Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Mgr. Markéta Šafaříková

Geneticky podmíněné faktory progrese vybraných forem chronických nefropatií

Genetic factors of progression of selected forms of chronic nephropathies

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Jana Reiterová Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 26.11. 2018

MARKÉTA ŠAFAŘÍKOVÁ

Identifikační záznam:

ŠAFAŘÍKOVÁ, Markéta. *GENETICKY PODMÍNĚNÉ FAKTORY PROGRESE VYBRANÝCH FOREM CHRONICKÝCH NEFROPATIÍ. [GENETIC FACTORS OF PROGRESSION OF SELECTED FORMS OF CHRONIC NEPHROPATHIES]*. Praha, 2018. Počet stran 108. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze. Školitel Reiterová, Jana.

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych chtěla poděkovat své školitelce doc. MUDr. Janě Reiterové Ph.D. a konzultantce Ing. Jitce Štekrové za jejich odborné vedení, podporu, cenné rady a připomínky a za možnost věnovat se problematice onemocnění ledvin.

Rovněž bych chtěla poděkovat MUDr. Evě Pazourkové, Ing. Aleši Hořínkovi, doc. MUDr. Ditě Maixnerové, Ph.D. a prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc., MBA, FASN, FERA za jejich odbornou pomoc a spolupráci při řešení dílčích projektů dizertační práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat doc. MUDr. Miladě Kohoutové, CSc. za možnost vypracovat dizertační práci na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze.

Na závěr bych chtěla poděkovat všem kolegům a kolegyním z Laboratoře molekulární diagnostiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze za příjemnou atmosféru v milém kolektivu.

POUŽITÉ ZKRATKY

A adenin

ABD aktin vázající doména

ACE angiotenzin konvertující enzym

ACTN4 α-aktinin-4

AD autozomálně dominantní

AGTR1 angiotensin II receptor type 1

AGTR2 angiotensin II receptor type 2

AK aminokyselina

Ang II angiotenzin II

ANLN anilin

APOL1 apolipoprotein L1

AR autozomálně recesivní

ARHGDIA Rho GDP dissociation inhibitor alpha

Arp 2/3 actin related protein 2/3

ATP adenozintrifosfát

B19 Parvovirus s označením B19

BP páry bazí, base pair

C cytosin

C3 složka komplementu (součást nespecifické humorální imunitní odpovědi)

CAAX C terminální variabilní sekvence u proteinu (C = Cystein, A = alifatická aminokyselina, X = variabilní aminokyselina)

CC helikální oblast

CCL5 C-C motif chemokine ligand 5

CCR3 C-C motif chemokine receptor 3

CCR5 C-C motif chemokine receptor 5

CD2AP CD2 asociovaný protein

CD80 molekula CD80

CELL cellular (označení pro typ FSGS)

CH1-2 kalponin homologní domény

CKD chronic kidney disease (chronické onemocnění ledvin)

CMT Charcot-Marie-Tooth neuropatie

COL4A3 collagen type IV alpha 3 chain (podjednotka kolagenu IV)

COL4A4 collagen type IV alpha 4 chain (podjednotka kolagenu IV)

COL4A5 collagen type IV alpha 5 chain (podjednotka kolagenu IV)

COLL collapsing (označení pro typ FSGS)

COQ8B koenzym Q8B

CRB2 crumbs 2 (komponenta Crumbsova komplexu)

CXCR3 C-X-C motif chemokine receptor 3

Daam1,2 proteiny patřící do proteinové rodiny forminů

DAD diafonní autoregulační doména

DD dimerizační doména

Dia1-3 proteiny patřící do proteinové rodiny forminů

DID diafonní inhibiční doména

Dig Drosophila disc large tumor suppressor

DN diabetická nefropatie

DNA deoxyribonukleová kyselina

Drf1-3 označení pro Dia1-3 proteiny

EF-hand proteinový motiv složený ze dvou alfa-helixů

ER endoplazmatické retikulum

ESRD end stage renal disease (renální selhání)

ET-1 epitelin 1

FH1 formin homologní doména 1

FH2 formin homologní doména 2

FH3 formin homologní doména 3

FHOD1,3 proteiny patřící do proteinové rodiny forminů

FMN1,2 proteiny patřící do proteinové rodiny forminů

FMNL1-3 proteiny patřící do proteinové rodiny forminů

F primer přímý primer

FRL1-3 označení pro FMNL1-3 proteiny

FSGS fokální segmentální glomeruloskleróza

G guanin

G^+ gram pozitivní

GAPDH glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GBD GTP vazebná doména

