Molekularne podłoże dziedzicznych nefropatii u psów rasy spaniel

MAŁGORZATA WASIELEWSKA, IWONA SZATKOWSKA,
EWA CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, DANIEL ZABORSKI*

Zakład Cytogenetyki Molekularnej, *Zakład Biostatystyki, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin

Otrzymano 11.01.2019

Zaakceptowano 28.06.2019

Wasielewska M., Szatkowska I., Czerniawska-Piątkowska E., Zaborski D.
Molecular background of hereditary nephropathies in spaniel dogs

Summary

The molecular background of hereditary nephropathies in English Cocker Spaniels and Springer Spaniels remained unclear until the beginning of the 21st century. It was only the discovery of an association between these diseases and Alport syndrome in humans that made it possible to identify the genes potentially responsible for nephropathies in dogs. Eventually, two mutations were identified in the *COL4A4* gene coding for the alpha chains of collagen IV, the main component of the glomerular basement membrane (GBM). This review presents the molecular mechanism resulting from the aforementioned mutations, the signs of disease, functions of the GBM, and breeding aspects.

Keywords: hereditary nephropathies, Cocker Spaniel, Springer Spaniel, *COL4A4* mutations

Choroby nerek u psów mogą występować jako warunkowane dziedzicznie bądź środowiskowo. Zazwyczaj rozwijają się na skutek zaburzeń pracy nerek lub nieprawidłowości morfologicznych (8). Cechą wspólną schorzeń nerek są podobne objawy, przy czym bez względu na podłoże choroby, wady i zmiany nerek są nieodwracalne (5). W oparciu o wywiad i podstawowe badania biochemiczne niemożliwe jest odróżnienie tych nabytych od wrodzonych, co z punktu widzenia hodowlanego jest bardzo niekorzystne. Dotyczy to zwłaszcza chorób nerek dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny i sprzężony z płcią, bowiem bezobjawowe nosicielstwo może doprowadzić do niekontrolowanego rozprzestrzeniania się zmutowanego *allelu* w danej populacji (8). W grupie takich schorzeń wymienić można dziedziczne nefropatie (HN, *hereditary nephropathy*), szerokie spektrum chorób, występujących u różnych ras psów. I tak u norweskich psów na łosie, bull terierów i dalmatyńczyków dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący (12, 24), u samojedów występują formy schorzeń nerek sprzężone z chromosomem X (14), natomiast u angielskich cocker i springer spanieli omawiane choroby mają podłoże autosomalne recesywne. Co interesujące, bez względu na rasę i typ dziedziczenia, wspomniane wyżej nefropatie mają jedną wspólną cechę – za dysfunkcje nerek

odpowiedzialna jest nieprawidłowa budowa kolagenu typu IV (16). Jest to makrocząsteczka zbudowana z heterotrimerów, w skład których może wchodzić sześć różnych łańcuchów α ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), kodowanych przez sześć różnych genów (4), z *loci* zarówno w autosomach ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$), jak i w chromosomie płci X ($\alpha 5$), stąd możliwe różne typy dziedziczenia chorób (25). Kolagen typu IV, w przeciwieństwie do większości kolagenów, występuje tylko w błonach podstawnych, których jest głównym komponentem (17, 22). W dziedzicznych nefropatiach to właśnie jego nieprawidłowa budowa wywołuje niekorzystne zmiany w funkcjonowaniu kłębuszkowej błony podstawnej (GBM – *glomerular basement membrane*). W niniejszym artykule zaprezentowano przegląd informacji o molekularnym podłożu i etiologii tych nieprawidłowości, występujących u angielskich cocker i springer spanieli.

