

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Michal Malina

Dizertační práce

Fenotypická charakteristika a patofyziologie dědičných nefropatií v dětském věku

Geneticky podmíněný nefrotický syndrom a atypický hemolyticko-uremický syndrom u českých dětí

Phenotypes and pathophysiology of hereditary nephropathies in children.

Genetic causes of nephrotic syndrome and atypical hemolytic-uremic syndrome in Czech children.

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Seeman, CSc.

Konzultant: doc. MUDr. Ondřej Cinek, PhD.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 27.6.2012

Michal Malina

Podpis: _____

I. OBSAH

I. OBSAH.....	4
I. SEZNAM ZKRATEK.....	6
II. IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM.....	7
III. SOUHRN.....	8
IV. SOUHRN (anglicky).....	9
V. ÚVOD.....	10
Přehled monogenně podmíněných chorob ledvin.....	10
Glomerulopatie.....	11
Tubulopatie.....	11
Cystická onemocnění ledvin.....	11
Využití molekulární genetiky v diagnostice a léčbě onemocnění ledvin u dětí.....	12
Molekulární podklad fyziologie glomerulární filtrační membrány.....	13
Patofyziologie poruchy filtrační funkce vedoucí k nefrotickému syndromu.....	15
Geny kódujících nejvýznamnější proteiny zajišťující funkci filtrační membrány.....	17
<i>NPHS1</i> (nefrinový gen).....	17
<i>NPHS2</i> (podocinový gen).....	18
<i>NPHS3 (PLCE1)</i>	19
<i>WT1</i> (Wilms tumor 1).....	19
<i>LAMB2</i>	20
<i>CD2AP</i>	20
<i>ACTN4</i>	20
<i>TRPC6</i>	21
<i>INF2</i>	21
<i>PTPRO</i>	21
<i>MYO1E</i>	21

Patofyziologie rozvoje hemolyticko-uremického syndromu (HUS).....	22
D+ HUS	22
Atypický HUS.....	23
VI. HYPOTÉZA.....	26
VII. CÍLE	27
VIII. METODY	28
Vytvoření kohorty pacientů s kortikorezistentním NS	28
Molekulárně genetické vyšetření genů <i>NPHS1</i> , <i>NPHS2</i> , <i>WT1</i> u pacientů se SRNS	28
Vyšetření genů <i>MCP</i> , <i>CFI</i> , <i>CFH</i> , <i>C3</i> u retrospektivně zjištěných pacientů s aHUS	30
Funkční studie mutací v <i>MCP</i> genu	31
IX. VÝSLEDKY.....	32
Cíl 1 – Incidence SRNS u dětí v ČR	32
Cíl 2 – Zastoupení jednotlivých mutací u dětí se SRNS v ČR.....	32
Cíl 3 – Odpověď pacientů se SRNS na léčbu dalšími imunosupresivy	33
Cíl 4 - Detailní fenotypická charakteristika pacientů nesoucích mutace.....	35
Pacient 5	35
Pacientky 19 a 20.....	36
Pacientka 24.....	36
Pacientka 26.....	37
Pacient 31	37
Cíl 5 - Výsledek analýzy genů u pacientů s familiárním atypickým HUS.....	38
X. DISKUZE	40
XI. ZÁVĚR	48
XII. PODĚKOVÁNÍ.....	49
XIII. LITERATURA.....	50
XIV. PŘÍLOHY – PLNÉ TEXTY ČLÁNKŮ TVOŘÍCÍ PODKLAD DIZERTACE	55

I. SEZNAM ZKRATEK

- aHUS – atypický hemolyticko-uremický syndrom
APN/GPN – Arbeitsgemeinschaft/Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie
CF – cyklofosfamid
CSA – cyklosporin A
ČR – Česká republika
DMS – difuzní mesangiální skleróza
FACS – průtoková cytometrie
FSGS – fokálně segmentální glomeruloskleróza
GBM – glomerulární bazální membrána
GFR – glomerulární filtrace
HUS – hemolyticko-uremický syndrom
MCD – minimální změny glomerulů
MMF – mykofenolát mofetil
NFAT – Nuclear factor of activated T-cells
NS – nefrotický syndrom
PCR – polymerázová řetězová reakce
PLCE – fosfolipáza C-epsilon
RTX – rituximab
SRNS – steroid resistantní (kortikorezistentní) nefrotický syndrom

II. IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

MALINA, Michal, Fenotypická charakteristika a patofyziologie dědičných nefropatií v dětském věku. Geneticky podmíněný nefrotický syndrom a atypický hemolyticko-uremický syndrom u českých dětí. (*Phenotypes and pathophysiology of hereditary nephropathies in children. Genetic causes of nephrotic syndrome and atypical hemolytic-uremic syndrome in Czech children.*) Praha, 2012, s.55, přílohy 6. Disertační práce (PhD.), Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Pediatriká klinika. Vedoucí práce: Seeman Tomáš.

III. SOUHRN

Dědičné nefropatie je rozsáhlá heterogenní skupina chorob s velkým zastoupením monogenní patologie zahrnující choroby primárně postihující jednotlivé funkční podjednotky nefronu (glomeruly, tubuly) a dále pak kombinované syndromy, kde renální patologie stojí v popředí. V úvodu práce je nastíněna současná klinicko-patologická klasifikace této rozsáhlé skupiny chorob a jsou krátce shrnuty nejvýznačnější podskupiny.

Z této skupiny se práce zaměřuje na dvě klinicky významné glomerulopatie, kde je výrazně vyjádřen podíl genetické složky na rozvoji patofyziologie těchto nemocí. Jedná se o dědičné formy nefrotického syndromu (SRNS) a atypický hemolyticko-uremický syndrom (aHUS).

Práce shrnuje výsledky pětiletého sledování dětských pacientů s kortikorezistentním nefrotickým syndromem z celé ČR. Zachytili jsme celkem 32 případů a u 7 pacientů (22%) potvrdili genetické pozadí choroby. Čtyři pacienti nesli mutace v genech *NPHS2* a dva pacienti (dvojčata) měli mutaci ve *WT1*. Jeden pacient původně diagnostikovaný jako idiopatický SRNS později rozvinul příznaky Schimkeho choroby, což bylo molekulárně geneticky potvrzeno.

Významným a novým zjištěním byl vysoký podíl pacientů reagujících na cyklosporin v naší skupině a to i pacientů nesoucích mutace v genu *NPHS2* (43%).

Ve skupině pacientů s velmi vzácným a atypickým HUS jsme se zaměřili na identifikaci mutací pacientů s familiárním výskytem HUS s manifestací v dětském věku. V české populaci jsme identifikovali významně vysoké procento pacientů s mutacemi v *MCP* (4 z 10, 40%) oproti publikovaným kohortám (6-10%). Tyto mutace byly funkčně analyzovány a vyhodnoceny jako významné. Tohoto zjištění nyní využíváme i klinicky, kdy děti s projevy atypického HUS jsou velmi rychle skriningově vyšetřována totožnou technikou použitou pro funkční analýzu těchto mutací.

Klíčová slova: glomerulopatie, nefrotický syndrom, hemolyticko-uremický syndrom, cyklosporin, podocin, *WT1*

IV. SOUHRN (anglicky)

Hereditary nephropathies are a heterogeneous group of disorders comprising of diseases of the kidney per se and syndromes where kidney pathology is predominantly manifested.

We have focused on two important glomerulopathies manifesting predominantly in childhood – nephrotic syndrome with genetic background and atypical hemolytic uremic syndrome.

In the first part of the work we present five years of observation of cohort of children with steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS). We have identified 32 cases from which 7 carried genetic mutations causing nephrotic syndrome (22%). Most dominant were mutations in *NPHS2* gene (n=4). Second most common were mutations in *WT1* gene (n=2). No mutations were found in gene *NPHS1*. Surprisingly, one patient initially diagnosed as idiopathic steroid resistant nephrotic syndrome showed signs of Schimke imuno-osseous dysplasia during the follow- up and the disease was proven by molecular genetic testing of. Most striking finding in our group was high rate of responsiveness to cyclosporine in our cohort regardless of genotype of patient. Even patients bearing mutation in *NPHS2* gene showed partial responsiveness to cyclosporine (43%)

Second part of the work focused on very rare disease of complement cascade – atypical hemolytic uremic syndrome. In retrospective study of patients with familial presentation we found high rate of patients (n=4, 40%) with *MCP* mutations. This is in contrast to published cohorts where prevalence of these mutations is around 6-10%. All four our mutations were functionally tested and were proven as functionally relevant. All carriers showed decrease of MCP/CD46 molecules on cell surfaces. This functional test is now used routinely for quick screening of patients showing signs of atypical hemolytic uremic syndrome.

Keywords: glomerulopathy, nephrotic syndrome, hemolytic-uremic syndrome, cyclosporine, podocin, *WT1*

V. ÚVOD

Od přečtení kódující části lidského genomu v roce 2003 exponenciálně narostl počet vysvětlení geneticky podmíněných chorob. Navíc došlo ke značnému poklesu nákladů na identifikaci jednotlivých genů i sekvenování kompletního lidského genomu. Celý projekt HUGO, mající za cíl sekvenci lidského genomu, stál 3 miliardy dolarů. Společnost Craig Ventera, Celera Genomics, již zvládla tento úkol s rozpočtem desetkrát nižším. Nyní je možné si vyžádat sekvenci kompletního genomu pro jednotlivého pacienta a dostat se k ceně 10 tisíc dolarů. Toto tempo samozřejmě vede k masivnímu nárůstu objevů funkce genů a vysvětlení spojitosti s fenotypem a tudíž osvětlení patofyziologie dědičných onemocnění.

V květnu 2012 je v největší databázi shromažďující informace o monogenních onemocněních Online Mendelian Inheritance of Man (OMIM) na 3485 záznamů o chorobách s popsáním fenotypem a molekulárně geneticky osvětleným pozadím. Z tohoto množství je cca 100 genů spojováno s primárně nefrologickými dědičnými chorobami (v roce 2005 to bylo 50-60 genů). Toto množství se za posledních 5 let tedy skoro zdvojnásobilo. Při 25-30 tisících známých lidských genech čeká množství genotypově-fenotypických korelací na své osvětlení i když počítáme jen se striktně monogenními chorobami bez zapojení více genů a vlivu dalších genetických interakcí.

Přehled monogenně podmíněných chorob ledvin

Choroby ledvin způsobené poruchou jednoho genu jdou standardně klasifikovat podle typu dědičnosti (dominantní/recesivní, autozomálně či gonozomálně), ale nejčastěji se používá klasifikace kombinující popis klinického obrazu a dělení podle fyziologických funkčních podjednotek nefronu.

Dle této klasifikace rozlišujeme nemoci glomerulů (glomerulopatie), nemoci tubulů (tubulopatie), cystické choroby ledvin a dále rozličné kombinované syndromy a metabolická postižení s vyjádřenou patologií ledvin.

Glomerulopatie

Do této skupiny patří choroby, u nichž dochází k porušení funkcí na úrovni glomerulu. Řadí se sem primární **nefrotické syndromy (NS)**, **Alportův syndrom** a **atypický hemolyticko-uremický syndrom (aHUS)**. Patofyziologie rozvoje nefrotického syndromu a atypického hemolyticko-uremického syndromu jsou dále podrobně rozvedeny v samostatných kapitolách.

Alportův syndrom je syndromové monogenní onemocnění kombinující hematurii, sensorineurální hluchotu a okulární abnormality způsobené mutacemi v genech pro kolagen typu IV. Vyskytují se u něj tři formy dědičnosti (X vázaná jako nejčastější v 85%, autozomálně dominantní v 14% a autozomálně recesivní jako nejvzácnější do 1% případů) (Kashtan and Segal 2011).

Tubulopatie

Dědičné tubulopatie shrnují choroby s defektem na úrovni tubulárního aparátu nefronu. Jedná se opět o rozsáhlou heterogenní skupinu onemocnění s různou manifestací, které se nejčastěji projevují nemožností zachovat elektrolytovou homeostázu sodíku, draslíku a kalcia. Mnoho z nich se pojí s postiženími v dalších orgánových soustavách, často v sluchovém sensorickém aparátu (Jungers, Joly et al. 2008; Lifton P.R. 2009).

Cystická onemocnění ledvin

Do této skupiny se řadí choroby, jejichž markantním znakem je rozvoj mnohotných cyst v ledvinách, které progresivně omezují jejich funkční parenchym. U první skupiny – nefronoftíz dochází k rozvoji cyst v oblasti kortikomedulární hranice. U polycystózy a multicystické dysplazie vznikají cysty v celém parenchymu ledviny.

Nefronoftízy jsou nejčastější příčinou chronické renální insuficience u dětí (cca 10-15%) a mají autozomálně recesivní dědičnost. Je známo mnoho etiologických genů (v současné době již 11). Jednotlivé formy se liší tíží ledvinného postižení, ovlivněním dalších orgánů mimo ledvinu a dobou progresu do chronického selhání ledvin. Nejčastější formou je tzv. juvenilní nefronoftíza způsobená mutací genu *NPHP1* (Hildebrandt, Attanasio et al. 2009; Salomon, Saunier et al. 2009).

Podskupina chorob s nejtěžšími projevy, zvaná polycystózy ledvin, se skládá ze dvou podtypů. Autozomálně recesivní polycystóza je devastující dědičné onemocnění způsobené mutací v genu *PKHD1* kódující protein fibrocystin. Projevuje se již prenatálně či v raném dětském věku rozvojem polycystózy ledvin a současně i kongenitální jaterní fibrózy. U většiny pacientů dochází k rozvoji chronické renální insuficience velmi časně. Autozomálně dominantní polycystóza se chronickou renální insuficiencí projevuje až u dospělých pacientů, ale závažné cystické postižení ledvin a další komplikace choroby jako hypertenze nebo proteinurie může být zjištěno již u dětí. Je způsobena mutací v genech *PKD1* a *PKD2* kódujících proteiny polycystin I a II. Jedná se o vůbec nejčastější monogenní chorobu ledvin (prevalence cca 1:500-1:1000). Rozvoj polycystózy je pomalejší a stadia chronického selhání ledvin dosáhnou pacienti až v dospělosti. Další skupina tzv. multicystické dysplazie nemají zatím jasně definované monogenní varianty, i když v poslední době se uvažuje o vlivu genu *HNF1B* na rozvoj tohoto onemocnění u značné části pacientů. (Heidet, Decramer et al. 2010) Ve většině případů se jedná o sporadické nedědičné onemocnění (Sweeney and Avner 2011).