GBM glomerulární bazální membrána

GN glomerulonefritida

GRID2IP Grid 2 interacting protein, označení pro protein Delfilin formin

GTL glomerular tip lesion (označení pro typ FSGS)

GTP guanozintrifosfát

GTPáza hydroláza měnící guanozintrifosfát na guanozindifosfát

HGMD Human Gene Mutation Database

HIV Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti

HRM high resolution melting

IFNG interferon gamma

IgA imunoglobulin A

IgAN IgA nefropatie

IgG imunoglobulin G

IL10 interleukin 10

IL12A interleukin 12 A

IL18 interleukin 18

IL2RA interleukin 2 receptor podjednotka alfa

INF1,2 proteiny patřící do proteinové rodiny forminů

INF2 invertovaný formin 2

INS idiopatický nefrotický syndrom

ITGA3 integrin podjednotka alfa 3

IVS intron, intervening sequence

KANK1 KN motif and ankyrin repeat domains 1

KANK2 KN motif and ankyrin repeat domains 2

KANK4 KN motif and ankyrin repeat domains 4

KIRREL2 kirre like nephrin family adhesion molecule 2

L žebříček, ladder

LAMA5 laminin podjednotka alfa 5

LAMB2 laminin podjednotka beta 2

LN lupusová nefritida

M13 nukleotidová sekvence přidaná k primerům pro zjednodušení sekvenace

MAGI-1 membranově associovaná guanylát kináza

MCD minimální změny glomerulů

MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1

MEST zkratka složená z **m**esangial hypercellularity, **e**ndocapillary proliferation, **s**egmental glomerulosclerosis/adhesion a **t**ubular atrophy/interstitial fibrosis

MGN membranózní glomerulonefritida

MMP14 matrixová metalopeptidáza 14

MYH9 myozin těžký řetězec 9

MYO1E myozin 1 E

NCBI National Center for Biotechnology Information

NGS sekvenování nové generace, next generation sequencing

NK negativní kontrola

NOS not otherwise specified (označení pro typ FSGS)

NPHS1 nefrin

NPHS2 podocin

NS nefrotický syndrom

NT nukleotid

NUP93 nukleoporin 93

NUP107 nukleoporin 107

NUP205 nukleoporin 205

NXF5 jaderný exportní faktor 5 pro RNA

PAI-1 inhibitor plazminogenového aktivátoru

PAX2 paired box 2

PCR polymerázová řetězová reakce

PDGF platelet derived growth factor

PDZ zkratka pro proteinovou doménu složená z **p**ost synaptic density protein, **D**rosophila disc large tumor suppressor a **z**onula occludens-1 protein

PEC parietální epiteliální buňky

PH perihilar (označení pro typ FSGS)

PK pozitivní kontrola

PLA2R1 phospholipase A2 receptor 1

PLCE fosfolipáza C epsilon 1

PODXL podocalyxin like

PSD-95 post synaptic density protein

qPCR kvantitativní polymerázová řetězová reakce

R1-4 spektrinové repetice

RFLP délka polymorfizmů restrikčních fragmentů

RNA ribonukleotidová kyselina

R primer reverzní primer

SD slit diaphragm

SD směrodatná odchylka (v tabulkách)

SLE systémový lupus erytematodes

SRNS steroid-rezistentní nefrotický syndrom

SSNS steroid-senzitivní nefrotický syndrom

SYNPO synaptopodin

T thymin

TBM tubulární bazální membrána

TGFB1 transforming growth factor beta 1

TNFSF12 TNF superfamily member 12

TRPC6 transient receptor potential cation channel subfamily C member 6

VEGF vaskulární endoteliální růstový faktor

VEGFA vaskulární endoteliální růstový faktor A

VEGFE vaskulární endoteliální růstový faktor E

VEGFR receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor

WASP Wiskott–Aldrich syndrome protein

WH2 WASP homologní motiv 2

WT wild type, sekvence bez substituce

WT-1 Wilms tumor 1

XPO5 exportin 5

Z záměna

ZO-1 Zonula occludens-1

Aminokyseliny a jejich zkratky

Název aminokyseliny	Zkratka	Jednopísmenné označení
alanin	Ala	A
arginin	Arg	R
asparagin	Asn	N
asparagová kyselina	Asp	D
cystein	Cys	C
fenylalanin	Phe	F
glutamin	Gln	Q
glutamová kyselina	Glu	E
glycin	Gly	G
hystidin	His	H
izoleucin	Ile	I
leucin	Leu	L
lyzin	Lyz	K
metionin	Met	M
prolin	Pro	P
serin	Ser	S
treonin	Thr	T
tryptofan	Trp	W
tyrozin	Tyr	Y
valin	Val	V