Charakterystyka i objawy dziedzicznych nefropatii u spanieli

Pierwsze przypadki dziedzicznych nefropatii u angielskich cocker spanieli zaobserwowano jeszcze w pierwszej połowie XX w. pod postacią korowej hipoplazji nerek. Objawy tego schorzenia często występują już u bardzo młodych psów, choć zdarza się, że choroba jest utajona nawet do piątego roku

życia. Pierwszą obserwowaną cechą jest białkomocz jako główna cecha kliniczna, wzmożone pobieranie płynów, obniżone łaknienie oraz spadek masy ciała (14). Po okresie trwającym od 2 do 9 miesięcy pojawia się również spadek ciężaru właściwego moczu oraz wzrost stężenia kreatyniny w osoczu krwi. Częstość objawem towarzyszącym chorobie jest krwimocz (13). Badania biochemiczne krwi pokazują, że psy obciążone zaburzeniem mają niższe stężenie albumin w osoczu, przy jednoczesnym podniesionym poziomie cholesterolu. Wraz z rozwojem choroby zauważa się u psów postępującą azotemię (26). Zmiany morfologiczne w strukturze nerek obserwuje się tylko u psów z zaawansowaną niewydolnością w formie pomniejszonych, twardych i pełnych nadżerek koloru bladobrazowego narządów (13, 14). Kora nerek także bywa zmieniona patologicznie, w formie zwłóknienia torebek Bowmana i zgrubienia kapilar błony podstawnej. Skutkiem choroby jest wieloogniskowe przerzedzanie się kory nerkowej oraz postępujące zmniejszanie liczby nefronów. Choroba jest nieuleczalna i zawsze kończy się śmiercią zwierzęcia (23). Ze względu na fakt, iż większość osobników cierpiących na dziedziczną nefropatię zostaje uśpionych na prośbę właścicieli, trudno jest oszacować czas przeżycia od momentu diagnozy. Zwykle jest to okres kilku miesięcy, w sporadycznych przypadkach 2-3 lata (14).

Opisaną wyżej chorobę nerek stwierdzono w populacjach spanieli w Szwecji, Szwajcarii, Australii. Następnie wykazano, że choroba ma charakter dziedziczny i warunkowana jest w sposób autosomalny recesywny, stąd nazwa – „rodzinne” bądź „dziedziczne nefropatie” (7). W kolejnych latach ujawniono, w oparciu o ówczesne techniki, że ultrastrukturalny obraz kłębuszkowej błony podstawnej u chorych psów jest nieprawidłowy. W dalszym jednak ciągu nieznane było podłoże molekularne omawianego syndromu, aczkolwiek zaobserwowano, że zmiany w GBM u psów są podobne do tych, jakie występują u ludzi chorych na zespół Alporta (2). Fakt ten pozwolił powiązać je u psów z dysfunkcją kolagenu typu IV, co potwierdzono w połowie lat 90. ub. wieku (14). Badania immunohistochemiczne ujawniły bowiem kompletny brak łańcuchów $\alpha 3(\text{IV})$ i $\alpha 4(\text{IV})$, co skierowało uwagę naukowców na strukturę genów, kodujących te dwa łańcuchy w kolagenie typu IV.

Aby zrozumieć molekularne przyczyny dysfunkcji kłębuszkowej błony podstawnej w dziedzicznych nefropatiach, należy zwrócić uwagę na sposób, w jaki funkcjonuje GBM, a zwłaszcza integralna jej część, czyli kolagen typu IV.

Kłębuszkowa błona podstawna (GBM) w warunkach fizjologicznych i patologicznych

Kłębuszkowa bariera filtracyjna nerek to dwa typy komórek: podocyty i komórki endotelialne oraz kłębuszkowa błona podstawna, czyli wyspecjalizowana

macierz zewnątrzkomórkowa, leżąca między nimi (1). Kłębuszkowa błona podstawna stanowi kapilarną ścianę, przepuszczalną dla wody i małych cząsteczek oraz selektywnie cofającą makrocząsteczki, takie jak albuminy. GBM formowana jest w procesie glomerulogenezy dzięki sekrecji komponentów, pochodzących zarówno z podocytów, jak i komórek endotelialnych. Najnowsze badania proteomiczne wykazały, że w zewnątrzkomórkowej macierzy występuje ponad 140 białek o charakterze strukturalnym i regulatorowym, niemniej jednak jej najważniejszymi komponentami są dwie kluczowe makrocząsteczki, mianowicie lamininy i kolagen typu IV (4, 17).