Využití molekulární genetiky v diagnostice a léčbě onemocnění ledvin u dětí

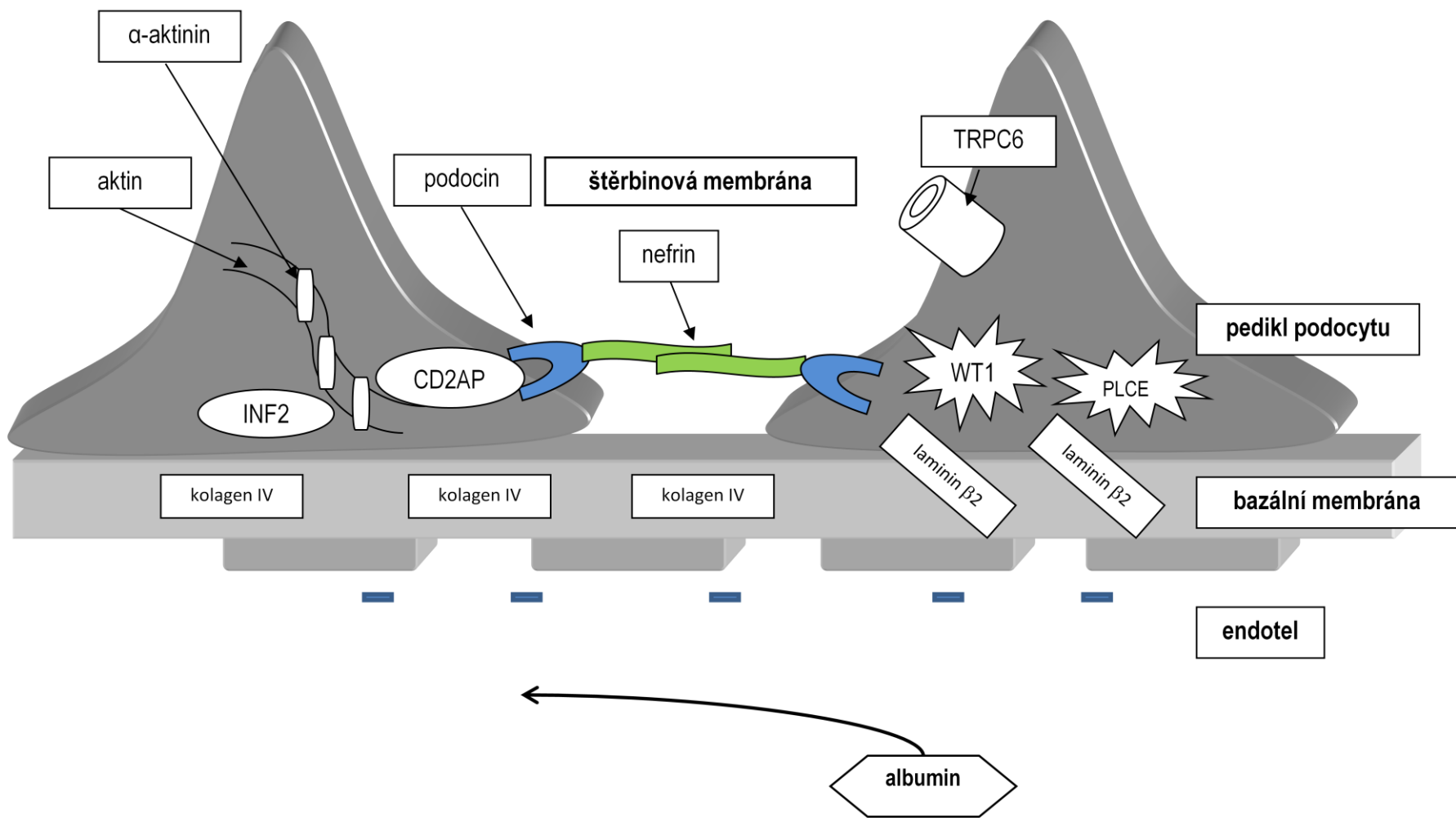
Molekulární genetiky je ve většině případů monogenních chorob využívána převážně pro detailní diagnostiku. Nalezení přesného patofyziologického pozadí nemoci na úrovni proteinů nám ovšem může poskytnout odrazový můstek i pro další klinická rozhodnutí – prognostická a nyní i terapeutická.

V naší práci jsme se zaměřili na projevy nefrotického syndromu způsobeného mutacemi v genech kódujících proteiny štěrbinové membrány v glomerulech u dětských pacientů. Včasná diagnostika mutací v těchto genech umožňuje tyto pacienty ušetřit biopsie ledviny a dlouhodobé léčby kortikoidy a dalšími imunosupresivy. Navíc jejich prognóza je vzhledem k chybění rekurence NS po k transplantaci ledviny na rozdíl od pacientů s idiopatickými formami NS výrazně lepší.

Molekulární podklad fyziologie glomerulární filtrační membrány

Základem glomerulárního filtru jsou tři vrstvy: endotel fenestrovaných kapilár, glomerulární bazální membrána (GBM) a vrstva podocytů. Prstovité výběžky podocytů tvoří zipovitou strukturu, která je propojena poslední vrstvou filtračního komplexu - štěrbinovou membránou (v angličtině slit diaphragm).

Endotel pravděpodobně nevytváří zásadní bariéru vzhledem ke své fenestrované struktuře. Zásadní vliv endotelu má jeho glykokalyx, který vytváří konstantní negativní náboj (Jeansson and Haraldsson 2006). Bazální membrána obklopuje endotel a zajišťuje díky velkému obsahu kolagenu strukturální pevnost. Složky bazální membrány jako kolagen IV, lamininy a další přispívají k selektivní permeabilitě filtru dle náboje a velikosti. Většina dřívějších teorií do bazální membrány situovala hlavní separační činnost glomerulárního filtru. Patrně i díky tomu, že některé nemoci vznikají z porušení bílkovin glomerulární bazální membrány, jmenovitě Alportův syndrom při poruchách kolagenu IV a Piersonův syndrom kombinující těžký nefrotický syndrom a oční postižení vzniklý na podkladě mutací v genu pro laminin beta (Lowik, Groenen et al. 2009). Poslední výzkumy ale hlavní antiproteinurický efekt glomerulárního filtru přiřazují k nejrecentněji objevené struktuře, napjaté mezi výběžky podocytů nazývané štěrbinová membrána (D'Agati, Kaskel et al. 2011). Štěrbínová membrána je tvořena mnoha proteiny, jejichž mutace jsou spojeny s příznaky těžkého kortikorezistentního nefrotického syndromu. Nejvýznamnější z proteinů je nefrin, který je kotven podocinem a CD2AP proteinem k cytoskeletu podocytu a tento komplex tvoří základ této antiproteinurické membrány. Prostorová struktura tvoří síto vláken s póry, které velikostí propouští molekuly menší než albumin (Tojo and Kinugasa 2012).



Obrázek 1 Model štěrbinové membrány a výběžků podocytů a interakce zásadních proteinů k zajištění antiproteinurického efektu

Patofyziologie poruchy filtrační funkce vedoucí k nefrotickému syndromu

Nefrotický syndrom (NS) je souborem příznaků, jejichž etiologickým podkladem je porušení filtrační bariéry ledvin.

Hlavním příznakem nefrotického syndromu je těžká, tzv. nefrotická proteinurie, charakterizovaná ztrátami bílkoviny do moči nad 1000 mg/m²/24 hodin. Další příznaky, otoky, hypoalbuminemie pod 25 g/l a hyperlipidemie, jsou odpovědí organismu na masivní únik sérových bílkovin do moči.

Glomerulární filtrační bariéra je ve většině případů NS narušena poškozením, jehož příčina dosud není objasněna. Spekuluje se o vlivu cirkulujících faktorů, možná cytokinů produkovaných imunitními buňkami, o přímém efektu T lymfocytů na podocyt a dalších imunitních vlivech (van den Berg and Weening 2004). Všechny důkazy jsou zatím pouze nepřímé. Tyto formy s nevysvětlitelnou patofyziologií se označují jako **idiopatický NS**. S rozvojem metod molekulární genetiky se postupně z této skupiny vyčlenily formy NS způsobené mutacemi v genech pro strukturní a regulační proteiny šterbinové membrány a podocytů (Niaudet 2004; Machuca, Benoit et al. 2010). Na těchto **geneticky podmíněných** formách NS se nepodílí imunopatologická reakce a NS je způsoben strukturní poruchou proteinů filtrační membrány. V současné době je známo jedenáct genů, jejichž mutace způsobují monogenní formy NS. Existuje ovšem neostrá hranice a k těmto jedenácti kauzálním genům by šli připojit další genetické změny, které vedou k nemocem kde je též vyjádřen NS (například některé komplexní syndromy či poruchy genetické mitochondriálního metabolismu) (Barisoni, Schnaper et al. 2009). Nejdéle známý je kongenitální NS finského typu (mutace v genu *NPHS1*). Dalšími geneticky podmíněnými formami jsou autozomálně recesivní kortikorezistentní NS (*NPHS2* gen), nefrotický syndrom typ 3 (gen *NPHS3/PLCE1*), Denys-Drashův syndrom a Frasierův syndrom způsobené mutací v regulačním genu *WT1*. Piersonův syndrom (*LAMB2* gen), NS způsobený mutací v genu *CD2AP* a dva nejrecentnější geny s extrémně vzácným výskytem (*PTPRO* a *MYO1E*). U adolescentů a dospělých pacientů se navíc vyskytují dědičné formy NS s fokálně segmentální glomerulosklerózou způsobené mutacemi v genech *ACTN4*, *TRPC6* a *INF2*. Popis jednotlivých genů a jejich funkce a patofyziologie vzniku NS je rozvedena v samostatné podkapitole (str. 17).

Klinicky se nefrotický syndrom rozděluje podle odpovědi na iniciační kortikosteroidní terapii na kortikosenzitivní a kortikorezistentní. Většina dětských pacientů s NS zareaguje na

iniciální léčbu kortikoidy navozením remise a trvalým vymizením proteinurie (Abeyagunawardena 2005). Tyto formy se označují jako kortikosenzitivní a mají relativně dobrou prognózu. Okolo 20-30% pacientů ale na iniciální kortikoidní léčbu nezareaguje. Tato kortikorezistentní forma onemocnění má mnohem závažnější prognózu a často progreduje do chronické renální insuficience až selhání (Hinkes, Mucha et al. 2007; Hinkes, Vlangos et al. 2008; Buscher, Kranz et al. 2010). Současné léčebné schéma nebere dostatečně v úvahu geneticky podmíněné formy kortikorezistentního NS (Ehrich, Geerlings et al. 2007; Buscher and Weber 2012). Všichni kortikorezistentní pacienti mají být léčeni kortikoidy po dlouhou dobu, protože existuje možnost, že u některých forem bude přece jen navozena remise. Při dlouhodobé kortikorezistenci se také zkouší léčba dalšími imunosupresivy (cyklosporin, takrolimus, mykofenolát mofetil), eventuálně plazmaferéza s různou, většinou však malou úspěšností dosažení remise (Hodson, Willis et al. 2007; Hodson and Alexander 2008; Hodson and Craig 2008; Hodson, Willis et al. 2008; Hodson, Willis et al. 2010).

Všechny známé geneticky podmíněné formy NS jsou kortikorezistentní a téměř vždy rezistentní i k dalším imunosupresivům jako např. cyklofosfamidu nebo cyklosporinu (Ruf, Lichtenberger et al. 2004). U naprosté většiny geneticky podmíněných NS je tedy všechna tato terapie neúčinná a neúčelná a zatěžuje pacienta velkým množstvím nežádoucích účinků (Ruf, Lichtenberger et al. 2004)., mimo jiné zvýšenou náchylností k infekcím, snížením kostní denzity, zpomalením růstu, kataraktou, glaukomem, arteriální hypertenzí nebo nefrotoxitou cyklosporinu (Hodson, Willis et al. 2008; Hodson, Willis et al. 2010). Průkazem genetické etiologie onemocnění se dá této neúčelné terapii vyhnout a ušetřit tak pacienty těchto závažných nežádoucích účinků.

Biopsie ledviny je v současné době indikována u všech pacientů s kortikorezistentním NS a u většiny pacientů s často relabujícím nebo kortikodependentním NS. Histologický obraz však bohužel neodliší idiopatický od geneticky podmíněného NS.

Všechny formy NS se totiž mohou histologicky projevat jako minimální změny glomerulů (minimal change disease-MCD), fokálně segmentální glomeruloskleróza (FSGS) nebo difuzní mezangiální skleróza (DMS) (Fuchshuber, Gribouval et al. 2001; Mucha, Ozaltin et al. 2006; Lowik, Groenen et al. 2009). Biopsie ledviny tedy neodliší genetické formy NS od idiopatických a nemůže tedy v diferenciální diagnostice idiopatických a geneticky podmíněných forem nahradit molekulárně genetické vyšetření. Z toho důvodu je již v současné době doporučováno provést molekulárně genetické vyšetření všem dětem

s kortikorezistentním NS, aby se vyloučily genetické formy, zabránilo se další zbytečné léčbě a určila se prognóza onemocnění, riziko NS pro další členy rodiny a riziko rekurence NS po případné transplantaci ledviny (Buscher and Weber 2012), (Jaffer, Ahmed et al. 2011).

Je prokázáno, že zastoupení genetických forem je různé v různých etnických populacích (Ozer, Aksu et al. 2004; Sako, Nakanishi et al. 2005; Hinkes, Mucha et al. 2007; Li, Ding et al. 2010; Machuca, Benoit et al. 2010). V populaci českých dětí zatím nebyl výskyt genetických forem NS publikován, lze ale předpokládat, že výskyt odpovídá evropské populaci. U dětí do jednoho roku věku (infantilní NS) tvoří v evropské populaci geneticky podmíněné formy 43-75% případů nefrotického syndromu, v závislosti na etnické příslušnosti (Hinkes, Mucha et al. 2007). V celém dětském věku je to pak 20-30% (Ruf, Lichtenberger et al. 2004). Největší zastoupení mají mutace v genu *NPHS2* (10-25% případů) (Ruf, Lichtenberger et al. 2004) a genu *WT1* (3-7% případů) (Mucha, Ozaltin et al. 2006).

Prognóza všech těchto pacientů je výrazně horší než u pacientů s idiopatickým NS a relativně časně progredují do chronické renální insuficience a dospívají do terminálního chronického selhání ledvin většinou ještě v dětském věku. Pozitivním zjištěním je fakt, že geneticky podmíněné formy, na rozdíl od idiopatických forem s obrazem FSGS, nerekurují v transplantované ledvině (Ruf, Lichtenberger et al. 2004; Jungraithmayr, Hofer et al. 2011).

Geny kódující nejvýznamnější proteiny zajišťující funkci filtrační membrány

***NPHS1* (nefrinový gen)**

Tento gen (**NePHrotic Syndrome 1**=*NPHS1*) ležící na dlouhém raménku chromozomu 19 kóduje protein zvaný nefrin. Nefrin komunikuje s dalšími proteiny štěrbinové membrány a zajišťuje funkčnost filtrační bariéry. Jedná se o první popsaný geneticky podložený nefrotický syndrom (Kestila, Lenkkeri et al. 1998). Ve finské populaci byly popsány dvě nejčastější mutace předčasně ukončující syntézu nefrinu (fin-minor a fin-major) zodpovědné za rozvoj NS, každá s různě závažně vyjádřenými příznaky. Choroba se dědí **autozomálně recesivně** a je nejvíce rozšířena ve Finsku (incidence 1:10 000 živě narozených), proto se také označuje jako **kongenitální nefrotický syndrom finského typu** (Lenkkeri, Mannikko et al. 1999). Klinicky se manifestuje v novorozeneckém nebo časném kojeneckém věku (kongenitální NS) a někdy i prenatálně. Průběh je těžký s extrémně vysokými ztrátami proteinů do moči. Děti jsou ohroženy zejména následnou hypogamaglobulinémií s rizikem septických komplikací,

kteřé jsou nejčastější příčinou úmrtí dětí s kongenitálním NS finského typu, častější než chronické selhání ledvin (Patrakka, Kestila et al. 2000). Proto je standardně doporučovanou léčbou časná jednostranná či oboustranná nefrektomie ke snížení či úplnému zamezení ztrát bílkovin do moči a následná léčba peritoneální dialýzou až do doby, kdy je možná transplantace ledviny. I ta ovšem zvláště u nejtěžších mutací není řešením, jelikož více než třetina pacientů vykazuje rekurenci ve štěpu pravděpodobně z důvodu přítomnosti protilátek proti nefrinu. Menší změny v genu (missense mutace) bývají spojovány s rozvojem NS v dětském věku s o něco méně těžkým průběhem (Lenkkeri, Mannikko et al. 1999; Patrakka, Kestila et al. 2000; Hinkes, Mucha et al. 2007).

***NPHS2* (podocinový gen)**

Gen *NPHS2* leží na 1. chromozomu kóduje bílkovinu podocin. Podocin je protein z rodiny stomatinů, exprimovaný pouze v ledvině a embryonálním myokardu (Ruf, Lichtenberger et al. 2004). Podílí se na fetálním vývoji ledviny a má zcela zásadní úlohu v membránové signalizaci podocytů. Váže se s nefrinem a je zodpovědná za jeho správné umístění a napojení na membránu podocytu v místě tzv. lipidových raftů (Liu, Done et al. 2004). Mutace v tomto genu způsobují **autozomálně recesivní kortikorezistentní NS** (Boute, Gribouval et al. 2000). Spektrum mutací je velmi pestré a stejně tak i histologický obraz, který může vykazovat jak FSGS, tak MCD. Zatím nebyla objevena korelace mezi různými mutacemi a histologickým obrazem (minimální změny či FSGS) (Schultheiss, Ruf et al. 2004). Mutace v *NPHS2* genu jsou zodpovědné u evropské populace za cca 30% případů výskytu steroidrezistentního NS (Ruf, Lichtenberger et al. 2004; Hinkes, Mucha et al. 2007). Jedná se tedy o nejčastější genetickou formu NS v evropské populaci mimo Finsko. Klinicky se vždy projevuje kortikorezistentním NS. První projevy se objevují většinou v předškolním věku, nejsou vzácné ani novorozenecké nebo kojenecké manifestace. Věk prvních projevů koreluje s typem mutace. Mutace, které předčasně ukončují syntézu proteinu, a mutace R138Q v homozygotním stavu mají časnější manifestaci (Hinkes, Vlangos et al. 2008). Zatím nebyla nalezena korelace mezi typem mutace a rychlostí progresu choroby (Schultheiss, Ruf et al. 2004). Pacienti pozvolna spějí do chronické renální insuficience a selhání. Veškerá kortikosteroidní léčba je u těchto pacientů neúčinná. Jedinou možnou léčbou je

transplantace ledvin, kdy tito pacienti jsou téměř bez rizika rekurence NS ve štěpu (Jungraithmayr, Hofer et al. 2011).