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ 4

POUŽITÉ ZKRATKY 5

OBSAH 11

ABSTRAKT 14

ABSTRACT 15

1. ÚVOD 16

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 17

2.1. Ledviny a filtrace krve 17

2.2. Nefrotický syndrom 19

2.2.1. Idiopatický nefrotický syndrom 20

2.3. Fokální segmentální glomeruloskleróza 21

2.4. Minimální změny glomerulů 25

2.5. IgA nefropatie 26

2.6. Membranózní glomerulonefritida 27

2.7. α-aktinin-4 27

2.8. Invertovaný formin 2 29

3. CÍLE PRÁCE 33

4. MATERIÁL 34

4.1. Soubory pacientů pro mutační analýzu 34

4.1.1. Pacienti pro analýzu genu *INF2* 34

4.1.2. Pacienti pro analýzu genu *ACTN4* 35

4.1.3. Pacienti pro analýzu genů *NPHS2* a *TRPC6* 36

4.1.4. Příbuzní pacientů 36

4.1.5. Kontrolní soubor 36

4.2. Soubor pacientů pro expresní analýzu 37

5. METODY 38

5.1. Izolace nukleových kyselin 38
5.1.1. Izolace DNA 38
5.1.2. Izolace RNA 38
5.2. Mutační analýza 38
5.2.1. Použité primery 38
5.2.1.1. Primery pro gen *INF2* 38
5.2.1.2. Primery pro gen *ACTN4* 40
5.2.1.3. Primery pro gen *NPHS2* 41
5.2.1.4. Primery pro gen *TRPC6* 42
5.2.2. PCR reakce 43
5.2.3. High resolution melting metoda 45
5.2.4. Gelová elektroforéza 49
5.2.5. Sekvenování 50
5.2.5.1. Sekvenační reakce 50
5.2.5.2. Postsekvenační přečištění 50
5.2.5.3. Vlastní sekvenace 51
5.2.6. Analýza polymorfizmů délky restrikčních fragmentů 51
5.3. Expresní analýza 53
5.3.1. Reverzní transkripce 53
5.3.2. Real-time PCR 54
5.3.3. Vyhodnocení výsledků 55
5.4. Statistika 56
5.5. Software a databáze 56
5.5.1. Software 56
5.5.2. Databáze 57
6. VÝSLEDKY 58
6.1. Mutační analýza genu *ACTN4* 58

6.1.1. Záměna p.Asn748Asp 58
6.1.2. Exon 19 60
6.1.3. Záměna Leu169Pro 62
6.2. Mutační analýza genu *INF2* 64
6.2.1. Záměny nalezené v exonech 64
6.2.1.1. Záměna p.Arg214His 65
6.2.1.2. Záměna p.Arg218Gln 66
6.2.2. Záměny nalezené v intronech 67
6.3. Mutační analýza genů *NPHS2* a *TRPC6* 69
6.4. Expresní analýza 70
7. DISKUZE 73
8. ZÁVĚR 76
9. LITERATURA 78
10. PUBLIKACE 90
11. PŘÍLOHY 91

ABSTRAKT

Nefrotický syndrom je charakterizován proteinurií, hypoproteinémií, otoky a hyperlipidémií. Vyskytuje se u primárních (např. fokální segmentální glomeruloskleróza, FSGS nebo minimální změny glomerulů, MCD) i sekundárních glomerulopatií (např. amyloidóza ledvin). U primárních forem se věnuje velká pozornost možnosti genetického podkladu onemocnění a díky moderním molekulárně-genetickým metodám byly nalezeny geny, jejichž mutace zapříčiňují různé nefropatie (např. *ACTN4* nebo *INF2*).