U ssaków kolagen IV może tworzyć sześć wysoce homologicznych łańcuchów α , ale specyficznymi formami są tylko trzy kombinacje – heterotrimery $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ oraz $\alpha 5\alpha 5\alpha 6(\text{IV})$. Ekspresja genów kodujących poszczególne łańcuchy podlega czasowej regulacji. Geny kodujące łańcuchy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ ulegają ekspresji w okresie wczesnego rozwoju embrionalnego (11), dlatego mutacje tych genów są letalne już na etapie embrionalnym. Poziom ich ekspresji stopniowo zmniejsza się, a rozpoczyna się transkrypcja genów kodujących łańcuchy $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 5$, co w konsekwencji powoduje wymianę heterotrimerów $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$ na $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$. Mechanizmy leżące u podstaw tych przemian podczas rozwoju kłębuszków nerkowych nie są jeszcze dobrze poznane. Wiadomo jednak, iż heterotrimer $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ jest mniej podatny na proteolityczną degradację niż $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$ oraz że ten rozwojowy przełącznik ekspresyjny jest absolutnie krytyczny dla dojrzewania GBM jako wyspecjalizowanej struktury (25).

Każdy z łańcuchów $\alpha(\text{IV})$ zawiera trzy strukturalnie odmienne domeny (ryc. 1): N-terminalną, bogatą w reszty cysteiny i lizyny o stałej sedymentacji 7S (stąd jej nazwa), główną domenę kolagenową z elementami powtarzalnymi Gly-Xaa-Yaa oraz tzw. niekolagenową domenę przy końcu karboksylowym, określaną mianem NC1 (*noncollagenous*) (3). Obecność reszt lizynowych i cysteinowych przy aminowym końcu jest niezbędna do łączenia krzyżowego czterech heterotrimerów $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ poprzez mostki disiarczkowe (20). Główna, środkowa domena charakteryzuje się obecnością przerw między kolagenowymi powtórzeniami Gly-Xaa-Yaa, które warunkują molekularną elastyczność, bardzo istotną przy formowaniu supercząsteczkowej struktury sieci. Ostatnia, karboksylowa domena NC1, jest istotnym miejscem w czasie montowania potrójnej helisy (19). W każdej z nich występuje 12 konserwatywnych reszt cysteinowych, które umożliwiają tworzenie wiązań disiarczkowych między poszczególnymi domenami NC1 i ostatecznie stabilizację zwięzłej, elipsoidalnie ukształtowanej cząsteczki protomeru. W takiej formie cząsteczki te są wydzielane przez podocyty i komórki endotelialne do macierzy zewnątrzkomórkowej, w której dochodzi

do formowania dojrzałej cząsteczki kolagenu IV, polegającego na tworzeniu dimerów, a następnie tetramerów (4).

Biosynteza kolagenu IV jest procesem złożonym, któremu towarzyszą modyfikacje przed- i potranslacyjne, katalizowane przez kilka enzymów. Modyfikacje te są wysoce skoordynowane i dotyczą: odcinania peptydów sygnałowych w retikulum endoplazmatycznym, hydroksylację wybranych reszt proliny i lizyny, glikozylację specyficznych hydrolizyn i ostatecznie formowanie wiązań disiarczkowych między konserwatywnymi cysteinami w domenie NC1 (10). Ponadto biosynteza kolagenu jest zależna od specyficznych i niespecyficznych cząsteczek chaperonów czy białka Hsp47, bez których prawidłowe składanie kolagenu IV jest niemożliwe. Opisane procesy wyraźnie wskazują, że cząsteczka kolagenu IV jest złożoną molekułą nie tylko pod względem budowy, ale także montażu, a wszelkie nieprawidłowości tak na poziomie struktury poszczególnych łańcuchów α , jak i montażu dojrzałej cząsteczki, mogą generować różnego rodzaju nieprawidłowości, prowadzące do stanów patologicznych (27).

Komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej utrzymują integralność kłębuszkowej błony podstawnej, a tym samym zapewniają prawidłowe funkcje kłębuszków nerkowych. Szczególna rola sieci kolagenowej typu IV we wspomaganiu tej struktury jest kluczowa.

Nieobecność bądź zmniejszenie funkcjonalnych łańcuchów $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ wiąże się ze zmniejszoną ilością protomerów wydzielanych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do ścienienia błony podstawnej. A więc zmiany tej wyspecjalizowanej macierzy zewnątrzkomórkowej mogą zmieniać funkcjonowanie bariery filtracyjnej i spowodować jej przeciekanie dla wybranych makrocząsteczek (np. albumin), które pojawiają się w moczu jako pierwszy objaw glomerulopatii (17).

Organizacja i regulacja ekspresji genów kodujących łańcuchy α kolagenu typu IV

Struktura oraz regulacja ekspresji genów kodujących łańcuchy α kolagenu typu IV u poznanych gatunków ssaków są wysoce konserwatywne (28). Analiza sekwencyjna wskazuje na istnienie genu przodka, którego duplikacje ostatecznie doprowadziły do wyodrębnienia 6 spokrewnionych genów kodujących dojrzałą cząsteczkę kolagenu IV, dzielonych na grupę α -1 (*COL4A1*, *COL4A3*, *COL4A5*) i α -2 pochodną (*COL4A2*, *COL4A4*, *COL4A6*). W genach obu grup obserwuje się konserwyzm nie tylko na poziomie sekwencyjnym, ale także w odniesieniu do ich struktury, a więc liczby eksonów oraz intronów (9).

Pomimo identyfikacji elementów regulatorowych w regionach promotorowych genów kodujących

łańcuchy α kolagenu IV, skoordynowana regulacja ich ekspresji, jak już wcześniej wspomniano, jest w dalszym ciągu niejasna. Przypuszcza się jednak, że są to procesy precyzyjnie regulowane, zapewniające odpowiedni poziom transkrypcji, stabilność i prawidłową obróbkę mRNA, wydajność translacji i wspomniane złożone modyfikacje potranslacyjne (11).

Znana jest lokalizacja wszystkich genów kodujących łańcuchy α kolagenu IV, np. gen *COL4A5* u psa ma swój *locus*

Ryc. 1. Sposób formowania sieci kolagenowej typu IV (opracowanie własne wg Chew i Lennon (4))

Ryc. 2. Lokalizacja i struktura genu *COL4A4* u psów ze wskazaniem substytucji odpowiedzialnych za dziedziczne nefropatie

Objaśnienia: 1. – sekwencja prawidłowa; 2. – sekwencja z mutacją (opracowanie własne wg Davidson i wsp. (6) oraz Nowend i wsp. (21))

w chromosomie X. Z kolei geny *COL4A3* i *COL4A4* zmapowano w chromosomie 25 (ryc. 2), przy czym są one rozmieszczone w odwrotnej orientacji (head-to-head) (25). Defekty sekwencyjne w wymienionych wyżej genach mogą wywoływać nieprawidłowości w budowie GBM, niemniej jednak najistotniejsza, z punktu widzenia omawianych nefropatii u angielskich cocker i springer spanieli, jest struktura i ekspresja genu *COL4A4*.

Struktura genu *COL4A4* u zdrowych i obciążonych nefropatią spanieli

Struktura wspomnianego genu ma konserwatywny charakter, co podkreśla fakt, iż wykazuje on podobieństwo do ludzkiego genu *COL4A4* w 88% na poziomie DNA i w 93% na poziomie sekwencji aminokwasowej (15). Ma on typową budowę kanoniczną, a więc składa się z 47 eksonów, przedzielonych 46 intronami (25). Poszukiwanie mutacji w tak strukturalnie złożonym genie okazało się stosunkowo trudne, niemniej jednak pierwsze badania z powyższego zakresu, przeprowadzone przez zespół Davidson i wsp. (6) na psach rasy angielski cocker spaniel pozwoliły zawęzić obszar poszukiwań nieprawidłowości nukleotydowych do trzeciego eksonu. Po zsekwencjonowaniu próbek DNA pochodzących od chorych psów i analizie porównawczej z sekwencją referencyjną okazało się, że u tych pierwszych występuje mutacja typu nonsense, polega-