NPHS3 (PLCE1)

Tento gen leží na chromozomu 10 a kóduje enzym fosfolipázu C-epsilon (PLCE), která se podílí na nitrobuňkové signalizaci generováním druhých poslů. Mutace, které způsobí předčasné ukončení syntézy proteinu, se projevují histologickým obrazem difuzní mezangiální sklerózy (DMS) (Hinkes, Wiggins et al. 2006; Gbadegesin, Hinkes et al. 2008; Hinkes 2008). Bylo zjištěno, že skoro třetina případů DMS u dětí s NS je způsobena mutací v *PLCE1* genu a je tedy třikrát častější genetickou příčinou DMS u dětí než mutace v genu *WT*. (Gbadegesin, Hinkes et al. 2008). Missense mutace se projevují spíše obrazem FSGS. Klinicky nejzajímavější na tomto geneticky podmíněném NS je fakt, že existuje popsáný případ pozitivní odpovědi na kortikoidy (kortikosenzitivní NS) i přes velmi závažnou mutaci, která u příbuzných způsobila NS s DMS. Kortikoidy zde nemají pravděpodobně imunopresivní efekt, ale spekuluje se o přímém ovlivnění metabolismu podocytů (Hinkes, Wiggins et al. 2006).

WT1 (Wilms tumor 1)

WT1 gen kóduje protein s motivem zinkového prstu vážící se na DNA, který funguje jako transkripční faktor. Je zcela zásadní pro normální vývoj urogenitálního ústrojí a mezotelu. Jeho některé mutace způsobují embryonální nefroblastom, známý jako Wilmsův tumor. Mutace lokalizované výlučně v exonech 8 a 9 způsobují též rozvoj nefrotického syndromu (Mucha, Ozaltin et al. 2006) a jsou zodpovědné za asi 9% NS s obrazem DMS (Gbadegesin, Hinkes et al. 2008). Mutace jsou velmi různorodé a vznikají většinou de novo. Familiární formy vykazují na rozdíl od přešlých genů **autozomálně dominantní dědičnost**. Kombinace výskytu Wilmsova tumoru, nefrotického syndromu s rozvojem chronického renálního selhání a mužského pseudohermafroditismu se označuje jako Denys-Drashův syndrom nebo Frasierův syndrom (Pelletier, Bruening et al. 1991; Coppes, Liefers et al. 1992). Dnes převládá názor, že u pacientů s mutací *WT1* genu, u nichž hrozí časný vznik Wilmsova tumoru, by měla být v době progrese onemocnění do stádia chronického selhání ledvin indikována oboustranná nefrektomie a zahájena dialyzační léčba s následnou transplantací.

Na načasování doby nefrektomie jsou různé názory. Většinou je nefrektomie indikována až při zahájení dialyzační léčby (Hu, Zhang et al. 2004).

LAMB2

Jedná se o gen, jehož mutace způsobují Piersonův syndrom. Tento syndrom je charakterizován nefrotickým syndromem, těžkou mentální retardací a typickým postižením oka s mikrokorií. Gen kóduje protein laminin β -2. Nefrotický syndrom je velmi těžký, srovnatelný s finským typem nefrotického syndromu. Postižení většinou umírají v novorozeneckém nebo kojeneckém věku (Zenker, Aigner et al. 2004).

CD2AP

Jedná se o delší dobu známý gen, původně identifikovaný jako exprimovaný v T-lymfocytech. Později bylo zjištěno, že myší knock-out s vyřazeným genem *CD2AP* v heterozygotním stavu vyvinou renální léze histologicky srovnatelné s lidskou FSGS. V ledvinách CD2 asociovaný protein kódovaný stejnojmenným genem přímo interaguje s nefrinem a f-aktinem. Teprve v nedávné době byl objeven první pacient s homozygotní mutací v tomto genu, u kterého se vyvinul těžký nefrotický syndrom v dětském věku s obrazem FSGS (Lowik, Groenen et al. 2007).

ACTN4

Tento gen kóduje protein, který je součástí aktinového cytoskeletu a váže se s f-aktinem. Aktinová cytoskeletální síť je nutná pro správnou prostorovou konfiguraci buněk a jejich pohyb. Toto přesné prostorové uspořádání podocytů a jejich výběžků pravděpodobně umožňuje korektní funkci štěrbinové membrány (Henderson, Alexander et al. 2009). Mutace v tomto genu způsobují nefrotický syndrom s histologickým obrazem FSGS, který se manifestuje v mladém věku. Familiární formy mají **autozomálně dominantní** dědičnost a označují se jako familiární FSGS typ 1 (Kaplan, Kim et al. 2000).

TRPC6

Další gen zodpovědný za rozvoj nefrotického syndromu s obrazem FSGS kóduje kalciový kanál (obr 1). Mutace způsobují vyšší aktivaci tohoto kanálu a zvýšený vstup kalcia do podocytů. Přesné vysvětlení, jak může mutace v tomto kanálu způsobit glomerulosklerózu, není zatím známo (Winn, Daskalakis et al. 2006). Onemocnění je označováno jako familiární FSGS typ 2. Manifestuje se podobně jako familiární FSGS typ 1 až v mladém věku (Winn, Daskalakis et al. 2006; Mukerji, Damodaran et al. 2007).

INF2

Tento gen byl zachycen v kohortách dospělých pacientů s NS. Jeho mutace způsobují dědičný nefrotický syndrom s obrazem FSGS. Gen kóduje protein formin. Formin funguje jako regulační molekula při polymerizaci aktinu v podocytech. NS se u těchto pacientů většinou plně nerozvíjí a pacienti mají většinou vyjádřenou mírnou až střední proteinurii. K chronické renální insuficienci dochází až mezi 20. a 50. rokem života (Brown, Schlondorff et al. 2010).

PTPRO

Gen *PTPRO* kóduje tyrozin fosfatázu na apikální membráně podocytů, která kontroluje paracelurání transport a remodelaci aktinového cytoskeletu podocyty a řídí fosforylaci neurinu a ZO1, komponent esenciálních pro funkci filtrační membrány. Mutace v tomto genu byly nalezeny jako raritní u dvou rodin tureckého původu. Zajímavostí je částečný efekt imunosupresiv, konkrétně kortikoidů a cyklosporinu u těchto pacientů (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011).

MYO1E

Zatím poslední gen asociovaný s nefrotickým syndromem. Kóduje myosin I, což je s membránou asociovaný typ myosinu, vyskytující se v podocytech. Tento gen byl nalezen jako raritní u 2 rodin, jedné původem z Itálie a druhé z Turecka. Fenotypické projevy jsou typické pro kortikorezistentní nefrotický syndrom, biopticky se projevil u popsaných pacientů obrazem FSGS (Mele, Iatropoulos et al. 2011).

Patofyziologie rozvoje hemolyticko-uremického syndromu (HUS)

HUS je popisným syndromem identifikovaný triádou akutního renálního selhání, trombocytopenie a neimunní hemolytické anémie (Gasser, Gautier et al. 1955). V současnosti se HUS řadí společně s trombotickou trombocytopenickou purpurou (TTP) a HELLP syndromem pod patofyziologicky shrnující název trombotické mikroangiopatie. Příčinou klinických projevů je totiž značné poškození endotelu glomerulů, drobných arteriol a kapilár. Histologicky jsou léze endotelu shodné u všech těchto tří syndromů. Dochází k otoku endoteliálních buněk, ztrátě jejich krycí funkce, vzniku intravaskulárních trombů s konzumpcí značného množství trombocytů a rozvoji anémie z mechanické destrukce erytrocytů a narušení jejich morfologie při snaze proniknout tromby obturovanými cévami. HUS je pak v krevním obraze charakterizován hemolytickou anémií s anisocytózou, schistocyty až fragmentocyty a trombocytopenií. Při HUS je nejvíce postižen endotel arteriol a glomerulů ledvin.

Incidence HUS se pohybuje u dětí kolem 1-2 případů na 100 000 dětí. HUS je nejčastější příčinou akutního selhání ledvin vyžadujícího léčbu dialýzou u kojenců a batolat (0,3-0,4/100 000 dětí/rok), ((Noris and Remuzzi 2009). HUS se klinicky dělí na takzvaný D+HUS a D-HUS. Tato klasifikace vychází z popisu příznaku prodromálního stadia onemocnění. Typické formě D+HUS předchází kolitida s výskytem krvavého průjmu (z anglického diarrhoea = D), po které následují příznaky hemolytické anémie, trombocytopenie a akutního selhání ledvin. Kromě těchto primárních HUS je známo sekundární poškození s příznaky HUS/TTP asociované s mnoha bakteriálními (pneumokoky) (Copelovitch and Kaplan 2009) či virovými infekcemi (Allen and Licht 2010). Projevy HUS můžou být též nežádoucími účinky některých léků jako cytostatika mitomycinu C či imunosupresiva cyklosporinu (Zakarija and Bennett 2005). HUS může též být paraneoplastickým projevem maligního tumoru, nejčastěji adenokarcinomu (Lesesne, Rothschild et al. 1989). V letošním roce též byla potvrzena spekulovaná asociace HUS s těhotenstvím (Fakhouri, Roumenina et al. 2010).

D+ HUS

Tvoří 90% všech HUS u dětí. Vyskytuje se nejčastěji ve věkové skupině dětí od 3 do 6 let. Patofyziologicky zpočátku nebylo jasné, co přímo tuto formu HUS způsobuje, obviňováno bylo mnoho patogenů a byla nalezena řada asociací HUS s různými bakteriálními a hlavně

virovými infekcemi. Opravdového viníka – určité kmeny E. coli - se podařilo odhalit až po delší době. Dnes je za původce typického HUS považována infekce kmeny E. coli produkujícími shiga- like toxin (dříve vero-cytotoxin), nejčastěji jde o sérotyp O157:H7, ale producentem toxinu jsou i jiné kmeny (např. některé řazené dříve k enteropatogenním E.coli vyvolávajícím závažné dětské průjmy). Prognóza pacientů s D+ HUS je příznivá a případy úmrtí jsou dnes již vzácné (do 5%) (Noris and Remuzzi 2009). Tyto formy nerekurují a četnost přechodu do chronického renálního selhání je nízká, i když existují pacienti s perzistentním renálním postižením i po značném odstupu od vyvolávající infekce (Blahova, Janda et al. 2002). Základem terapie je zvládnutí akutního stavu renálního selhání, dialýza, symptomatická terapie a překlenutí akutní doby než dojde k obnovení funkce ledvin.

Atypický HUS

Atypický HUS (= aHUS, nebo též D- HUS) tvoří cca 10% případů dětí s HUS. (Noris and Remuzzi 2009). Nemá specifický věk manifestace. Vyskytuje se u novorozenců i dospělých. Nepředchází mu většinou prodromální stádium hemoragické kolitidy (i když její přítomnost nevylučuje aHUS). Má většinou výrazně těžší průběh s extrarenálními komplikacemi a jeho dlouhodobá prognóza je také významně horší. Až u 90 % dětí první ataka D-HUS vede k reziduálnímu poškození ledvin a až u 50% progreduje postižení do obrazu chronické renální insuficience a terminálního selhání ledvin, které vyžaduje dlouhodobou léčbu dialýzou nebo jinou eliminační metodou. Navíc 25% případů atypického D-HUS končí fatálně již při první atace (Caprioli, Noris et al. 2006). Některé formy D- HUS často rekurují a to bohužel i po transplantaci ledviny (Loirat and Fremeaux-Bacchi 2008; Noris and Remuzzi 2009; Noris and Remuzzi 2010).

Již od sedmdesátých let se tušilo, že atypický HUS je vyvolán aktivací alternativní cesty komplementu. Konzumpce C3 složky komplementu a normální hladiny C4 složky v séru pacientů s aHUS pro to jasně svědčily (Cameron and Vick 1973). Též histologické nálezy v ledvinách pacientů s aHUS prokazovaly lokální aktivaci komplementu až k jeho lytické složce (depozice C3 v arteriolách a glomerulech a zvýšené množství finální lytické složky C5b-9 v místech intravaskulárních trombů) (Stuhlinger, Kourilsky et al. 1974; Barre, Kaplan et al. 1977).

Přesné důkazy, proč je alternativní složka komplementu takto neregulovatelně stimulována, se objevily až v devadesátých letech díky rozvoji metod molekulární genetiky. S ní přišel přímo skokový nárůst objevů na poli atypického HUS. Do současnosti bylo identifikováno 6 genů, jejichž mutace jsou zodpovědné za familiární a sporadické formy atypického HUS. Prvním objeveným mutovaným genem asociovaným s aHUS byl gen pro regulátor komplementu faktor H (Warwicker, Goodship et al. 1998). Úplný nedostatek či funkční porucha tohoto proteinu vede k nekontrolované aktivaci alternativní cesty komplementu. V rychlém sledu následovaly objevy dalších asociovaných genů. V současné době je známo šest genů, jejichž změny jsou zodpovědné za vznik aHUS (mutace v genech pro faktor H, faktor I, faktor B, MCP/CD46, C3 a thrombomodulin – shrnutí v tabulce 1). Mutace ve všech těchto genech vedou k nekontrolované aktivaci alternativní cesty komplementu přes C3 konvertázu k C5 konvertáze. C5 konvertáza pak aktivuje pozdní složku komplementu až k terminálnímu lytickému komplexu, který destruuje nechráněný endotel. Obnažená subendoteliální matrix pak aktivuje koagulaci a dochází ke vzniku intravaskulárních trombů. Jednotlivé formy aHUS se od sebe značně liší svým průběhem. Mutace v některých genech způsobují velmi závažné vrozené formy HUS s velmi špatnou prognózou (geny pro faktor H, faktor B, C3), jiné mutace, např. v genu MCP, mají lepší prognózu s menším rizikem chronického selhání ledvin a s minimem relapsů po transplantaci ledviny (Loirat and Fremeaux-Bacchi 2008; Noris and Remuzzi 2009; Noris and Remuzzi 2010).

V současnosti diagnostika stojí na molekulárně genetickém vyšetření přímým sekvenováním všech genů asociovaných s aHUS, pečlivé funkční analýze nalezených mutací a komplementové analýze (Roumenina, Loirat et al. 2011). Je známo, že existují pacienti, kteří mají mutaci ve více než jednom genu (tzv. oligogenní etiologie, kdy jsou postiženy dva a někdy i tři s nemocí asociované geny) a tudíž nález mutace v jednom genu není důvodem ukončením hledání mutací v ostatních genech (Esparza-Gordillo, Jorge et al. 2006). V současné době se daří prokázat genetickou anomálii v asociovaných genech až u 70 % pacientů. Většina mutací je heterozygotních a penetrance se zdá být relativně nízká, kolem 50 % (Le Quintrec, Roumenina et al. 2010). Často se najde mutace u jednoho z rodičů či sourozence, který je kompletně zdravý. Tato nízká penetrance nemoci ji vyčleňuje ze standardního konceptu monogenní choroby. Zdá se, že mutace je pouze predisponujícím faktorem a ke spuštění nemoci je nutný další faktor pravděpodobně genetický či z vnějšího prostředí.

Protein	zkratka genu	Zastoupení u aHUS	progrese do CHRI	relaps po Tx ledviny	funkční změna	skriningové vyšetření
Faktor H	<i>CFH</i>	20-30%	70-80%	90%	deficit proteinu či nesprávná interakce s endotelem a aktivovaným C3 a snížená inhibiční kapacita	hladina faktoru H v séru u mutací Typ I
Faktor I	<i>CFI</i>	4-10%	60-70%	80%	snížená hladina faktoru I	hladina faktoru I v séru
MCP/CD46	<i>MCP</i>	10-15%	5-10%	15-20%	nepřítomnost CD46 na povrchu buněk endotelu	vyšetření leukocytů značených CD46 protilátkou pomocí průtokové cytometrie
Faktor B	<i>CFB</i>	1-2%	70%	?	zvýšená aktivita C3 konvertázy	-
C3 komplement	<i>C3</i>	5-10%	60%	50-60%	rezistence k inhibici či tvorba hyperaktivní C3 konvertázy	-
thrombomodulin	<i>THBD</i>	5%	60%	?	snížení inhibiční funkce trombomodulinu	
faktor H related protein 1-4 polymorfismy	<i>CFHR1-4</i>	6%	30%		vznik inhibičních protilátek proti faktoru H u geneticky predisponovaných jedinců	vyšetření protilátek proti faktoru H

Tabulka 1 – přehled genů u atypického HUS Dle: (Warwicker, Goodship et al. 1998; Richards, Kemp et al. 2003; Fremeaux-Bacchi, Dragon-Durey et al. 2004; Goicoechea de Jorge, Harris et al. 2007; Fremeaux-Bacchi, Miller et al. 2008; Delvaeye, Noris et al. 2009; Noris and Remuzzi 2009)

VI. HYPOTÉZA

V české populaci stejně jako v populaci jiných etnik předpokládáme výskyt dětských pacientů s genetickými formami nefrotického syndromu a atypického HUS.