Předkládaná dizertační práce si kladla následující cíle. Za prvé, pokračovat v mutační analýze genu *ACTN4*, která byla popsána v diplomové práci autorky, u dalších glomerulopatií. Za druhé, zavedení mutační analýzy genu *INF2* a následně analyzovat tento gen u pacientů s FSGS/MCD a u speciální skupiny pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou pro renální selhání (ESRD) v kombinaci s pokročilým chronickým onemocněním ledvin (CKD) nebo již vyvinutým ESRD v době diagnózy. Za třetí, provést mutační analýzu genů *NPHS2* a *TRPC6* (metody zavedeny v laboratoři již dříve) u vybraných pacientů ze speciální skupiny. V poslední části se předkládaná práce zabývá expresní analýzou genů, které jsou důležité pro funkčnost podocytů nebo spojené s imunitním systémem člověka. Tato část práce také ověřuje, zda je možné použít poměr expresí genů *NPHS2/SYNPO* při rozlišení českých pacientů s FSGS a MCD.

V rámci mutační analýzy genu *ACTN4*, byla u jednoho pacienta ze speciální skupiny nalezena nová kandidátní kauzální mutace Leu169Pro. Během analýzy genu *INF2* byly identifikovány pouze dříve popsané kauzální mutace a polymorfizmy, u kterých není předpokládán vliv na průběh onemocnění. Všichni pacienti, u nichž byl analyzován gen *TRPC6*, byli nositelé záměny Ala404Val, která by v kombinaci s kauzální mutací v některém z podocytárních genů mohla vést k progresi renálního onemocnění.

Expresní analýza neprokázala mezi pacienty s FSGS a MCD žádné signifikantní rozdíly v poměru genů *NPHS2/SYNPO* ani v dalších studovaných genech.

KLÍČOVÁ SLOVA: Fokální segmentální glomeruloskleróza, minimální změny glomerulů, IgA nefropatie, membranózní glomerulonefritida, *INF2*, *ACTN4*, mutační analýza, expresní analýza

ABSTRACT

Nephrotic syndrome is characterized by proteinuria, hypoproteinemia, edemas and hyperlipidemia. It occurs in primary (e.g. focal segmental glomerulosclerosis, FSGS or minimal change disease, MCD) and in secondary glomerulopathies (e.g. kidney amyloidosis). In primary forms, great attention is paid to the potential genetic background of the disease and due to new molecular genetic methods genes, whose mutations cause different nephropathies (e.g. *ACTN4* or *INF2*) were identified.

The aims of presented doctoral thesis were following. Firstly, to continue the mutational analysis of *ACTN4* that was described in the author´s diploma thesis in other glomerulopathies. Secondly, to implement the mutational analysis of *INF2* and subsequently analyse this gene in patients with FSGS/MCD and in patients from special group characterized by positive family history for end stage renal disease (ESRD) in combination with advanced chronic kidney disease (CKD) or already developed ESRD at the time of diagnosis. Thirdly, mutational analysis of *NPHS2* and *TRPC6* (methods implemented in laboratory earlier) in selected patients from the special group. Finally, expression analyses of genes important for podocyte function or connected with human immune system. This part also verifies the applicability of *NPHS2/SYNPO* expression ratio for distinguishing of Czech patients with FSGS and MCD.

The mutational analysis of *ACTN4* identified the candidate causal mutation Leu169Pro in one patient from the special group. In *INF2* only known casual mutations and different exonic and intronic polymorphisms without effect on phenotype were found. All patients tested for *TRPC6* carried the polymorphism Ala404Val, which can probably lead to progression of renal disease, if it is in combination with casual mutation in some podocyte gene.

Expression analyses showed any significant differences between FSGS and MCD neither in the *NPHS2/SYNPO* ratio nor in other studied genes.

KEY WORDS: Focal segmental glomerulosclerosis, minimal change disease, IgA nephropathy, membranous glomerulonephritis, *INF2*, *ACTN4*, mutational analysis, expression analysis

1. ÚVOD

Chronická nefropatie je označení pro dlouhodobé onemocnění ledvin, které se zpravidla projevuje různými symptomy, mezi něž patří např. snížená funkce ledvin, přítomnost bílkovin v moči a zánět ledvin. Funkce ledvin se postupem času zhoršují, a nakonec dochází k jejich úplnému selhání, což má za následek nutnost podstoupit renální transplantaci.