jąca na substytucji adeniny do tyminy (c. 1115 *A > T*), skutkująca przedwczesnym pojawieniem się kodonu STOP, a tym samym drastyczne skrócenie łańcucha $\alpha 4$ w kolagenie IV. Ponadto ten sam zespół naukowców (6) zidentyfikował u osobników z nefropatią dodatkowo dwie substytucje w sekwencjach intronowych, które nie powodują zmian w sekwencji nukleotydowej genu, ale są dziedziczone w sposób sprzężony z mutacją odpowiedzialną za rodzinną nefropatię. Obie substytucje występują między eksonami 42 i 43 (c. 90 *T > C* oraz 93 *T > A*). Z kolei analiza poziomu transkrypcji *COL4A4* nie różniła się statystycznie istotnie w grupie chorych i zdrowych psów.

Nieco szerzej problem dziedzicznych nefropatii u psów rasy angielski springer spaniel w kontekście przyczyn molekularnych ujęli Nowend i wsp. (21), bowiem poszukiwano mutacji zarówno w genie *COL4A4*, jak i *COL3A4*, w oparciu o wspólny dla obu genów segment regionu kodującego długości 500 pz. I w tym przypadku wyniki sekwencjonowania pozwoliły na identyfikację mutacji typu nonsense w pozycji 2806 w 30. eksonie genu *COL4A4* (c. 2806 *C > T*), powodującą przedwczesne pojawienie się kodonu STOP. Wprawdzie wspomniana mutacja nie powoduje tak drastycznego skrócenia łańcucha $\alpha 4$ jak u chorych cocker spanieli, co opisano w poprzednim akapicie, niemniej jednak konsekwencje dla funkcjonowania dojrzałej cząsteczki kolagenu IV okazały się podobne również u springer spanieli – czyli niekorzystne zmiany w GBM. Ponadto analizowano nerkowy poziom ekspresji trzech genów kodujących łańcuchy $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 5$ u zdrowych i obciążonych nefropatią osobników, wskazując, że ilość transkryptów mRNA *COL3A4* i *COL4A4* była niższa u tych ostatnich o, odpowiednio, 10,6 i 14,33 razy, przy porównywalnym w obu grupach poziomie mRNA *COL5A4*. Zastanawiające wyniki ilościowej analizy ekspresji genów *COL3A4* i *COL4A4* mogą pośrednio sugerować występowanie zmian nukleotydowych w sekwencjach regulatorowych obu genów, powodujących zniesienie miejsc konsensusowych dla czynników transkrypcyjnych, regulujących poziom ekspresji. Jest to jednak hipoteza przedwczesna, wymagająca potwierdzenia empirycznego.