Přesná data o výskytu SRNS v ČR nejsou známa, stejně jako fenotypické projevy jednotlivých mutací, zvláště reakce na různá imunosupresiva. Jelikož veškeré mutace způsobující SRNS působí na úrovni strukturních proteinů, předpokládá se, že imunosupresní léčba u těchto pacientů je 100% neúčinná. Existují ovšem raritní popisy případů pacientů, u kterých došlo k částečné či úplné remisi onemocnění po podávání některých imunosupresiv. Tito pacienti by mohli být odhaleni i v naší skupině a jejich detailní charakteristika by mohla nasměrovat pátrání po medikamentech přímo ovlivňujících funkci glomerulárního filtru.

U atypického HUS, jako extrémně vzácného onemocnění, předpokládáme raritní výskyt mutací v genech pro proteiny a regulátory alternativní cesty komplementu v ČR. Zaměřili jsme se tedy hlavně na retrospektivní analýzy pacientů s familiárním výskytem, kde je genetický podklad významně pravděpodobnější.

Celkovým cílem je též identifikovat specifické fenotypy a genotypy těchto vzácných onemocnění pro ČR a stanovit, zda výskyt a patofyziologie těchto chorob je shodná s evropskou populací, či zda existují jistá specifika české populace v rámci SRNS či aHUS, jako je tomu např. v populaci finské.

VII. CÍLE

- 1) Zjistit zastoupení geneticky podmíněných kortikorezistentních forem v populaci českých dětí s nefrotickým syndromem.
- 2) Určit četnost mutací v genech *NPHS2*, *NPHS1* a *WT.1*
- 3) Stanovit, jestli je doposud uznávaná teorie o naprosté rezistenci k standardním imunosupresivům pravdivá v našem souboru pacientů.
- 4) U pacientů s geneticky prokázaným NS stanovit individuální fenotyp a popsat patofyziologii vzniku a progresu narušení filtrační membrány ledvin.
- 5) U pacientů s příznaky familiárního atypického HUS s manifestací v dětském věku vyšetřit nejčastěji mutované geny *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3* a určit funkční významnost nalezených mutací.

VIII. METODY

Vytvoření kohorty pacientů s kortikorezistentním NS

Nefrotický syndrom je závažný klinický soubor příznaků a u dětí si vyžádá hospitalizaci. V průběhu 5 let jsme zachytili všechny prvně manifestované pacienty z území ČR ve věku 0-18 let s příznaky kortikorezistentního nefrotického syndromu.

Diagnostika nefrotického syndromu je pro náš soubor laboratorně definována jako přítomnost nefrotické proteinurie nad 1g/24 hod/1,73 m² a hypoalbuminemie pod 25g/l.

Kortikorezistence je pro náš soubor definována jako primární rezistence k standardnímu protokolu léčby idiopatického nefrotického syndromu dle APN protokolu - tj. nenavození remise po podávání 60mg/m² kortikoidů po dobu 6 týdnů (Ehrich and Brodehl 1993; Hodson and Alexander 2008).

Fenotypická data byla shromážděna pomocí dotazníku vyplněného ošetřujícími lékaři pacienta. U všech pacientů s kortikorezistentním nefrotickým syndromem se rutinně provádí biopsie ledviny.

Molekulárně genetické vyšetření genů *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1* u pacientů se SRNS

Molekulárně genetické vyšetření bylo provedeno přímým sekvenováním genů Sangerovou dideoxynukleotidovou metodou ve všech kódujících úsecích a exon/intronových přechodech zkoumaných genů *NPHS1* a *NPHS2* a v exonech 8,9 genu *WT1*.

DNA byla izolována z 2,5 -10 ml nesrážlivé krve (EDTA či heparin) pomocí vysolování (Miller, Dykes et al. 1988).

Úseky vyšetřovaných genů byly amplifikovány pomocí PCR se specifickými primery: pro gen *NPHS2* byly použity vlastní primery navržené za asistence programu Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000). K sekvenování exonů 8 a 9 genu *WT1* byly použity upravené primery navržené podle dříve publikovaných primerů (Ruf, Schultheiss et al. 2004), stejně jako u genu *NPHS1* (Lenkkeri, Mannikko et al. 1999).

K amplifikaci jsme použili **Taq PCR Core Kit** (Qiagen, Hilden, Spolková republika Německo). Ve směsi jsme používali přídavek Q-roztoku pro zajištění lepší amplifikace složitých úseků

bohatých na GC. Použili jsme Coral Buffer dodávaný s kitem, umožňující přímé nanášení produktu pro kontrolu na agarozovém gelu.

Program pro automatický cycler amplifikaci PCR byl použit stejný pro všechny úseky genů:

Iniciální denaturace 96°C, 5 minut

Denaturace 95°C, 30 sekund

Anealing (Snižování teploty o 0,5°C na cyklus z 63°C na 56°C), 30 sekund

Elongace 72°C, 30 sekund

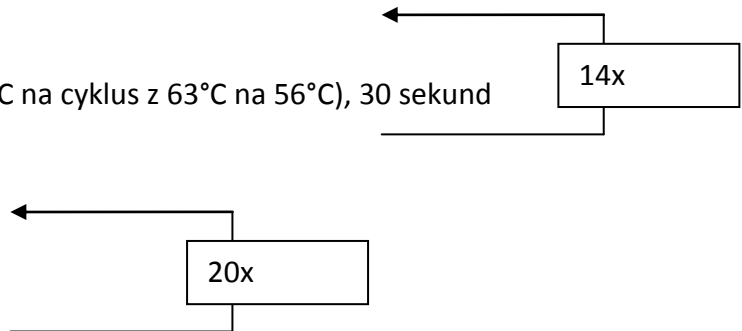
Denaturace 95°C, 30 sekund

Anealing 56°C, 30 sekund

Elongace 72°C, 30 sekund

Ukončovací elongace 72°C, 5 minut

Zchlazení na 4°C



Vizualizace a kontrola produktů amplifikace byla provedena elektroforézou na standardním 1% agarozovém gelu. K vizualizaci DNA bylo použito barvivo GelRed (Biotium, Hayward, USA). Snímky gelů byly pořízeny digitálním fotoaparátem na UV transluminátoru při vlnové délce 312 nm.

PCR produkty byly přečištěny automatizovaným systémem využívající magnetické partikule AmPure (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter Company , Beverly, USA) pomocí robotu Biomek 3000 (Beckman Coulter Company , Beverly, USA).

Sekvenování probíhalo pomocí primerů použitých při PCR amplifikaci pomocí komerčního kitu BigDye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Program pro nastavení automatického cycleru pro reakci dle doporučení výrobce. K přečištění sekvenčních produktů byl použit automatizovaný systém využívající magnetické partikule CleanSEQ na stroji Biomek (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter Company , Beverly, USA).

Čtení produktů sekvenace bylo provedeno na automatickém kapilárním sekvenátoru Applied Biosystems ABi 3130x. Čtení elektroforeogramů a hledání mutací bylo prováděno pomocí software Mutation Surveyor 3.1 (SoftGenetics, LLC State College, USA).

<i>NPHS2</i> (podocin), 5-3 sekvence primerů	
Podocin exon 1F	gtccacagctccaccaagac
Podocin exon 1R	ttgctcaccatagcagggtg
Podocin exon 2 F	AGTTGTGCCAACTCCAATACC
Podocin exon 2 R	GCAGATGAACGAGACATAGCC
Podocin exon 3 F	TTATGCCAAGGCCTTTTGAAGAC
Podocin exon 3 R	CCATATTACAAATCTGCATGGGMTG
Podocin exon 4F	GAAAAGTAATGTAGTGTGCAACCTG
Podocin exon 4R	CGGTAGGTAGACCATGGAAA
Podocin exon 5F	TGCGGAGAAAATTCACCTTG
Podocin exon 5R	AGGGATGGAAGTGGCCATAG
Podocin exon 7F	GACAGCAGTAGAGAGGCTTGC
Podocin exon 7R	CTTCTGCCAGTGCCTAATG
Podocin exon 8F	CTGTCTCCCAGCTCAAGA
Podocin exon 8R	CAGGGAATGAGGACAGAGTG
<i>WT1</i>, 5-3 sekvence primerů	
Wt1 exon 8 F	agctccagcgaagtgcctta
Wt1 exon 8R	cctagcccaaggaacacag
Wt1 exon 9F	cctcactgtgccacattgt
Wt1 exon 9R	tccctctcatcacaatttcattc

Tabulka 2 – primery pro amplifikaci a sekvenaci genů *NPHS2* a *WT1*

Vyšetření genů *MCP*, *CFI*, *CFH*, *C3* u retrospektivně zjištěných pacientů s aHUS

Vyšetřeno bylo celkem 10 retrospektivně vybraných pacientů s příznaky atypického HUS manifestovaného v dětství, kde byla vyloučena dědičná trombotická trombocytopenická purpura a autoimunitní HUS. DNA byla extrahovaná z leukocytů periferní krve. Jednotlivé exony genů byly amplifikovány intronickými primery. Pro geny *CFI* a *CFH* byly použity publikované primery (Richards, Buddles et al. 2001; Fremeaux-Bacchi, Moulton et al. 2006). Geny *MCP* a *C3* byly amplifikovány vlastními primery (detailní tabulka všech 104 primerů v naší publikaci (Provaznikova, Rittich et al. 2012)). Stejně primery byly užity pro sekvenční reakci. Geny *MCP*, *CFI*, *CFH* byly sekvenovány pomocí komerčního kitu DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter Company, Beverly, USA). Čtení produktů sekvence bylo provedeno na automatickém kapilárním sekvenátoru CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter

Company, Beverly, USA). Pro sekvenování *C3* genu byl použit sekvenční kit BigDye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Program pro nastavení automatického cycleru pro reakci dle doporučení výrobce. K přečištění sekvenčních produktů byl použit automatizovaný systém využívající magnetické partikule CleanSEQ na stroji Biomek (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter Company, Beverly, USA). Čtení produktů sekvenace bylo provedeno na automatickém kapilárním sekvenátoru Applied Biosystems ABi 3130x. Čtení elektroforeogramů a hledání mutací bylo prováděno pomocí software Mutation Surveyor 3.1 (SoftGenetics, LLC State College, USA).

Funkční studie mutací v *MCP* genu

Funkční analýza mutací v *MCP* byla provedena sledováním exprese produktu *MCP* genu, molekuly CD46 na granulocytech periferní krve nosičů mutace pomocí průtokové cytometrie (FACSCanto, BD Biosciences, San Jose, USA). 100 µl plné krve bylo inkubováno ve tmě při pokojové teplotě na 15 minut s 20 µl protilátky CD46-FITC (clone E4.3, BD Biosciences, San Jose, USA). Červené krvinky byly lysovány chloridem amonným. Jako isotyp byla použita FITC konjugovaná myší protilátka IgG1.

IX. VÝSLEDKY

Cíl 1 – Incidence SRNS u dětí v ČR

V období od října 2007 do března 2012 jsme identifikovali **32** dětských pacientů s příznaky kortikorezistentního nefrotického syndromu. 10 pacientů bylo zachyceno ve fakultní nemocnici v Motole, 22 bylo zasláno lékaři z jiných českých pracovišť.

Roční incidence steroidrezistentního nefrotického syndromu pro Českou republiku je tedy **3,7 pacientů na 1 milion** dětí za rok. Genetickou příčinu onemocnění jsme našli u celkem **sedmi** dětí, tedy **22%**.

Retrospektivně jsme z údajů o dětských pacientech mezi lety 2000-2007 identifikovali dalších **9** pacientů nesoucích mutaci v genech *WT1* či *NPHS2* způsobující kortikorezistentní nefrotický syndrom.

Cíl 2 – Zastoupení jednotlivých mutací u dětí se SRNS v ČR

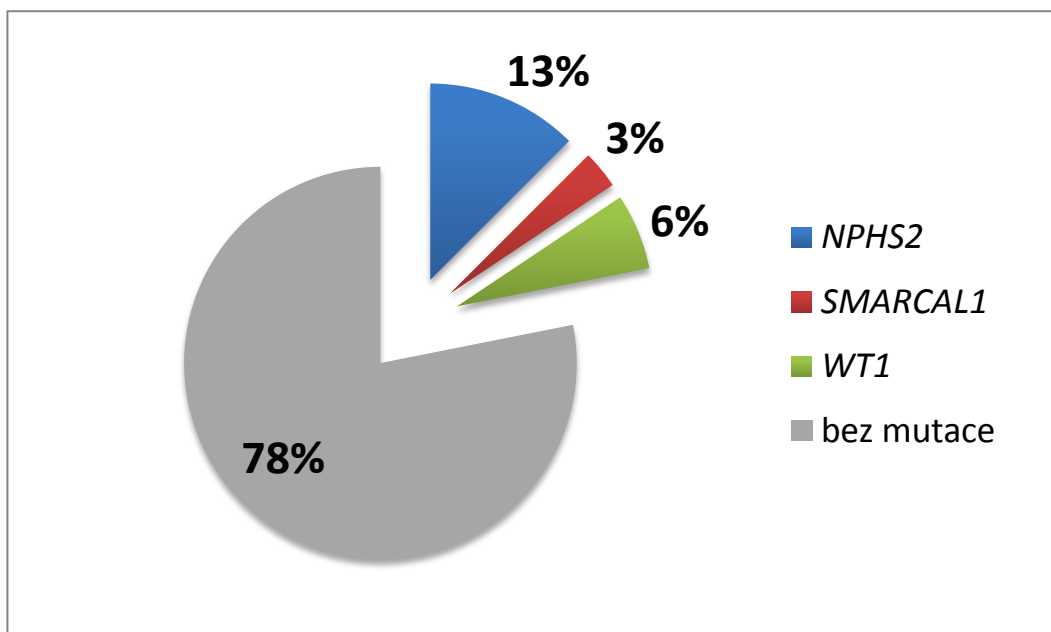
V kohortě dětských pacientů z ČR jsme identifikovali jako příčinu onemocnění kortikorezistentním nefrotickým syndromem mutaci v genech *NPHS2* či *WT1* celkem u **sedmi** dětí (**22%**). Procentuální zastoupení jednotlivých mutovaných genů shrnuje obrázek 2.

Mutace v genu *NPHS2* byla nalezena u **4** pacientů (13%). Dva pacienti měli známou homozygotní mutaci R138Q. Další pacientka byla složeným heterozygotem pro známou a dosud nepopsanou stop codon read-through mutaci X384Q. U čtvrtého pacienta jsme našli neznámou heterozygotní mutaci A318T kombinovanou s polymorfismem R229Q. Polymorfismus R229Q v heterozygotním stavu byl přítomen u dalších dvou pacientů bez mutace.

Neznámou heterozygotní mutaci v genu *WT1* jsme našli u dvojčat s projevy kongenitálního kortikorezistentního nefrotického syndromu.

Pacient identifikovaný zpočátku klinicky jako idiopatický nefrotický syndrom vyvinul v průběhu nemoci příznaky spojované se Schimkeho imunooséální dysplazií. Molekulární analýza v zahraničí u něj prokázala kauzální mutaci v genu *SMARCAL1*.

V genu *NPHS1* jsme nenalezli mutaci u žádného z vyšetřovaných dětí.



Obrázek 2 - Graf shrnující procentuální výskyt mutací v kohortě dětí se SRNS

Cíl 3 – Odpověď pacientů se SRNS na léčbu dalšími imunosupresivy

Všichni pacienti se SRNS byli iniciálně léčeni kortikoidy dle protokolu APN. Žádný z pacientů nedosáhl kompletní remise onemocnění při standardní kortikoidní terapii.

U některých pacientů byla podávána další imunosupresní terapie, nejčastěji cyklosporin A (CSA, u sedmi dětí) následovaný cyklofosfamidem (CF, u třech dětí) a mykofenolátem (MMF, dvě děti). Pouze anekdoticky, v jediném případě byly použité jiné imunosupresivní léky - monoklonální protilátka proti CD20 lymfocytům rituximab (RTX).

