recesivas de SNCR. La podocina es una proteína de membrana del podocito de 383 aminoácidos, tiene una estructura similar a una horquilla y se expresa exclusivamente en el diafragma de filtración glomerular. Después de la descripción inicial de *NPHS2*, se han identificado numerosas variantes del gen en diversos grupos raciales y étnicos de pacientes con SNCR, incluidas más de 30 mutaciones patogénicas y algunos polimorfismos<sup>6</sup>. Podocina es la responsable de la mayoría de los SNCR infantiles, el 42% corresponden a formas familiares y 10% de los casos esporádicos; también cabe destacar que se ha encontrado en el 39% de los pacientes con síndrome nefrótico congénito.

Los escasos estudios de mutaciones de *NPHS2* realizados en individuos chilenos con SNCR<sup>7-9</sup> muestran exclusivamente

**Tabla 1** Partidores utilizados para el análisis mutacional de *NPHS2*

Exón	Partidor <i>forward</i> (5'- 3')	Partidor <i>reverse</i> (3'- 5')
1	GCAGCGSCTCCACAGGGACT	TCAGTGGGTCTCGTGGGGAT
2	AGGCAGTGAATACAGTGAAG	GGCCTCAGGAAATTACCTA
3	TTCTGGGAGTGATTTGAAAG	TGAAGAAATTGGCAAGTCAG
4	AAGGTGAAACCCAAACAGC	CGGTAGGTAGACCATGGAAA
5	CATAGGAAAGGAGCCCAAGA	TTCAGGCATATTGGCCATTA
6	CTCCCACTGACATCTGA	AATTTAAATGAAACCAGAA
7	CTAAATCAATGGCTGCACCACC	TTCCTAAAGGGCAGTCTGG
8	GGTGAAGCCTTCAGGGAATG	TTCTATGGCAGGCCCTTTA

Fuente: Boute et al.<sup>11</sup>

pacientes heterocigotos para el polimorfismo p.R229Q y la mutación p.A284V, similar a lo reportado en población española<sup>10</sup>. Los estudios existentes corresponden principalmente a reportes de casos, tanto adultos como niños. No existen estudios diseñados para conocer las variantes de *NPHS2* y su frecuencia en niños chilenos con SNCR ni en un grupo de voluntarios sanos.

Los objetivos de este estudio son identificar mutaciones de *NPHS2* en niños chilenos con SNCR, y establecer la prevalencia de las variantes más frecuentes en un grupo de adultos sanos de la población general.

## Pacientes y método

Estudio descriptivo de corte transversal. Criterios de inclusión: pacientes en control en la Unidad de Nefrología del Hospital Luis Calvo Mackenna entre los años 2009 y 2011, con el diagnóstico de SNCR, que hayan firmado el consentimiento informado y/o asentimiento. Criterios de exclusión: pacientes en que se logró la remisión del cuadro con el uso de terapia inmunosupresora, pacientes con SN de causa secundaria y recurrencia postrasplante. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Luis Calvo Mackenna.

Se realizó análisis mutacional de *NPHS2* en 34 niños con diagnóstico de SNCR, se obtuvo DNA genómico desde sangre periférica utilizando un método estándar (QIAamp DNA Mini and Blood Mini, Qiagen) según protocolo del fabricante. Se realizó análisis mutacional de *NPHS2* mediante secuenciación directa de los ocho exones codificantes amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando partidores de acompañamiento intrónico. La secuencia de los partidores se obtuvo de datos publicados previamente (tabla 1)<sup>11</sup>. La secuenciación del DNA se realizó mediante método fluorométrico (Big-Dye Terminator Sequencing Kit; ABI 3700 DNA sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo a protocolo del fabricante, y las secuencias fueron evaluadas con el software SeqPilot (JSI

Medical Systems GmbH Kip penheim, Alemania). Este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Nefrología Infantil de la Universidad de Heidelberg, Alemania.

Se realizó búsqueda de las variantes p.R229Q y p.A284V de *NPHS2* en 223 individuos sanos que acudieron como donantes voluntarios al Banco de Sangre del Hospital Luis Calvo Mackenna durante el año 2011. Se excluyeron aquellos casos que presentaran alguna enfermedad renal o que fueran familiares de los pacientes con SNCR. Se realizó búsqueda de las variantes p.R229Q y p.A284V en los voluntarios sanos, mediante amplificación por PCR del segmento de *NPHS2* utilizando partidores publicados previamente (tabla 2)<sup>12</sup>. Posteriormente se llevó a cabo análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción<sup>13-15</sup> (ensayo PCR-RFLP), mediante digestión de productos de PCR utilizando las enzimas de restricción ClaI y HhaI (New England Biolabs) para p.R229Q y p.A284V respectivamente, según protocolo del fabricante. Los productos de digestión se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

La asociación entre la presencia de variantes de *NPHS2* y SNCR se calculó comparando las frecuencias alélicas entre los pacientes con SNCR y los voluntarios sanos utilizando prueba exacta de Fisher. Se consideró significativo  $p < 0,05$ .