Dziedziczna nefropatia u spanieli, jak podkreśla ją Minkus i wsp. (18), to nie pojedyncza jednostka chorobowa, ale zespół schorzeń, do których można zaliczyć dysplazję nerek, młodzieńczą chorobę nerek oraz glomerulopatię. Podkreślają także, iż dziedziczną nefropatię można podejrzewać wtedy, gdy u młodych, spokrewnionych ze sobą osobników diagnozowana jest dysfunkcja nerek, której nie można jednoznacznie sklasyfikować. Z punktu widzenia hodowlanego zasadniczą kwestią jest jednak nie tylko diagnostyka, ale program eliminacji z dalszej hodowli osobników chorych. Bazując tylko na profilu klinicznym, w wielu przypadkach nefropatię można zdiagnozować po osiągnięciu przez psa wieku rozrodczego, niejednokrotnie długo po przyjściu na świat jego potomstwa. Dla angielskich cocker spanieli, jako dla jednej z pierwszych ras, udało się opracować model dziedziczenia omawianego schorzenia (18), wobec czego już sama analiza rodowodowa wystarczy do postawienia prawdopodobnej prognozy, zapewniającej teoretycznie hodowlę zdrowych psów. Jednak dopiero opracowanie testów genetycznych umożliwiło pewną diagnostykę i – co jeszcze ważniejsze – identyfikację nosicieli dziedzicznej nefropatii, a także oszacowanie frekwencji w wybranych populacjach zmutowanych alleli. Szacunki takie przeprowadzono jedynie dla grupy 134 angielskich cocker spanieli, wśród których *allel COL4A4^T* występował z częstością 0,265 (6), przy czym sami autorzy zauważają, że z powodu różnego pochodzenia psów badanej populacji nie należy wyników powyższych traktować jako pewnego wskaźnika. Pomimo tych zastrzeżeń zwraca jednak uwagę bardzo wysoki odsetek nosicieli *allelu* warunkującego dziedziczną nefropatię, co prowokuje do podkreślenia dwóch istotnych aspektów. Po pierwsze, należałoby przeprowadzić badania molekularne w celu weryfikacji wyników cytowanych wyżej. Po drugie, analizy molekularne pozwoliłyby na ostrożne dobieranie partnerów dla zidentyfikowanych nosicieli *allelu COL4A4^T*, aby zminimalizować liczbę chorego potomstwa. Oczywiście można rozważać całkowitą eliminację *allelu COL4A4^T* z puli genetycznej spanieli, ale przy braku wiedzy na temat ewentualnych sprzężeń genetycznych może istnieć ryzyko fenotypowego obniżenia poziomu innych cech, co w historii hodowli innych gatunków jest dobrze udokumentowane, dlatego prowadzenie świadomego planu hodowlanego powinno polegać na takiej selekcji psów, aby zapobiegać krzyżowaniu ze sobą nosicieli.