Parciální remise onemocnění nastala nejčastěji po cyklosporinu (celkem osm ze všech 32 pacientů se SRNS, 25%), následované mykofenolátem u dvou pacientů. U dvou pacientů bylo dosaženo částečné remise onemocnění při prodlouženém podávání kortikoidů. Úplné remise onemocnění nebylo dosaženo při použití žádného imunosupresiva. Ve skupině sedmi pacientů s mutacemi byli tři pacienti (43%), kteří dosáhli imunosupresivní léčbou cyklosporinem částečné remise. Prvního popsaného pacienta s tímto fenotypem (Pacient 5) v našem souboru jsme publikovali jako první skupina na světě (Malina, Cinek et al. 2009). Ve skupině 25 pacientů bez mutací bylo 5 pacientů (20%, statisticky nesignifikantní rozdíl oproti pacientům s mutacemi) s částečnou remisí po cyklosporinu nebo mykofenolátu.

Souhrn dat o pacientech, údaje o histologických nálezech a léčbě jsou uvedena v tabulce 3.

Pacient	Pohlaví	Biopsie	Genotyp	Další léčba	Parciální remise
1	M	MCD	-		
2	Ž	FSGS	-		
3	Ž	DMS	-		
4	M	N/A	-		
5	M	MCD	<i>NPHS2: R138Q/Q</i>		CSA
6	Ž	N/A	-		
7	Ž	FSGS	-		
8	M	N/A	-		
9	M	MCD	-	CSA,CF,M	CSA,MMF,
10	Ž	MCD	-	-	-
11	MI	FSGS	-		CSA
12	M	MCD	-	-	-
13	Ž	FSGS	-	CSA	CSA
14	Ž	FSGS	-	CF	-
15	M	FSGS	-	-	-
16	M	MCD	-	-	-
17	Ž	N/A	-		
18	Ž	N/A	-		
19	Ž	DMS	<i>WT1: R366R/P</i>	-	-
20	Ž	DMS	<i>WT1: R366R/P</i>	-	-
21	Ž	N/A	<i>NPHS2: R229R/Q</i>		
22	M	MCD	-	CSA	CSA
23	Ž	N/A	-	CSA	(kortikoidy)
24	Ž	MCD	<i>NPHS2: R138R/Q, X384X/Q</i>	CSA	CSA
25	M	N/A	-	-	-
26	Ž	FSGS	<i>NPHS2: R138Q/Q</i>	CSA	-
27	Ž	MCD	-		
28	Ž	FSGS	-		
29	Ž	N/A	-		
30	M	N/A	-		MMF, CSA
31	M	FSGS	<i>NPHS2: A318A/T, R229R/Q</i>	CF,CSA	CSA
32	M	FSGS	<i>NPHS2: R229R/Q</i>		

Tabulka 3- Souhrn genotypických a fenotypických informací o pacientech se SRNS

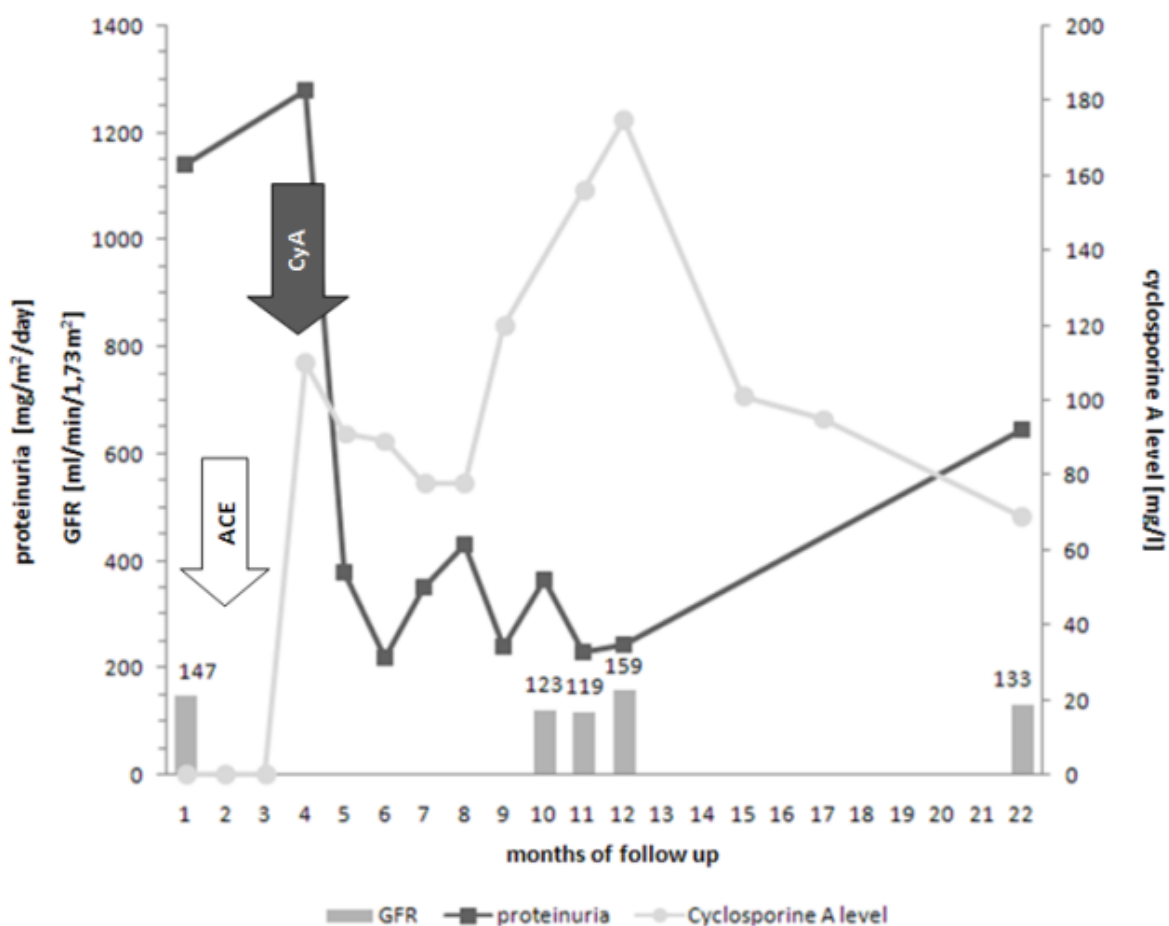
Pacienti nesoucí mutace označeni šedým proložením a tučným písmem.

M- muž, Ž- žena, MCD- minimální změny glomerulů, FSGS- fokálně segmentální glomeruloskeroza, CSA – cyklosporin, MMF- mykofenolát mofetil, CF – cyklofosfamid, RTX – rituximab. N/A nebylo provedeno či neúplná data

Cíl 4 - Detailní fenotypická charakteristika pacientů nesoucích mutace

Pacient 5

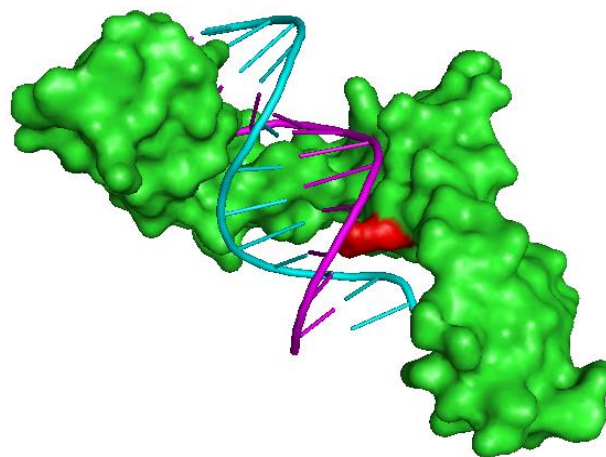
Nyní osmiletý pacient s nefrotickým syndromem, prvně manifestovaný izolovanou proteinurií v 18 měsících věku po atace akutní laryngitidy. Iniciální léčba kortikoidy byla neúčinná a do terapie byl nasazen cyklosporin A. V biopsii ledviny byl nalezen pouze obraz minimálních změn glomeruů. Molekulárně genetické vyšetření zjistilo známou homozygotní mutaci R138Q v genu *NPHS2* pro podocin. Pacient po nasazení cyklosporinu A dosáhl parciální remise onemocnění a do současnosti má zachovanou normální glomerulární funkci ledvin. Kompletní kasuistika pacienta je rozvedena v článku v přílohách (Malina, Cinek et al. 2009). Průběh onemocnění pacienta a efekt léčby cyklosporinem je uveden na obrázku 3.



Obrázek 3- Efekt cyklosporinu na dosažení parciální remise u Pacienta 5

Pacientky 19 a 20

Pacientky 19 a 20 byla dvojčata s kongenitální prezentací nefrotického syndromu na podkladě heterozygotní mutace R366P v genu *WT1*. Tato mutace nebyla dosud popsána, ale ve stejném místě byly nalezeny mutace nahrazující wild type aminokyselinu jinou aminokyselinou než v našem případě (R366C, R366H, R366L) (Pelletier, Bruening et al. 1991; Tsuda, Sakiyama et al. 1996; Jeanpierre, Denamur et al. 1998). Mutace leží v oblasti kódující druhý zinkový prst *WT1* molekuly v místě, kde přímo interaguje s DNA (viz obrázek 4). Klinický průběh u obou dvojčat byl velmi nepříznivý a dvojčata zemřela ve věku 23 a 13 měsíců. Tento případ byl jedním z několika málo popsaných vzácných případů dvojčat s *WT1* mutací (Dharnidharka, Ruteshouser et al. 2001; Furtado, Pysker et al. 2011) a kongenitálním nefrotickým syndromem a byl námi publikován (Fencel, Malina et al. 2012). Detaily kasuistiky jsou rozvedeny v článku v přílohách (Fencel, Malina et al. 2012). Model části krystalu *WT1* proteinu s vyznačenou mutací je uveden na obrázku č. 4 (model z databáze proteinových struktur PDB.org, k vizualizaci použit program PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, USA))



Obrázek 4 - Model 2. zinkového prstu *WT1* proteinu (zeleně), v interakci s DNA (fialová a modrá). Mutace R366P vyznačena červeně

Pacientka 24

Pacientka měla první proteinurii zachycenou v jednom roce života, postupně proteinurie progredovala až do nefrotické úrovně (nad 1g/m²/24 hodin). Nasazení kortikoidů v klasickém

schématu mělo paradoxní reakci a proteinurie signifikantně vzrostla. Pacientka po stanovení kortikorezistence byla převedena na cyklosporin. Po cyklosporinu došlo k parciální remisi NS s poklesem proteinurie pod $500 \text{ mg/m}^2/24 \text{ hod.}$ Renální funkce zůstávají plně zachované.

V biopsii ledvin byly nalezeny pouze minimální změny glomerulů, v elektronmikroskopickém obraze byla fúze pedicel.

U pacientky jsme našli heterozygotní mutaci v *NPHS2* R138Q v kombinaci s neznámou a nezvyklou stop codon read-through mutací X384Q. Tato mutace vytváří velmi nezvyklou situaci. Místo zařazení stop kodonu a ukončení syntézy proteinu dochází k prodloužení syntézy o další aminokyseliny.

Pacientka 26

Pacientce je v současné době 10 let, rozvoj nefrotického syndromu u ní začal od dvou let věku. Nereagovala na léčbu kortikoidy a cyklosporinem. Biopsie ledviny ukázala obraz FSGS. Molekulárně genetické vyšetření prokázalo u této pacientky homozygotní známou mutaci R138Q v genu *NPHS2* pro podocin. V 9 letech dosáhla konečné fáze renální insuficience a byla zahájena nejprve hemodialýza a poté peritoneální dialýza. Pacientka byla zařazena na čekací listinu k transplantaci ledviny. V 10 letech byla úspěšně transplantována ledvinou od zemřelého dárce. V transplantované ledvině nedošlo k rekurenci FSGS a zachovává si dobrou funkci

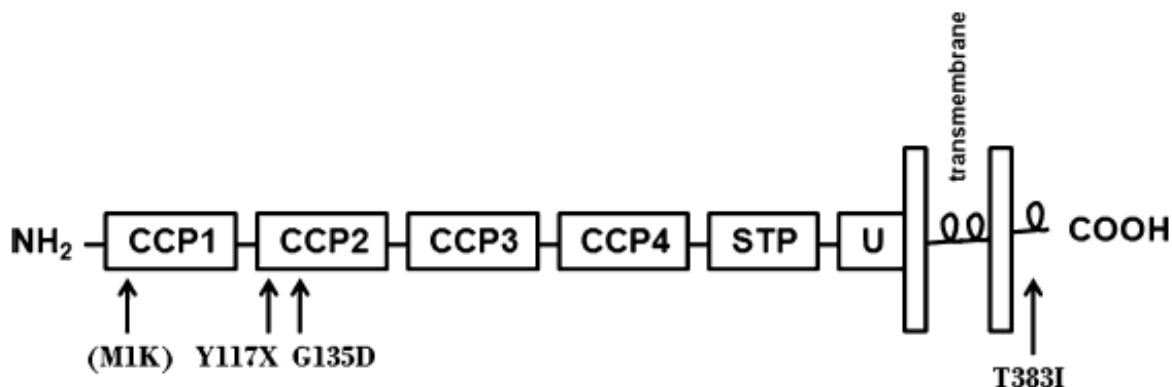
Pacient 31

Nyní desetiletý chlapec prvně manifestoval nefrotický syndrom ve třech letech věku po infekci virem chřipky A. Po zahájení standardní kúry prednisonem se u něj vyskytlo paradoxní zhoršení proteinurie a kortikoidy musely být vysazeny. Léčba cyklofosfamidem byla též bez efektu. Po nasazení cyklosporinu A ve 4 letech došlo u pacienta k částečné remisi onemocnění, kdy nefrotická proteinurie se snížila na $500 \text{ mg/m}^2/24 \text{ hod.}$ První biopsie ledvin byla nekonkluzivní, až v druhé biopsii byly prokázány změny svědčící pro FSGS. Pacient si udržuje normální glomerulární filtraci i v současnosti.

Molekulárně genetické vyšetření u pacienta prokázalo neznámou heterozygotní mutaci genu *NPHS2* A318T v kombinaci s nosičstvím patogenního polymorfismu R229R/Q.

Cíl 5 - Výsledek analýzy genů u pacientů s familiárním atypickým HUS

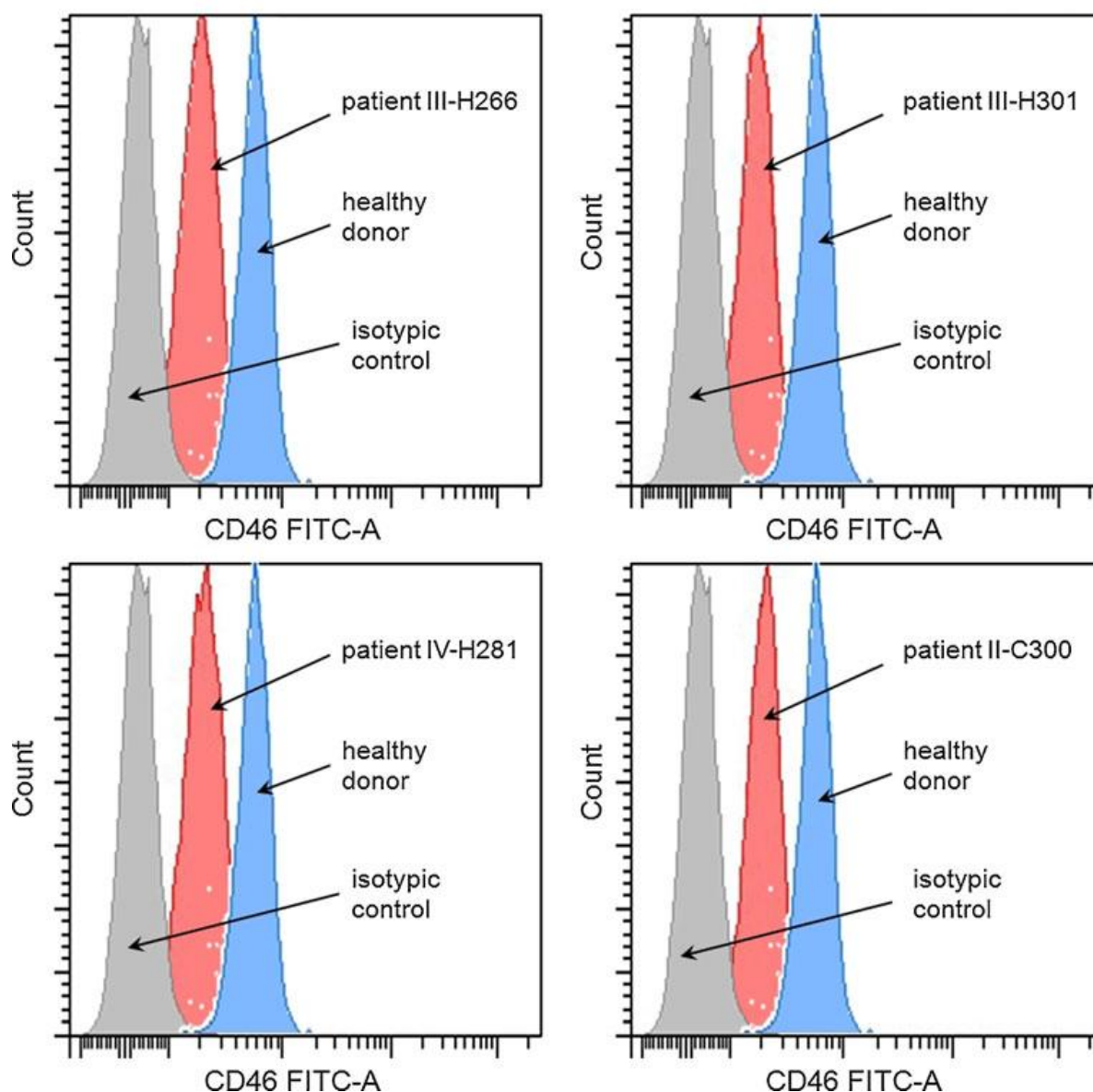
V retrospektivním souboru 10 pacientů s familiárním atypickým HUS jsme našli celkem 4 pacienty s mutacemi v genu MCP (40%). Schematické zobrazení MCP/CD46 molekuly s vyznačenými mutacemi je na obrázku 5. Všechny námi objevené mutace byly heterozygotní. V rodinách jsme našli nosiče mutací bez příznaků onemocnění.