## Resultados

Las características clínicas y epidemiológicas de los 34 pacientes con SNCR estudiados se muestran en la tabla 3. Se detectaron mutaciones patogénicas de *NPHS2* en estado homocigoto o heterocigoto compuesto en siete de los 34 pacientes (21%) estudiados (tabla 4). Se identificaron dos variantes de *NPHS2*, p.R229Q, y p.A284V. Siete niños resultaron heterocigoto compuesto para p.R229Q y p.A284V. La frecuencia alélica de p.R229Q en los pacientes con SNCR fue de 10,29% (7/68 cromosomas) y la de p.A284V de 10,29% (7/68 cromosomas).

**Tabla 2** Partidores utilizados para el screening de las variantes p.R229Q y p.A284V

Variante	Partidor <i>forward</i> (5'- 3')	Partidor <i>reverse</i> (3'- 5')
p.R229Q	AGGATTTACCACAGGATTAAGTTGTG	GGTAGGGAAACCCTCGAGTATCGAT
p.A284V	GCACACTCTGGTCACTCAA	CGTTGAGGAGAGGGAGAGAC

Fuente: Tsukaguchi et al.<sup>12</sup>

**Tabla 3** Características clinicoepidemiológicas de los pacientes con SNCR

Total	34
Hombres	17 (51%)
Edad promedio	11 años
Edad promedio al diagnóstico	2,7 años
<b>Diagnóstico histológico</b>	
GEFS	19 (58%)
ECM	9 (27%)
EGF	2 (6%)
Otras	3 (9%)
<b>Etapa de la enfermedad</b>	
Trasplante renal	12 (36%)
Diálisis	5 (15%)
ERC etapas 3 y 4	16 (49%)

ECM: enfermedad de cambios mínimos; EGF: esclerosis global focal; ERC: enfermedad renal crónica; GEFS: glomérulo-esclerosis focal y segmentaria.

Las características epidemiológicas de los donantes voluntarios se muestran en la [tabla 5](#). Se encontró la variante p.R229Q en 11 de los 223 voluntarios sanos de la población general, todos en estado heterocigoto, lo que significa una frecuencia alélica en este grupo de 2,46% (11/446 cromosomas). Este polimorfismo resultó ser significativamente más frecuente en el grupo de pacientes que en el grupo de individuos sanos (10,29 versus 2,46%), lo que indica una asociación de p.R229Q con SNCR (odds ratio = 4,17;  $P = 0,005$ ). La mutación p.A284V no se encontró en este grupo.

## Discusión

Por primera vez en nuestro país se demuestran las mutaciones asociadas a SNCR en pacientes pediátricos.

Los resultados de este estudio muestran que las mutaciones de *NPHS2* son una causa importante de SNCR en niños chilenos, similar a lo reportado en otras poblaciones<sup>4,16,17</sup>. En nuestro grupo de niños con SNCR, el 21% de los pacientes estudiados presentó una mutación patogénica de *NPHS2* en estado heterocigoto compuesto. Las variantes más frecuentes corresponden al polimorfismo p.R229Q y a la mutación patogénica p.A284V, identificadas en estado heterocigoto compuesto en siete pacientes portadores de SNCR. Esto es

**Tabla 5** Características epidemiológicas de los voluntarios sanos

Total	223
Hombres	105 (47%)
Edad promedio	32,5 años (18-65)

similar a lo reportado previamente en pacientes con SNCR de Chile, Argentina y España<sup>7-10</sup>.

Se han descrito diversas variantes de *NPHS2* en cohortes de pacientes con SNCR y controles sanos de diverso origen étnico. La variante no sinónima reportada más frecuentemente es p.R229Q<sup>6</sup>. En este estudio se encontró una frecuencia alélica para este polimorfismo de 2,46% en el grupo de voluntarios sanos, similar a lo reportado en la literatura<sup>1,9,16,18,19</sup>. La mutación p.A284V no se encontró en ninguno de los 223 voluntarios sanos, lo que coincide con lo descrito previamente en población europea y sudamericana<sup>1,9</sup>, se podría mejorar la representatividad del estudio teniendo controles sanos de todo el país.