Piśmiennictwo

1. Abrahamson D. R., Hudson B. G., Stroganova L., Borza D.-B., John P. L. S.: Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 1471-1479.
2. Barker D. F., Hostikka S. L., Zhou J., Chow L. T., Oliphant A. R., Gerken S. C., Gregory M. C., Skolnick M. H., Atkin C. L., Tryggvason K.: Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990, 248, 1224-1227.
3. Byron A., Randles M. J., Humphries J. D., Mironov A., Hamidi H., Harris S., Mathieson P. W., Saleem M. A., Satchell S. C., Zent R., Humphries M. J., Lennon R.: Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014, 25, 953-966.
4. Chew C., Lennon R.: Basement membrane defects in genetic kidney diseases. *Front. Pediatr.* 2018, 6, 11.
5. Chew D. J., DiBartola S. P., Boyce J. T., Hayes J. H., Brace J. J.: Juvenile renal disease in Doberman Pinscher dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983, 182, 481-485.
6. Davidson A. G., Bell R. J., Lees G. E., Kashtan C. E., Davidson G. S., Murphy K. E.: Genetic cause of autosomal recessive hereditary nephropathy in the English Cocker Spaniel. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, 21, 394-401.
7. English P. B., Winter H.: Renal cortical hypoplasia in a dog. *Aust. Vet. J.* 1979, 55, 181-183.
8. Friedl L. W.: Co dolega mojemu psu? (Was fehlt denn meinem Hund?). Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1997, s. 311-318.
9. Heikkilä P., Soininen R.: The type IV collagen gene family, [w:] Tryggvason K. (red.): *Molecular Pathology and Genetics of Alport Syndrome*. Karger Publishers, Bazylea 1996, s. 105-129.
10. Khoshnoodi J., Pedchenko V., Hudson B. G.: Mammalian collagen IV. *Microsc. Res. Tech.* 2008, 71, 357-370.
11. Khoshnoodi J., Sigmundsson K., Cartiailler J.-P., Bondar O., Sundaramoorthy M., Hudson B. G.: Mechanism of chain selection in the assembly of collagen IV: A prominent role for the $\alpha 2$ chain. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 6058-6069.
12. Lees G. E.: Kidney diseases caused by glomerular basement membrane type IV collagen defects in dogs. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 2013, 23, 184-193.
13. Lees G. E., Helman R. G., Kashtan C. E., Michael A. F., Homco L. D., Millichamp N. J., Ninomiya Y., Sado Y., Naito I., Kim Y.: A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. *Kidney Int.* 1998, 54, 706-719.
14. Lees G. E., Wilson P. D., Helman R. G., Homco L. D., Frey M. S.: Glomerular ultrastructural findings similar to hereditary nephritis in 4 English cocker spaniels. *J. Vet. Intern. Med.* 1997, 11, 80-85.
15. Lowe J. K., Guyon R., Cox M. L., Mitchell D. C., Lonkar A. L., Lingaas F., André C., Galibert F., Ostrander E. A., Murphy K. E.: Radiation hybrid mapping of the canine type I and type IV collagen gene subfamilies. *Funct. Integr. Genomics* 2003, 3, 112-116.
16. McKay L. W., Seguin M. A., Ritchey J. W., Levy J. K.: Juvenile nephropathy in two related Pembroke Welsh corgi puppies. *J. Small Anim. Pract.* 2004, 45, 568-571.
17. Miner J. H.: The glomerular basement membrane. *Exp. Cell Res.* 2012, 318, 973-978.
18. Minkus G., Breuer W., Wanke R., Reusch C., Leuterer G., Brem G., Hermanns W.: Familial nephropathy in Bernese mountain dogs. *Vet. Pathol.* 1994, 31, 421-428.
19. Netzer K.-O., Leinonen A., Boutaud A., Borza D.-B., Todd P., Gunwar S., Langeveld J. P., Hudson B. G.: The goodpasture autoantigen: Mapping the major conformational epitope(s) of $\alpha 3(\text{IV})$ collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 11267-11274.
20. Netzer K.-O., Suzuki K., Itoh Y., Hudson B. G., Khalifah R. G.: Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. *Protein Sci.* 1998, 7, 1340-1351.
21. Nowend K. L., Starr-Moss A. N., Lees G. E., Berridge B. R., Clubb F. J., Kashtan C. E., Nabity M. B., Murphy K. E.: Characterization of the genetic basis for autosomal recessive hereditary nephropathy in the English Springer Spaniel. *J. Vet. Intern. Med.* 2012, 26, 294-301.
22. O'Neill D. G., Elliott J., Church D. B., McGreevy P. D., Thomson P. C., Brodbelt D. C.: Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: prevalence, risk factors, and survival. *J. Vet. Intern. Med.* 2013, 27, 814-821.
23. Picut C. A., Lewis R. M.: Comparative pathology of canine hereditary nephropathies: an interpretive review. *Vet. Res. Commun.* 1987, 11, 561-581.
24. Schulze C., Meyer H. P., Blok A. L., Schipper K., Van den Ingh T.: Renal dysplasia in three young adult Dutch kooiker dogs. *Vet. Q.* 1998, 20, 146-148.
25. Thorner P. S., Zheng K., Kalluri R., Jacobs R., Hudson B. G.: Coordinate gene expression of the $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains of collagen type IV. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 13821-13828.
26. Tilley L. P., Smith F. W. K.: 5 minut konsultacji weterynaryjnej. Psy i koty. (The 5-Minute Veterinary Consult. Canine and Feline). Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008, s. 842-845.
27. Wiersma A. C., Millon L. V., Van Dongen A. M., Van Oost B. A., Bannasch D. L.: Evaluation of canine COL4A3 and COL4A4 as candidates for familial renal disease in the Norwegian Elkhound. *J. Hered.* 2005, 96, 739-744.
28. Zheng K., Thorner P. S., Marrano P., Bauman R., McInnes R. R.: Canine X chromosome-linked hereditary nephritis: a genetic model for human X-linked hereditary nephritis resulting from a single base mutation in the gene encoding the alpha 5 chain of collagen type IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 3989-3993.

Adres autora: mgr inż. Małgorzata Wasielewska, ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin; e-mail: malgorzata.wasielewska@zut.edu.pl