Obrázek 5 – Schematické zobrazení CD46 molekuly s vyznačenými mutacemi (Provaznikova, Rittich et al. 2012)

Funkční analýza pomocí sledování exprese produktu MCP genu, molekuly CD46 na povrchu granulocytů periferní krve nosičů prokázala významně sníženou expresi této molekuly u všech čtyř mutací. (Obrázek 6). Výsledky byly publikovány – detaily v článku v přílohách (Provaznikova, Rittich et al. 2012).

patient	MCP expression on granulocytes (cMFI)	normal range (cMFI)
II-C300	4.1	7.1-15.9
III-H266	6.2	
III-H301	5.0	
IV-H281	4.7	



Obrázek 6 – Výsledky průtokové cytometrie u 4 nosičů různých námi zjištěných mutací

X. DISKUZE

V souboru pacientů s kortikorezistentním nefrotickým syndromem ve věku 0-18 let z ČR jsme našli pacienty nesoucí mutace v genech *NPHS2* a *WT1*. Námi zjištěná incidence 3,7 případů na milion dětí odpovídá nálezům v kohortách evropských nefinských populací. Incidence v těchto kohortách NS celkově se pohybuje kolem 3-7 pacientů na 100 tisíc dětí, kdy kortikorezistentních případů je mezi 10-15% (Ruf, Lichtenberger et al. 2004; Sako, Nakanishi et al. 2005; Yu, Ding et al. 2005; Hinkes, Mucha et al. 2007; Cho, Lee et al. 2008).

Nepřítomnost mutací v genu *NPHS1* nám potvrdila předpoklad, že tento gen, který způsobuje většinu případů kongenitálního nefrotického syndromu ve Finsku, bude u nás vzácný. Sice dvě recentní práce na velkých kohortách uvádí mutace v *NPHS1* jako možnou a ne úplně raritní příčinu sporadického a familiárního NS manifestovaného v dětství či dokonce v dospělosti (Philippe, Nevo et al. 2008; Santin, Garcia-Maset et al. 2009), ale dle našich výsledků jsou mutace v *NPHS1* v ČR raritní a v našem souboru nebyl zachycen ani jeden pacient.

Zajímavým nálezem byla mutace v genu pro Schimkeho imuno-oseální dysplazii. Pacient nesoucí tuto mutaci byl klinicky zachycen velmi brzy, ještě dříve než rozvinul další signifikantní změny typické pro tento syndrom a byl veden jako idiopatický NS, pravděpodobně genetický. Tento pacient je příkladem, že pacienty s negativními genetickými nálezy je dobré dlouhodobě sledovat, vzhledem k možnosti rozvinutí dalších příznaků, které mohou nasměrovat genetickou diagnózu správným směrem.

Nejčastěji mutovaný gen v našem souboru byl *NPHS2* kódující podocin (celkem 13% pacientů). V našem souboru jsme našli pacienty nesoucí známé a dobře popsané klasické mutace jako missense mutaci R138Q (Boute, Gribouval et al. 2000). Pacientka 26 je modelovou ukázkou pacienta s touto mutací. Manifestovala se v nejčastěji popisovaném věku, byla primárně kortikorezistentní a nereagovala ani na jiná imunosupresiva. Její choroba progredovala až do stavu chronického selhání ledvin v dětském věku. Po transplantaci u ní nedošlo k relapsu NS. Toto je v souladu s popisovanými příznaky pacientů s mutacemi v podocinovém genu z velkých kohort. Tato mutace na proteinové úrovni zabraňuje výstupu podocinu z endoplasmatického retikula (Jaffer, Ahmed et al. 2011). Podocin poté nemůže správně interagovat s nefrinem – navádět ho do tzv. lipidových raftů, kde nefrin poté v interakci s dalšími proteiny vytváří hlavní složku štěrbinové membrány

mezi podocyty (Huber, Simons et al. 2003). Mutace v podocinu, tedy vedou k podobné poruše jako je tomu u mutací v *NPHS1* genu, který kóduje nefrin i když nemají tak časnou a závažnou prezentaci.

Dle nejrecentnějších teorií (Tojo and Kinugasa 2012) se většina mutací stýká na úrovni štěrbinové membrány, kde dochází k několika možným poruchám vedoucím k ztrátě selektivity filtru a vzniku proteinurie (shrnutí na obrázcích 7 a 8). Genetický či jiný inzult vede k narušení štěrbinové membrány a vzniku tzv. effacementu - těsnému přiblížení membrán výběžků podocytů k sobě až jejich splynutí. Tento jev lze pozorovat na úrovni elektronového mikroskopu a je typický pro MCD.

Paradoxně přiblížení až splynutí membrán vede k ztrátě selektivity a vyšší propustnosti. Na obrázku 8 jsou poté shrnuty tři teorie, jak dochází k zvýšenému úniku albuminu a eventuelně dalších bílkovin. Po narušení štěrbinové membrány dojde ke vzniku mezery a proteiny procházejí tímto místem mezi podocyty (A), eventuelně využívají míst, kde došlo ke kompletní destrukci výběžku podocyty (B). Nejzajímavější je ovšem teorie prokázaná i experimentálně, která vysvětluje i zvýšenou proteinurii v případě, kdy nedojde k tak drastickým změnám a volné místo, kde bývá štěrbinová membrána je uzavřeno splynutými výběžky podocytů (C). Podle ní může docházet k patologickému transportu bílkovin skrz cytosol podocyty na bázi přenosu díky neregulovanému receptoru (Tojo, Onozato et al. 2008).

Vedle pacientů s klasickými dobře popsányými mutacemi a modelovým postupem choroby jsme našli pacienty s naprosto novými, dosud nepopsányými mutacemi v *NPHS2* genu. Pacientka 24 má vedle heterozygotní mutace R138Q velmi zvláštní mutaci typu stop kodon read-through, která místo stop kodonu indukuje kodon kódující aminokyselinu. Dochází tedy pravděpodobně k prodloužení délky proteinu. Jak toto prodloužení ovlivní vazbu podocinu na další složky štěrbinové membrány není dosud známo. Předpokládáme, že je možné, že zvětšení proteinu neumožní jeho výstup z endoplasmatického retikula a tudíž bude tato mutace mít podobný efekt jako jiné popsányé mutace – ztrátu správné interakce s nefrinem v lipidových raftech. U jiných popsányých genetických chorob, mívají pacienti s read-through mutacemi mírnější fenotyp onemocnění oproti mutacím proteiny zkracující či měnící jejich prostorové uspořádání (Zirn, Wittmann et al. 2005).

Kortikoidy u této pacientky měly přesně opačný efekt a proteinurii zhoršovaly. Po převodu na cyklosporin pacientka dosáhla parciální remise, která přetrvává a renální funkce je

stabilní. Tento paradoxní efekt zhoršení stavu po kortikoidech jsme našli i u pacienta 31 s kombinací polymorfismu R229Q a heterozygotní mutace v podocinu. U obou těchto pacientů se pravděpodobně jedná o přímý negativní efekt kortikoidů na filtrační membránu a ne o imunologicky podmíněnou reakci. Pacient 31 též zareagoval parciální remisí po převedení na cyklosporin. Oba dva tyto nálezy svědčí pro přímý efekt pravděpodobně na úrovni podocyty.

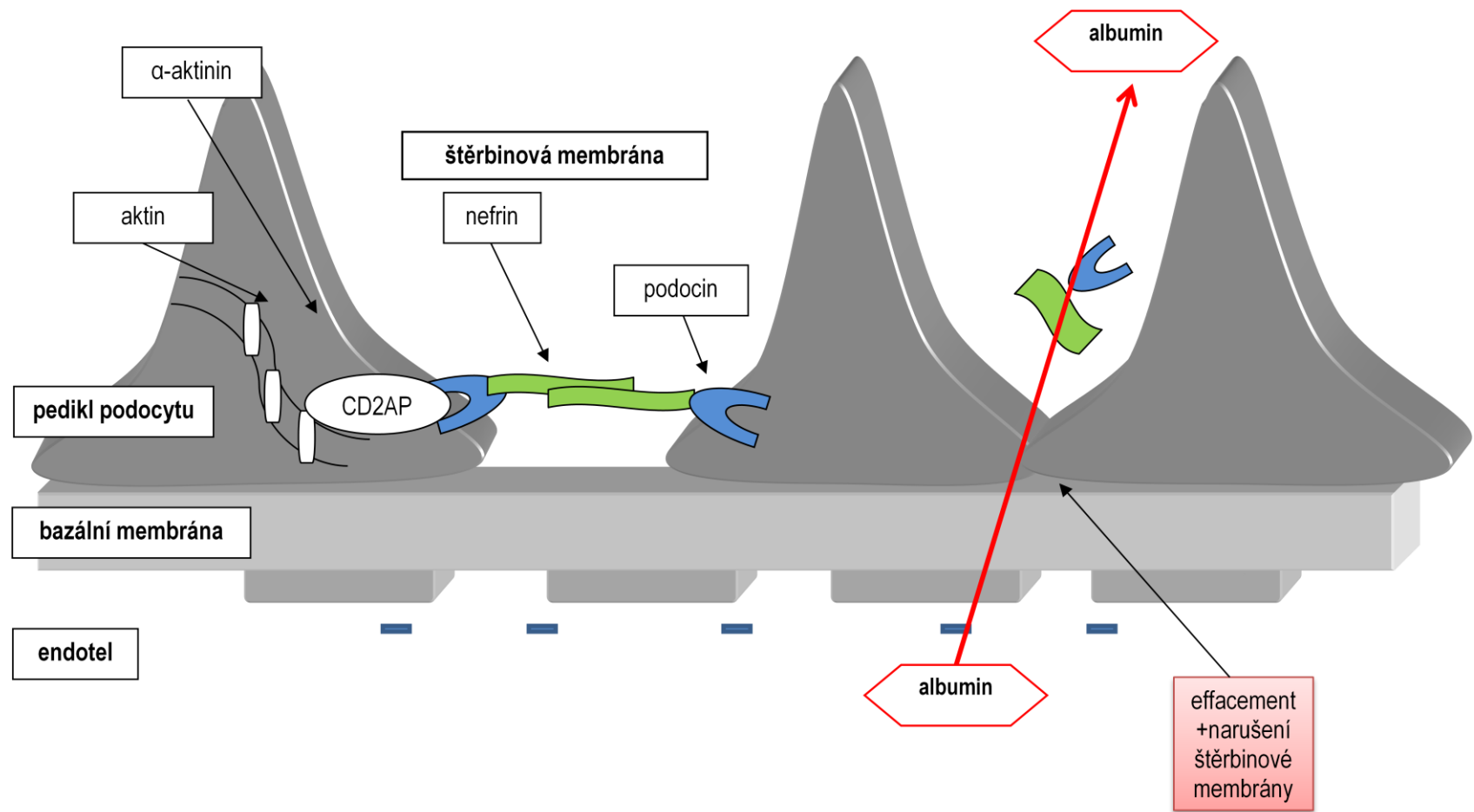
Tato reakce na cyklosporin je nezvyklá a nejde příliš vyložit standardním imunologickým účinkem cyklosporinu na kalcineurinovou signalizaci v T lymfocytech (NFAT). Z celého souboru pacientů se SRNS, nejzajímavějším fenotypickým nálezem v této souvislosti je pacient se stejnou genetickou mutací jako nesla pacientka 26 (homozygotní mutace R138Q), který vyvinul parciální remisí NS po cyklosporinu. Toto zjištění bylo zpočátku bráno jako rarita a námi publikovaný případ byl vůbec prvním detailně zdokumentovaným případem parciální remise u pacienta s geneticky podmíněným NS na světě (Malina, Cinek et al. 2009). Po našem sdělení o tomto pacientovi se objevilo několik dalších publikovaných případů (shrnutí v (Buscher, Kranz et al. 2010) a (Bensman and Niaudet 2010)) a pravděpodobně byl i objasněn efekt cyklosporinu u těchto pacientů. Cyklosporin zde pravděpodobně neúčinkuje přes svůj klasický imunologický efekt na NFAT signalizaci. Tento názor podporují i další pozorování zlepšení funkce ledvin po cyklosporinu u nemocí neimunitní povahy jako např. Alportův syndrom (Callis, Vila et al. 1999). Bylo nevrženo několik teorií, jakým způsobem cyklosporin přímo ovlivňuje podocyt či další části filtrační membrány. Cyklosporin dokáže ovlivnit náboj v glomerulární membráně a tudíž zvýšit její selektivitu. Další teorie spekulovaly s ovlivněním glomerulární hemodynamiky (Barisoni, Schnaper et al. 2009). Velmi dobře podložená teorie o působení cyklosporinu přímo na podocyt je relativně recentní a poukazuje na přímý vliv kalcineurinového inhibitoru (cyklosporinu) v podocytech a to na jejich cytoskelet (Faul, Asanuma et al. 2007). Kalcineurin normálně v podocyty způsobuje fosforylaci synaptopodinu, který je poté degradován a nemůže interagovat s CD2AP a následně s dalšími prvky štěrbinové membrány a aktinového cytoskeletu. Cyklosporin způsobí nadbytek synaptopodinu v podocytech alepší udržení aktinového cytoskeletu podocyty a jeho vazby k proteinům štěrbinové membrány (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2006; Faul, Donnelly et al. 2008). Zlepšení prostorového uspořádání výběžků podocyty pravděpodobně ovlivní proteiny štěrbinové membrány a sníží míru úniku bílkoviny skrz ni.

V naší kohortě pacientů jsme zachytili zvýšený výskyt polymorfismu R229Q v genu *NPHS2* oproti uváděným datům. Rozdíl ale nebyl statisticky signifikantní. Udává se, že v populaci se tento polymorfismus vyskytuje s frekvencí 3,6% (Lowik, Groenen et al. 2009). Data o výskytu tohoto polymorfismu jsou ovšem značně různá pro jednotlivé etnické skupiny a tento polymorfismus se nachází v rozpětí 2-9% (Franceschini, North et al. 2006). V naší skupině dětí se SRNS byly nosiči celkem 3, tj. 9% kohorty. Toto zjištění odpovídá nálezům z dalších velkých studií na dětech s nefrotickým syndromem, kdy se nalézají v kohortách dětí s NS vyšší zastoupení nosičství tohoto polymorfismu (5-6%). Funkčně, na proteinové úrovni má podocin pozměněný tímto polymorfismem horší vazbu k nefrinu a tudíž může působit narušení filtrační membrány a přispět ke zvýšeným ztrátám bílkoviny do moče a vzniku nefrotického syndromu (Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002). Česká studie na dospělých pacientech s NS též zmínila mírně zvýšený výskyt minoritní alely polymorfismu R229Q, který byl přítomen u 12% vyšetřovaných (Reiterova, Safrankova et al. 2012). Zároveň ovšem byla přítomna velmi vysoká frekvence výskytu i u kontrol (10%) což by svědčilo spíše pro populačně specifickou vysokou frekvenci výskytu v ČR.