Algunos autores han descrito que el suero de pacientes con GEFS aumenta la permeabilidad glomerular a la albúmina al incubar los glomérulos en ella *in vitro*. A diferencia de las formas inmunológicas del SN, estudios recientes muestran que defectos estructurales heredados de la barrera de filtración glomerular son responsables de una gran proporción de casos de SNCR, en la cual el podocito tiene un rol crucial en la patogénesis de la glomerulopatía<sup>10</sup>. Las mutaciones de *NPHS2* fueron descritas inicialmente en SNCR de inicio precoz<sup>11</sup> y estudios sucesivos definieron el fenotipo asociado a mutaciones de este gen, mostrando que los pacientes usualmente desarrollan SN antes de los 6 años de edad, presentan en su mayoría GEFS, no responden a terapia inmunosupresora y presentan menor riesgo de recidiva después del trasplante renal<sup>1,4,20,21</sup>. En forma paralela se describió la variante p.R229Q como un polimorfismo de la podocina frecuente en la población general, e inicialmente no se le atribuyó un efecto patogénico. Sin embargo, en base a estudios *in vitro*<sup>12</sup> y poblacionales<sup>6,9,10,12</sup> se ha propuesto un rol patogénico de p.R229Q describiéndose que los pacientes portadores de esta variante en estado heterocigoto compuesto con una mutación patogénica presentan SNCR de inicio tardío, después de los 18 años de edad. En este estudio reportamos seis pacientes heterocigotos compuestos para p.R229Q y la mutación patogénica p.A284V, todos con GEFS, y que llamativamente comenzaron con SNCR

**Tabla 4** Pacientes con SNCR portadores de mutación en *NPHS2*

Paciente	Género	Mutación	Edad inicio SN (años)	Histología
1	F	p.R229Q(h) + p.P341S(H)	3,4	ECM
2	M	p.R229Q(h) + p.A284V(h)	3,8	GEFS
3	F	p.R229Q(h) + p.A284V(h)	2,5	GEFS
4	F	p.R229Q(h) + p.A284V(h)	12,3	GEFS
5	F	p.R229Q(h) + p.A284V(h)	8,9	GEFS
6	F	p.R229Q(h) + p.A284V(h)	7,1	GEFS
7	M	p.R229Q(h) + p.A284V(h)	13,2	GEFS

ECM: enfermedad de cambios mínimos; F: femenino; GEFS: glomérulo-esclerosis focal y segmentaria; (h): heterocigoto; (H): homocigoto; M: masculino; SN: síndrome nefrótico.

a edades más tempranas que lo descrito en la literatura, lo que abre la interrogante respecto a la existencia de determinantes locales, genéticos o ambientales, responsables de este fenómeno. Por otro lado, los resultados de este estudio muestran que p.R229Q fue significativamente más frecuente entre los pacientes en comparación con el grupo de donantes sanos, lo que es concordante con un rol patogénico de p.R229Q en el desarrollo de SNCR.

El polimorfismo p.R229Q presenta una distribución alélica desigual en las diferentes poblaciones en que se han estudiado, observándose con mayor frecuencia en personas de ascendencia europea<sup>1,16,22</sup>, y menos frecuentemente en descendientes africanos y asiáticos<sup>23-25</sup>. El análisis de haplotipos de este alelo mostró que está presente en un haplotipo frecuente en pacientes con SNCR. Estos datos sugieren que la variante p.R229Q surgió en un ancestro común, posiblemente en Europa, y se propagó posteriormente con la expansión de la población<sup>10,12</sup>. De igual forma, el análisis de haplotipos de la mutación p.A284V mostró que está presente en un haplotipo conservado en pacientes españoles con SNCR<sup>10</sup>. Debido a que p.A284V se ha detectado principalmente en pacientes españoles y de Sudamérica, es probable que la variante haya sido introducida por un colonizador español en la población hispánica<sup>26</sup>. Esto explicaría la alta frecuencia de pacientes portadores de estas dos variantes en este estudio y en estudios previos realizados con pacientes chilenos y argentinos<sup>7-9</sup>.

Además del polimorfismo p.R229Q, en este estudio se detectó una mutación con pérdida de sentido en los pacientes con SNCR, p.A284V. La que ha sido reportada previamente y se reconoce su rol patogénico<sup>9,10,27</sup>.

Este estudio incluyó 34 pacientes, lo cual representa a los pacientes que son derivados al Hospital Luis Calvo Mackenna, una proporción importante del total de pacientes con SNCR en Chile. Con el objetivo de conocer la realidad nacional de mutaciones en niños con SNCR se debería realizar un estudio colaborativo de las unidades de nefrología infantil de nuestro país.