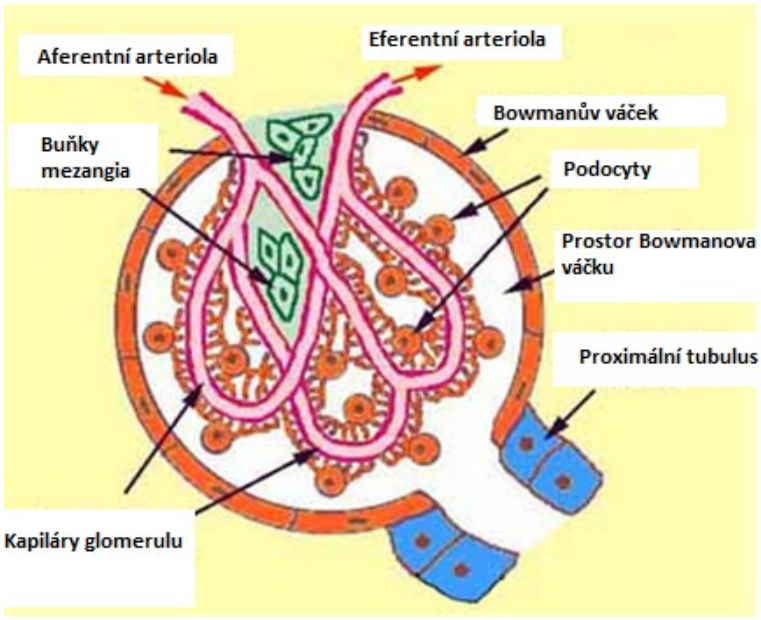
Pochopení etiologie a patogeneze jednotlivých nefropatií je důležitým předpokladem pro zvolení vhodné a účinné terapie, která zmírní progresi onemocnění a tím selhání ledvin buď oddálí, nebo úplně odvrátí. V posledních letech se zvyšuje zájem o analýzu genetického podkladu různých nefropatií. Díky rozvoji molekulárně-genetických metod (např. Sangerovo sekvenování, next generation sequencing – NGS nebo qPCR) jsou objevovány nejen různé geny, jejichž mutace jsou dávány do souvislosti s řadou onemocnění ledvin (např. *ACTN4, INF2, NPHS2* a *TRPC6*), ale i markery, které pomáhají při diagnostice a odhadu prognózy u pacientů s dysfunkcí ledvin.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Ledviny a filtrace krve

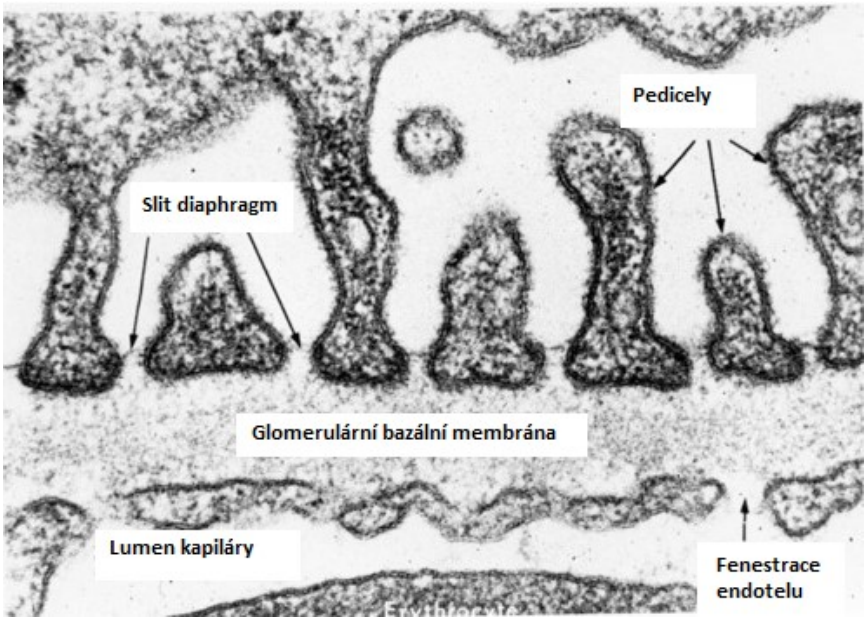
Ledviny jsou párový orgán fazolovitého tvaru nacházející se v tukovém obalu po obou stranách bederní páteře. Zajišťují vylučování odpadních látek z těla a produkci některých hormonů a také regulují vnitřní prostředí organizmu.

Základní funkční jednotkou ledviny je nefron skládající se z Malpighiho tělíska a renálního tubulu. Malpighiho tělísko je tvořeno klubíčkem vlásečnic (glomerulem) ohraničeném Bowmanovým pouzdrem, které přechází v proximální tubulus. V glomerulu probíhá filtrace krve, jejímž výsledkem je vznik primární moči. Ta je následně odváděna proximálním tubulem do distální části nefronu. Přehledně popsáno v Obrázku 1.