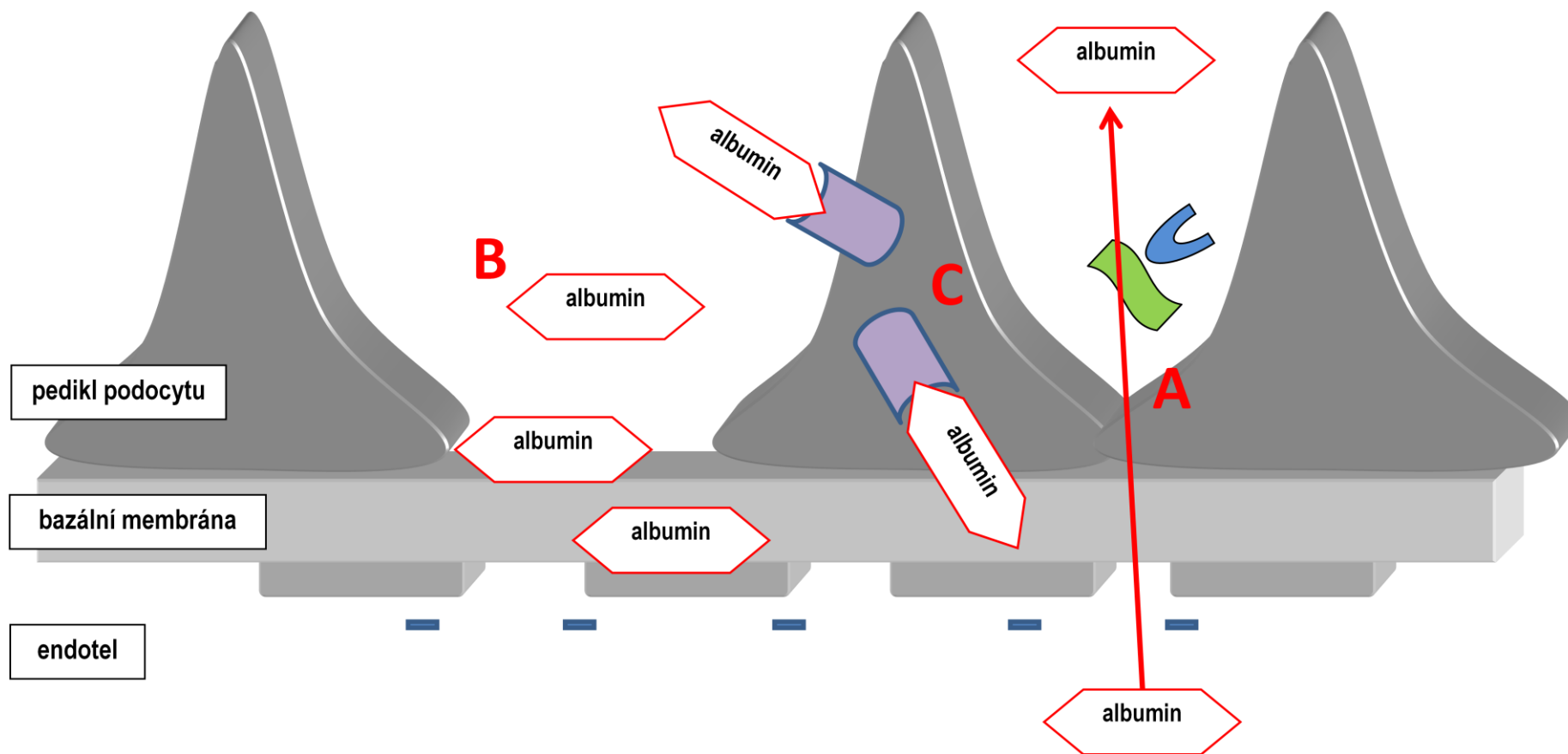
Náš pacient nesoucí novou neznámou mutaci dohromady s polymorfismem R229Q vyvinul velmi časnou manifestaci SRNS odpovídající pacientům s genotypem R138Q. Tento pacient zareagoval na léčbu cyklosporinem parciální remisí. U heterozygotních pacientů a pacientů nesoucích pouze polymorfismus je známo, že mají vyšší procento reakce na cyklosporin než pacienti s homozygotními či složeně heterozygotními mutacemi (Buscher, Kranz et al. 2010). U dvou nosičů polymorfismu R229Q v naší kohortě došlo k rozvoji nefrotického syndromu v pozdějším věku (14 let) než u pacientů s mutacemi či s kombinací polymorfismus/mutace. Polymorfismus R229Q je tedy spíše přidavným faktorem v patogenezi jejich choroby, ale není přímo jedinou příčinou. Vedle popisu jeho funkční patogenicity na proteinové úrovni je též známo, že je asociován s vyšší albuminurií a nižší glomerulární filtrací v neselektované normální populaci (Kottgen, Hsu et al. 2008).

U deseti pacientů s familiárním atypickým HUS s manifestací v dětském věku jsme našli celkem 4 pacienty (40%) s mutacemi v genu *MCP* kódujícím protein CD46. Toto vysoké procento zastoupení MCP mutací v našem souboru je nezvyklé. V jiných kohortách je zastoupení těchto mutací do 10 % pacientů (Noris, Brioschi et al. 2003; Caprioli, Noris et al. 2006; Richards, Kathryn Liszewski et al. 2007). Předpokládáme, že se jedná o specifický

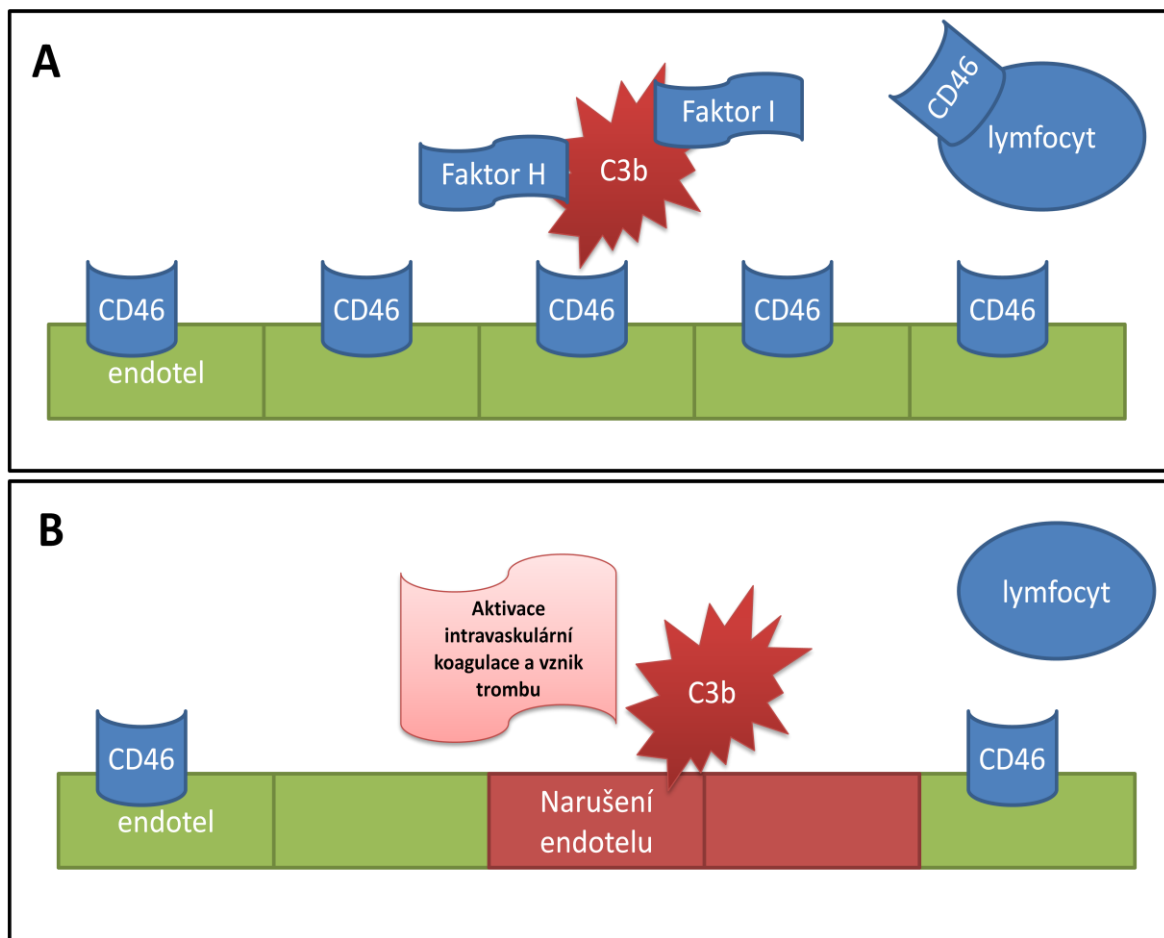
výskyt v ČR, i když je možné že toto vysoké procento je dílem selekčního biasu vzorku. Mutace v *MCP* se projevují většinou mírnějším fenotypem oproti jiným mutacím, jako například v *CFH* či *C3* genu, kde se často manifestují velmi závažným postižením či smrtí v novorozeneckém či raném dětském věku (Noris and Remuzzi 2009). Atypický HUS je též diskutován více v posledních několika letech a jedná se o velmi vzácné onemocnění. Je tedy možné, že mohou být tyto závažněji postižení pacienti diagnostikovány mylně jako jiná onemocnění (sepse, diseminovaná intravaskulární koagulopatie, atd.) a jelikož smrtnost onemocnění je vysoká (až 25% případů) mohou uniknout zachytu (Caprioli, Noris et al. 2006). Fenotypicky všechny mutace měly jednotnou patofyziologii rozvoje onemocnění. U všech čtyř námi popsaných mutací byla významně nižší exprese CD46 na povrchu buněk oproti kontrolám. Snížená exprese CD46 vede v kombinaci s dalšími tzv. spouštěcím faktorem k větší náchylnosti nosiče k aktivaci neregulované kaskády alternativní cesty komplementu až po jeho lytickou fázi na povrchu CD46 nechráněného endotelu a vzniku trombotické mikroangiopatie (shrnutí na Obrázku 9).



Obrázek 7 – Narušení filtrační membrány, zejména komplexu nefrin-podocin způsobené mutacemi v genech pro štěrbínovou membránu.



Obrázek 8 – tři předpokládané patofyziologické mechanismy přestupu albuminu skrz narušeno filtrační membránu u pacientů s NS.
 A- skrz narušenou štěrbinovou membránu, B – volně v místech kde je místo po poškozených podocytech, C – transmembránově pomocí receptoru.



Obrázek 9 – patofyziologický mechanismus způsobující vznik atypického HUS u nosičů mutací v MCP.

A – normální stav, endotel je chráněn CD46, kdy po aktivaci alternativní cesty komplementu dojde k deaktivaci aktivní složky komplementu (C3b) pomocí CD46, faktoru I a faktoru H. CD46 je přítomno i na leukocytech, kde ho můžeme detekovat rychle pomocí FACS z krve pacienta.

B – patologický stav, kdy endotel není dostatečně chráněn CD46 molekulou a faktory H a I nemohou korektně tlumit aktivaci komplementu. Dochází k aktivaci komplementu až k lytické složce, destrukci endotelu, aktivaci koagulační kaskády a vzniku intravazálních trombů. CD46 není přítomno ani na povrchu lymfocytu.

XI. ZÁVĚR

V kohortě dětí s kortikorezistentním nefrotickým syndromem jsme našli kausální mutaci u 22% pacientů. Nejčastější příčinou byly mutace v genu *NPHS2* kódujícím podocin a genu *WT1*. Mutace v genu *NPHS1* nebyly nalezeny. To odpovídá nálezům z dalších evropských kohort dětí se SRNS. Námi nalezené mutace v *NPHS2* pravděpodobně narušují funkci vazby podocinu na nefrin a jeho správnou orientaci v štěrbinové membráně. Nová námi popsaná mutace ve *WT1* genu leží přímo v interakční zóně 2. zinkového prstu proteinu *WT1* s DNA. Záměna aminokyseliny v takto exponované zóně je vysoce pravděpodobně funkčně relevantní.

Oproti dřívějším zjištěním, kde je uváděna významná rezistence k imunosupresivům u těchto pacientů, se v souboru našich pacientů projevila značná odpověď na účinek cyklosporinu pro dosažení parciální remise (43% pacientů s mutacemi). Tento efekt je pravděpodobně způsoben přímým působením cyklosporinu na cytoskelet podocyty skrz synaptopodinem způsobenou signalizací.

U pacientů s familiárním HUS s manifestací v dětském věku jsme zjistili významně vyšší incidenci prokazatelně funkčně patologických mutací v genu *MCP* oproti dosud publikovaným skupinám. Všechny tyto mutace byly dosud nepopsané a funkční analýza těchto mutací prokázala jejich vztah k rozvoji HUS skrz sníženou expresi CD46 na povrchích endotelu a tudíž jeho nižší rezistenci k poškození hyperaktivovaným komplementem.

Obě tato zjištění ukazují, že Česká republika má výskyt vzácných dětských monogenních glomerulopatií obdobný s evropskou populací. Některá naše dílčí genotypicko-fenotypická zjištění jako například zvýšený výskyt *MCP* mutací, vyšší výskyt polymorfismu R229Q v *NPHS2* či zvýšená rezpozivita na cyklosporin v naší kohortě jsou ovšem specifická pro naši populaci a zaslouží si další sledování a studium příčin.

XII. PODĚKOVÁNÍ

Děkujeme zejména pacientům a jejich rodičům za souhlas s účastí v této studii a dlouhodobou spoluprací. Dále děkuji dětským nefrologům z ČR, zejména doc. MUDr. Sylvě Skálové, Prof. MUDr. Zdeňku Doleželovi, MUDr. Jiřímu Štarhovi, MUDr. Alexandru Kolskému, MUDr. Marianu Šenkeříkovi, MUDr. Terezii Šulákové a MUDr. Evě Sládkové za zasílání informací a dotazníků o pacientech se SRNS. Stejný dík patří nefrologickému týmu Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol za spoluprací na klinickém vyhodnocování pacientů se SRNS, MUDr. Jakubu Ziegovi, doc. MUDr. Jiřímu Duškovi, MUDr. Naděždě Šimánkové, MUDr. Karlu Vondrákovi, MUDr. Mgr. Tomáši Rosíkovi a MUDr. Filipu Fenclovi, PhD.

Díky patří týmu v laboratoře koagulací ÚHKT Praha, zejména RNDr. Ingrid Hrachovinové, Mgr. Daně Provazníkové, PhD. a Mgr. Šimonu Rittichovi, PhD. za dlouhodobou spoluprací na tématu atypického HUS.

Taktéž velmi děkuji všem kolegům v Laboratoři molekulární genetiky, Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol, zejména Mgr. Petře Dušátkové, PhD. a Bc. Kláře Veselé za pomoc se zpracováním molekulárně genetických analýz.