Nuestros hallazgos muestran que en este grupo de niños chilenos con SNCR, las mutaciones de *NPHS2* son una causa importante de la enfermedad. De acuerdo a esto, se podría implementar una estrategia de *screening* para buscar mutaciones de *NPHS2* en pacientes con SNCR y sus familias. A partir de los datos obtenidos en este estudio, proponemos una estrategia consistente en la búsqueda de p.R229Q y p.A284V, en forma paralela, o bien secuencial, comenzando por p.R229Q y en caso de encontrarse presente, continuar con la búsqueda de p.A284V, especialmente en pacientes con ascendencia española. Si p.A284V es negativo, entonces se debería secuenciar el gen completo. El diagnóstico genético significaría un gran avance en lo concerniente al consejo genético en familias con mutaciones de *NPHS2*, puesto que esta información permitiría evitar tratamientos inmunosupresores innecesarios con efectos secundarios indeseados, promover el trasplante renal de donante vivo, menor riesgo de recaída postrasplante renal, y dar la posibilidad de *screening* a los familiares y a las parejas de los pacientes.

Este estudio representa la primera descripción de las variantes de *NPHS2* en un grupo de pacientes chilenos con SNCR < a 18 años de edad, así como también en un grupo de población general chilena en que se han estudiado variantes

del gen *NPHS2*. Estos datos nos permiten conocer la epidemiología local del SNCR, mejorando el enfrentamiento clínico de la enfermedad de forma general, y de forma particular al permitir individualizar la causa de algunos de los pacientes que la presenten y ofrecer alternativas terapéuticas acorde a esta información.

## Financiamiento

Proyecto SOCHIPE 2012006. Proyecto Fondecyt 11090045.

## Conflicto de intereses

Este trabajo cumple con los requisitos sobre consentimiento/asentimiento informado, comité de ética, financiación, estudios animales y sobre la ausencia de conflicto de intereses según corresponda.

## Referencias

- Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, et al. *NPHS2* mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int.* 2004;66:571-9.
- Kim JS, Bellow CA, Silverstein DM, et al. High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2005;68:1275-81.
- Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet.* 2009;18:R185-94.
- Hinkes B, Vlangos C, Heeringa S, et al. Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:365-71.
- Trautmann A, Bodria M, Ozaltin F, et al. Spectrum of steroid resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the podonet registry cohort. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(4):592-600.
- Franceschini N, North KE, Kopp JB, et al. *NPHS2* gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review. *Genet Med.* 2006;8:63-75.
- Pedraza N, Ceballos ML, Cano F. Síndrome nefrótico cortico-resistente secundario a mutación genética, a propósito de 2 casos clínicos. *Rev Chil Pediatr.* 2008;79:398-403.
- Ardiles LG, Carrasco AE, Carpio JD, et al. Late onset of familial nephrotic syndrome associated with a compound heterozygous mutation of the podocin-encoding gene. *Nephrology.* 2005;10:553-6.
- Machuca E, Hummel A, Nevo F, et al. Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the *NPHS2* R229Q variant. *Kidney Int.* 2009;75:727-35.
- Santín S, Tazón-Vega B, Silva I, et al. Clinical value of *NPHS2* analysis in early- and adult-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;2:344-54.
- Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2000;24:349-54.
- Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, et al. *NPHS2* mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest.* 2002;110:1659-66.
- Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, et al. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet.* 2001;10:591-7.

14. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947–8.
15. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974;185:862–4.
16. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, et al. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:722–32.
17. Karle SM, Uetz B, Ronner V, et al. Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:388–93.
18. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, et al. NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int*. 2004;65:1026–30.
19. Köttgen A, Hsu CC, Coresh J, et al. The association of podocin R229Q polymorphism with increased albuminuria or reduced estimated GFR in a large population-based sample of US adults. *Am J Kidney Dis*. 2008;52:868–75.
20. Caridi G, Bertelli R, Carrea A, et al. Prevalence, genetics, and clinical features of patients carrying podocin mutations in steroid-resistant nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2742–6.
21. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, et al. 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:e907–19.
22. Caridi G, Bertelli R, Di DM, et al. Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1278–86.
23. Dusel JA, Burdon KP, Hicks PJ, et al. Identification of podocin (NPHS2) gene mutations in African Americans with nondiabetic endstage renal disease. *Kidney Int*. 2005;68:256–62.
24. Maruyama K, Iijima K, Ikeda M, et al. NPHS2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatr Nephrol*. 2003;18:412–6.
25. Yu Z, Ding J, Huang J, et al. Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:902–8.
26. Hildebrandt F, Heeringa SF. Specific podocin mutations determine age of onset of nephrotic syndrome all the way into adult life. *Kidney Int*. 2009;75:669–71.
27. Tonna SJ, Needham A, Polu K, Uscinski A, Appel GB, Falk RJ, et al. NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC Nephrol*. 2008;9:13.