Obrázek 1: Struktura Bowmanova váčku. Převzato a upraveno z http://www.siumed.edu/~dking2/crr/rnguide.htm.

Filtrační bariéra má 3 základní složky. Jsou to fenestrované endotelium kapilár, glomerulární bazální membrána (GBM) a podocyty, mezi nimiž se rozprostírá nejdůležitější součást filtrační bariéry – membrána zvaná slit diaphragm (SD, v současné době neexistuje český překlad) [1]. Filtrační bariéru zobrazuje následující Obrázek 2.



Obrázek 2: Struktura filtrační bariéry. Převzato a upraveno z https://quizlet.com/22363034/urinary-em-images-flash-cards/.

Endoteliální buňky kapilár tvořící první část bariéry vznikají z mezenchymálních buněk. V raných fázích vývoje glomerulu nejsou fenestrované a mají krychlový tvar [2]. Během vývoje kapilár se nejprve tvoří překryté otvory, které se postupně přemění na otvory bez membrány o velikosti 60-80 nm [3]. Tyto otvory umožňují vysokou výměnu vody mezi intra– a extracelulárním prostorem a zároveň jsou jimi odstraňovány metabolické produkty, toxiny a tělu cizí látky z krevního oběhu. Tvorba fenestrace endotelu je ovlivněna působením vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) [4]. Ten představuje celou rodinu růstových faktorů (VEGF-A až VEGF-E), které jsou zapojeny v signálních drahách působících při proliferaci, migraci nebo permeabilitě buněk [5]. Podocytární buňky začínají s produkcí VEGF ještě před fenestrací endotelu a následně ji udržují po celý život [6]. VEGF působí jako ligand na membránové receptory VEGFR1/2, které se nacházejí v endoteliálních buňkách kapilár [7]. Po jeho navázání je v celé buňce spuštěna signalizační kaskáda. Podocyty mohou regulovat produkci VEGF a tím i ovlivňovat filtrační vlastnosti fenestrovaných kapilár [8].

Druhou částí filtrační bariéry ledvin je glomerulární bazální membrána tvořená vláknitou sítí složenou z fibrilárních proteinů (převážně kolagen typu IV) [9] a z negativně nabitých proteoglykanů, díky kterým má GBM negativní náboj [10]. Její důležitou úlohu ve filtrační bariéře potvrzuje i patogeneze Alportova syndromu

(dědičná GN), který vzniká v případě mutace genu pro kolagenové řetězce tvořící GBM [11,12].

Poslední vrstvu filtrační bariéry tvoří podocyty, které se nacházejí pouze v glomerulech. Tyto specializované endotelové buňky s bohatě rozvětveným cytoskeletárním systémem mají důležitou úlohu při udržování neporušené a funkční filtrační bariéry. Podocyty syntetizují většinu složek GBM a vyvíjí vysokou katabolickou i anabolickou aktivitu. Důkazem tohoto je velké množství mitochondrií a lyzozomů spolu s velmi rozvinutým endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem. Jejich objemné tělo, vystupuje do prostoru Bowmanova pouzdra a svými dlouhými rozvětvenými výběžky (pedicely, „foot processes“), které se prolínají, pokrývají celý povrch kapilár. Pedicely díky vyztužení aktinovými filamenty mohou měnit svůj tvar a tím dokáží aktivně regulovat míru filtrace [13]. Na základě mikroskopických pozorování byla v první polovině 70. let podrobně popsána tenká proteinová membrána se zipovitou strukturou, tzv. slit diaphragm (SD), jež kryje štěrbiny mezi sousedními podocytárními pedicely [14]. Koncem 90. let došlo k identifikaci prvního proteinu – nefrinu, který je součástí této filtrační membrány [15–17]. Postupným výzkumem byly popsány další proteiny tvořící SD a následně i objasňovány jejich funkce a vzájemné interakce. Výsledkem bylo poznání, že přibližně 40 nm široká slit diaphragm je velmi složitý komplex signálních a adhezních molekul, který slouží nejen jako mechanické síto zamezující průchod molekulám větším, než je sérový albumin (cca 67 kDa), ale také jako receptor a přenašeč signálů vedoucích do podocytů [14,18].