XIII. LITERATURA

- Abeyagunawardena, A. S. (2005). "Treatment of steroid sensitive nephrotic syndrome." Indian J Pediatr **72**(9): 763-769.
- Allen, U. and C. Licht (2010). "Pandemic H1N1 influenza A infection and (atypical) HUS-more than just another trigger?" Pediatr Nephrol **26**(1): 3-5.
- Asanuma, K., E. Yanagida-Asanuma, et al. (2006). "Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling." Nat Cell Biol **8**(5): 485-491.
- Barisoni, L., H. W. Schnaper, et al. (2009). "Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy." Arch Pathol Lab Med **133**(2): 201-216.
- Barre, P., B. S. Kaplan, et al. (1977). "Hemolytic uremic syndrome with hypocomplementemia, serum C3NeF, and glomerular deposits of C3." Arch Pathol Lab Med **101**(7): 357-361.
- Bensman, A. and P. Niaudet (2010). "Non-immunologic mechanisms of calcineurin inhibitors explain its antiproteinuric effects in genetic glomerulopathies." Pediatr Nephrol **25**(7): 1197-1199.
- Blahova, K., J. Janda, et al. (2002). "Long-term follow-up of Czech children with D+ hemolytic-uremic syndrome." Pediatr Nephrol **17**(6): 400-403.
- Boute, N., O. Gribouval, et al. (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." Nature genetics **24**(4): 349-354.
- Brown, E. J., J. S. Schlondorff, et al. (2010). "Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis." Nature genetics **42**(1): 72-76.
- Buscher, A. K., B. Kranz, et al. (2010). "Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome." Clin J Am Soc Nephrol **5**(11): 2075-2084.
- Buscher, A. K. and S. Weber (2012). "Educational paper : The podocytopathies." European journal of pediatrics.
- Callis, L., A. Vila, et al. (1999). "Long-term effects of cyclosporine A in Alport's syndrome." Kidney Int **55**(3): 1051-1056.
- Cameron, J. S. and R. Vick (1973). "Letter: Plasma-C3 in haemolytic-uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura." Lancet **2**(7835): 975.
- Caprioli, J., M. Noris, et al. (2006). "Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome." Blood **108**(4): 1267-1279.
- Copelovitch, L. and B. S. Kaplan (2009). "Streptococcus pneumoniae--associated hemolytic uremic syndrome: classification and the emergence of serotype 19A." Pediatrics **125**(1): e174-182.
- Coppes, M. J., G. J. Liefers, et al. (1992). "Inherited WT1 mutation in Denys-Drash syndrome." Cancer Res **52**(21): 6125-6128.
- D'Agati, V. D., F. J. Kaskel, et al. (2011). "Focal segmental glomerulosclerosis." N Engl J Med **365**(25): 2398-2411.
- Delvaeye, M., M. Noris, et al. (2009). "Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome." N Engl J Med **361**(4): 345-357.
- Dharnidharka, V. R., E. C. Ruteshouser, et al. (2001). "Pulmonary dysplasia, Denys-Drash syndrome and Wilms tumor 1 gene mutation in twins." Pediatric nephrology **16**(3): 227-231.
- Ehrich, J. H. and J. Brodehl (1993). "Long versus standard prednisone therapy for initial treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische Nephrologie." European journal of pediatrics **152**(4): 357-361.
- Ehrich, J. H., C. Geerlings, et al. (2007). "Steroid-resistant idiopathic childhood nephrosis: overdiagnosed and undertreated." Nephrol Dial Transplant **22**(8): 2183-2193.
- Esparza-Gordillo, J., E. G. Jorge, et al. (2006). "Insights into hemolytic uremic syndrome: segregation of three independent predisposition factors in a large, multiple affected pedigree." Mol Immunol **43**(11): 1769-1775.

- Fakhouri, F., L. Roumenina, et al. (2010). "Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations." J Am Soc Nephrol **21**(5): 859-867.
- Faul, C., K. Asanuma, et al. (2007). "Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton." Trends Cell Biol **17**(9): 428-437.
- Faul, C., M. Donnelly, et al. (2008). "The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A." Nat Med **14**(9): 931-938.
- Fencl, F., M. Malina, et al. (2012). "Discordant expression of a new WT1 gene mutation in a family with monozygotic twins presenting with congenital nephrotic syndrome." European journal of pediatrics **171**(1): 121-124.
- Franceschini, N., K. E. North, et al. (2006). "NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review." Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics **8**(2): 63-75.
- Fremaux-Bacchi, V., M. A. Dragon-Durey, et al. (2004). "Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome." J Med Genet **41**(6): e84.
- Fremaux-Bacchi, V., E. C. Miller, et al. (2008). "Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome." Blood **112**(13): 4948-4952.
- Fremaux-Bacchi, V., E. A. Moulton, et al. (2006). "Genetic and functional analyses of membrane cofactor protein (CD46) mutations in atypical hemolytic uremic syndrome." J Am Soc Nephrol **17**(7): 2017-2025.
- Fuchshuber, A., O. Gribouval, et al. (2001). "Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood." J Am Soc Nephrol **12**(2): 374-378.
- Furtado, L. V., T. Pysher, et al. (2011). "Denys-Drash syndrome with neonatal renal failure in monozygotic twins due to c.1097G>A mutation in the WT1 gene." Fetal and pediatric pathology **30**(4): 266-272.
- Gasser, C., E. Gautier, et al. (1955). "[Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia.]." Schweiz Med Wochenschr **85**(38-39): 905-909.
- Gbadegesin, R., B. G. Hinkes, et al. (2008). "Mutations in PLCE1 are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS)." Nephrol Dial Transplant **23**(4): 1291-1297.
- Goicoechea de Jorge, E., C. L. Harris, et al. (2007). "Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 240-245.
- Heidet, L., S. Decramer, et al. (2010). "Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases." Clin J Am Soc Nephrol **5**(6): 1079-1090.
- Henderson, J. M., M. P. Alexander, et al. (2009). "Patients with ACTN4 mutations demonstrate distinctive features of glomerular injury." J Am Soc Nephrol **20**(5): 961-968.
- Hildebrandt, F., M. Attanasio, et al. (2009). "Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **20**(1): 23-35.
- Hinkes, B., C. Vlangos, et al. (2008). "Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **19**(2): 365-371.
- Hinkes, B., R. C. Wiggins, et al. (2006). "Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible." Nat Genet **38**(12): 1397-1405.
- Hinkes, B. G. (2008). "NPHS3: new clues for understanding idiopathic nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **23**(6): 847-850.
- Hinkes, B. G., B. Mucha, et al. (2007). "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 **119**(4): e907-919.
- Hodson, E. M. and S. I. Alexander (2008). "Evaluation and management of steroid-sensitive nephrotic syndrome." Current opinion in pediatrics **20**(2): 145-150.
- Hodson, E. M. and J. C. Craig (2008). "Therapies for steroid-resistant nephrotic syndrome." Pediatric nephrology **23**(9): 1391-1394.
- Hodson, E. M., N. S. Willis, et al. (2007). "Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children." Cochrane database of systematic reviews(4): CD001533.

- Hodson, E. M., N. S. Willis, et al. (2008). "Non-corticosteroid treatment for nephrotic syndrome in children." Cochrane database of systematic reviews(1): CD002290.
- Hodson, E. M., N. S. Willis, et al. (2010). "Interventions for idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome in children." Cochrane database of systematic reviews(11): CD003594.
- Hu, M., G. Y. Zhang, et al. (2004). "Prophylactic bilateral nephrectomies in two paediatric patients with missense mutations in the WT1 gene." Nephrol Dial Transplant **19**(1): 223-226.
- Huber, T. B., M. Simons, et al. (2003). "Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains." Human molecular genetics **12**(24): 3397-3405.
- Cho, H. Y., J. H. Lee, et al. (2008). "WT1 and NPHS2 mutations in Korean children with steroid-resistant nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **23**(1): 63-70.
- Jaffer, A. T., W. U. Ahmed, et al. (2011). "Foothold of NPHS2 mutations in primary nephrotic syndrome." Journal of postgraduate medicine **57**(4): 314-320.
- Jeanpierre, C., E. Denamur, et al. (1998). "Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database." American journal of human genetics **62**(4): 824-833.
- Jeansson, M. and B. Haraldsson (2006). "Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier." American journal of physiology. Renal physiology **290**(1): F111-116.
- Jungers, P., D. Joly, et al. (2008). "[Inherited monogenic kidney stone diseases: recent diagnostic and therapeutic advances]." Nephrologie & therapeutique **4**(4): 231-255.
- Jungraithmayr, T. C., K. Hofer, et al. (2011). "Screening for NPHS2 mutations may help predict FSGS recurrence after transplantation." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **22**(3): 579-585.
- Kaplan, J. M., S. H. Kim, et al. (2000). "Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis." Nat Genet **24**(3): 251-256.
- Kashtan, C. E. and Y. Segal (2011). "Genetic disorders of glomerular basement membranes." Nephron. Clinical practice **118**(1): c9-c18.
- Kestila, M., U. Lenkkeri, et al. (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Mol Cell **1**(4): 575-582.
- Kottgen, A., C. C. Hsu, et al. (2008). "The association of podocin R229Q polymorphism with increased albuminuria or reduced estimated GFR in a large population-based sample of US adults." American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation **52**(5): 868-875.
- Le Quintrec, M., L. Roumenina, et al. (2010). "Atypical hemolytic uremic syndrome associated with mutations in complement regulator genes." Semin Thromb Hemost **36**(6): 641-652.
- Lenkkeri, U., M. Mannikko, et al. (1999). "Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations." Am J Hum Genet **64**(1): 51-61.
- Lesesne, J. B., N. Rothschild, et al. (1989). "Cancer-associated hemolytic-uremic syndrome: analysis of 85 cases from a national registry." J Clin Oncol **7**(6): 781-789.
- Li, J., J. Ding, et al. (2010). "WT1 gene mutations in Chinese children with early onset nephrotic syndrome." Pediatr Res **68**(2): 155-158.
- Lifton P.R., S. S., Giebish G.H., Seldin D.W. (2009). Genetic diseases of the kidney.
- Liu, X. L., S. C. Done, et al. (2004). "Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **15**(7): 1731-1738.
- Loirat, C. and V. Fremeaux-Bacchi (2008). "Hemolytic uremic syndrome recurrence after renal transplantation." Pediatr Transplant **12**(6): 619-629.
- Lowik, M. M., P. J. Groenen, et al. (2009). "Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis--a review." Eur J Pediatr **168**(11): 1291-1304.

- Lowik, M. M., P. J. Groenen, et al. (2007). "Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation." *Kidney Int* **72**(10): 1198-1203.
- Machuca, E., G. Benoit, et al. (2010). "Genotype-phenotype correlations in non-Finnish congenital nephrotic syndrome." *J Am Soc Nephrol* **21**(7): 1209-1217.
- Malina, M., O. Cinek, et al. (2009). "Partial remission with cyclosporine A in a patient with nephrotic syndrome due to NPHS2 mutation." *Pediatr Nephrol* **24**(10): 2051-2053.
- Mark Taylor, C. (2008). "Enterohaemorrhagic Escherichia coli and Shigella dysenteriae type 1-induced haemolytic uraemic syndrome." *Pediatric nephrology* **23**(9): 1425-1431.
- Mele, C., P. Iatropoulos, et al. (2011). "MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis." *N Engl J Med* **365**(4): 295-306.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic acids research* **16**(3): 1215.
- Mucha, B., F. Ozaltin, et al. (2006). "Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9." *Pediatr Res* **59**(2): 325-331.
- Mukerji, N., T. V. Damodaran, et al. (2007). "TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy." *Biochim Biophys Acta* **1772**(8): 859-868.
- Niaudet, P. (2004). "Genetic forms of nephrotic syndrome." *Pediatr Nephrol* **19**(12): 1313-1318.
- Noris, M., S. Brioschi, et al. (2003). "Familial haemolytic uraemic syndrome and an MCP mutation." *Lancet* **362**(9395): 1542-1547.
- Noris, M. and G. Remuzzi (2009). "Atypical hemolytic-uremic syndrome." *N Engl J Med* **361**(17): 1676-1687.
- Noris, M. and G. Remuzzi (2010). "Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation." *Am J Transplant* **10**(7): 1517-1523.
- Ozaltin, F., T. Ibsirlioglu, et al. (2011). "Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome." *Am J Hum Genet* **89**(1): 139-147.
- Ozer, E. A., N. Aksu, et al. (2004). "A novel NPHS2 gene mutation in Turkish children with familial steroid-resistant nephrotic syndrome." *Nephrology (Carlton)* **9**(5): 310-312.
- Patrakka, J., M. Kestila, et al. (2000). "Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients." *Kidney Int* **58**(3): 972-980.
- Pelletier, J., W. Bruening, et al. (1991). "Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome." *Cell* **67**(2): 437-447.
- Philippe, A., F. Nevo, et al. (2008). "Nephrin mutations can cause childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**(10): 1871-1878.
- Provaznikova, D., S. Rittich, et al. (2012). "Manifestation of atypical hemolytic uremic syndrome caused by novel mutations in MCP." *Pediatric nephrology* **27**(1): 73-81.
- Reiterova, J., H. Safrankova, et al. (2012). "Mutational analysis of the NPHS2 gene in Czech patients with idiopathic nephrotic syndrome." *Folia biologica* **58**(2): 64-68.
- Richards, A., M. R. Buddles, et al. (2001). "Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition." *American journal of human genetics* **68**(2): 485-490.
- Richards, A., M. Kathryn Liszewski, et al. (2007). "Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading to atypical hemolytic uremic syndrome." *Mol Immunol* **44**(1-3): 111-122.
- Richards, A., E. J. Kemp, et al. (2003). "Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12966-12971.
- Roumenina, L. T., C. Loirat, et al. (2011). "Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS." *J Immunol Methods*.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods in molecular biology* **132**: 365-386.

- Ruf, R. G., A. Lichtenberger, et al. (2004). "Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **15**(3): 722-732.
- Ruf, R. G., M. Schultheiss, et al. (2004). "Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome." Kidney Int **66**(2): 564-570.
- Sako, M., K. Nakanishi, et al. (2005). "Analysis of NPHS1, NPHS2, ACTN4, and WT1 in Japanese patients with congenital nephrotic syndrome." Kidney Int **67**(4): 1248-1255.
- Salomon, R., S. Saunier, et al. (2009). "Nephronophthisis." Pediatric nephrology **24**(12): 2333-2344.
- Santin, S., R. Garcia-Maset, et al. (2009). "Nephrin mutations cause childhood- and adult-onset focal segmental glomerulosclerosis." Kidney international **76**(12): 1268-1276.
- Schultheiss, M., R. G. Ruf, et al. (2004). "No evidence for genotype/phenotype correlation in NPHS1 and NPHS2 mutations." Pediatr Nephrol **19**(12): 1340-1348.
- Stuhlinger, W., O. Kourilsky, et al. (1974). "Letter: Haemolytic-uraemic syndrome: evidence for intravascular C3 activation." Lancet **2**(7883): 788-789.
- Sweeney, W. E., Jr. and E. D. Avner (2011). "Diagnosis and management of childhood polycystic kidney disease." Pediatric nephrology **26**(5): 675-692.
- Tojo, A. and S. Kinugasa (2012). "Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption." International journal of nephrology **2012**: 481520.
- Tojo, A., M. L. Onozato, et al. (2008). "Glomerular albumin filtration through podocyte cell body in puromycin aminonucleoside nephrotic rat." Medical molecular morphology **41**(2): 92-98.
- Tsuda, M., T. Sakiyama, et al. (1996). "A newly identified exonic mutation of the WT1 gene in a patient with Denys-Drash syndrome." Acta paediatrica Japonica; Overseas edition **38**(3): 265-266.
- Tsukaguchi, H., A. Sudhakar, et al. (2002). "NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele." The Journal of clinical investigation **110**(11): 1659-1666.
- van den Berg, J. G. and J. J. Weening (2004). "Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome." Clin Sci (Lond) **107**(2): 125-136.
- Warwicker, P., T. H. Goodship, et al. (1998). "Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome." Kidney Int **53**(4): 836-844.
- Winn, M. P., N. Daskalakis, et al. (2006). "Unexpected role of TRPC6 channel in familial nephrotic syndrome: does it have clinical implications?" J Am Soc Nephrol **17**(2): 378-387.
- Yu, Z., J. Ding, et al. (2005). "Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children." Nephrol Dial Transplant **20**(5): 902-908.
- Zakarija, A. and C. Bennett (2005). "Drug-induced thrombotic microangiopathy." Semin Thromb Hemost **31**(6): 681-690.
- Zenker, M., T. Aigner, et al. (2004). "Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities." Hum Mol Genet **13**(21): 2625-2632.
- Zirn, B., S. Wittmann, et al. (2005). "Novel familial WT1 read-through mutation associated with Wilms tumor and slow progressive nephropathy." Am J Kidney Dis **45**(6): 1100-1104.

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), World Wide Web URL: <http://omim.org/>

XIV. PŘÍLOHY – PLNÉ TEXTY ČLÁNKŮ TVOŘÍCÍ PODKLAD DIZERTACE

- 1. Partial remission with cyclosporine A in a patient with nephrotic syndrome due to NPHS2 mutation.**
- 2. Discordant expression of a new WT1 gene mutation in a family with monozygotic twins presenting with congenital nephrotic syndrome.**
- 3. Genetics of hemolytic uremic syndromes.**
- 4. Manifestation of atypical hemolytic uremic syndrome caused by novel mutations in MCP.**
- 5. Geneticky podmíněné formy nefrotického syndromu u dětí.**
- 6. Hemolyticko-uremický syndrom – nejčastější příčina akutního renálního selhání u dětí. Komplexnost patofyziologie a nové možnosti diagnostiky a terapie atypických forem.**