2.2. Nefrotický syndrom

Pojmem nefrotický syndrom (NS) je v nefrologii označován soubor příznaků, zahrnující nefrotickou proteinurii (> 3,5 g / 24 hod.), hypoproteinémii, otoky a hyperlipidémii, která vede ke zvýšenému riziku pro rozvoj aterosklerózy a ischemické choroby srdeční. U pacientů s NS se můžeme setkat i s dalšími závažnými komplikacemi. Objevují se imunodeficience, vyšší výskyt infekcí (způsobené zejména G^+ pneumokoky) a zvýšená srážlivost krve (je výsledkem snížené hladiny regulačních faktorů, např. protein C, protein S, antitrombin, a zvýšené syntézy prokoagulačních faktorů, např. fibrinogen). Pacienti pak mají zvýšené riziko plicní embolie a hluboké žilní trombózy [19-21]. Průběh nefrotického

syndromu u jednotlivých pacientů může být velmi variabilní. Obvykle je nasazena terapie kortikosteroidy a podle odpovědi na ni dělíme následně NS na steroid-senzitivní (SSNS) a steroid-rezistentní (SRNS), u kterého dochází do 7 let ke konečnému selhání ledvin (ESRD) [22].

Nefrotický syndrom se vyskytuje u primárních (postihují pouze ledviny) i sekundárních (součást systémového onemocnění) glomerulopatií. Mezi nejčastější příčiny NS z primárních forem patří fokální segmentální glomerulosklerόza (FSGS), minimální změny glomerulů (MCD) a membranózní glomerulonefritida (MGN). U sekundárních forem najdeme NS nejčastěji u amyloidózy ledvin, diapetické nefropatii (DN) a lupusové nefritidě (LN) [19,20]. Podle typu glomerulopatie, u které se nefrotický syndrom vyskytl, pak hovoříme buď o primárním (idiopatickém) NS, nebo sekundárním NS [23].

2.2.1. Idiopatický nefrotický syndrom

V souvislosti s idiopatickým nefrotickým syndromem (INS) se věnuje velká pozornost jeho geneticky podmíněným (familiárním) formám, které tvoří přibližně 18 % případů. Typ dědičnosti je autozomálně dominantní (AD) i autozomálně recesivní (AR) [24]. Díky rozvoji molekulárně-genetických metod je v současné době známo již několik desítek genů spojených s INS. Jejich produkty mají v buňkách různé funkce, např. slouží jako transkripční faktory nebo se účastní mnohých buněčných procesů, např. proteiny slit diaphragm, proteiny GBM, strukturní a regulační proteiny cytoskeletu, adheze a jaderný transport. Pro ilustraci rozmanitosti genů a funkcí proteinů je v Tabulce 1 uveden jejich výběr [25,26].

Tabulka 1: Příklady genů spojených s idiopatickým nefrotickým syndromem. Informace o funkcích proteinů byly čerpány z databází NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) a OMIM (https://www.omim.org/).

Gen	**Funkce proteinu**
ACTN4	Spojování F-aktinových vláken
ANLN	Váže se k aktinu a účastní se např. růstu a migrace buněk a cytokineze
APOL1	Součást HDL lipoproteinů
ARHGDIA	Účastní se regulace signalizace prostřednictvím Rho-GTPáz
CD2AP	Regulace aktinového cytoskeletu
COL4A3	Součást GBM, řetězec kolagenu typu IV

Gen	Funkce proteinu
COL4A4	Součást GBM, řetězec kolagenu typu IV
COL4A5	Součást GBM, řetězec kolagenu typu IV
COQ8B	Účastní se biosyntézy koenzymu Q10
CRB2	Součást Crumbsova komplexu, který je regulátor buněčné polarity
INF2	Remodelace aktinového cytoskeletu
ITGA3	Účastní se např. buněčné adheze
KANK1	Regulace polymerace aktinu
KANK2	Regulace polymerace aktinu
KANK4	Regulace polymerace aktinu
LAMA5	Součást GBM, účastní se např. buněčné adheze, diferenciace a migrace
LAMB2	Účastní se např. buněčné adheze a diferenciace
MYH9	Účastní se např. cytokineze, buněčného pohybu a pomáhá udržovat tvar buňky
MYO1E	Molekulární motor účastnící se např. intracelulárního pohybu
NPHS1	Nefrin, důležitá součást slit diaphragm, účastní se buněčné adheze
NPHS2	Podocin, důležitá součást slit diaphragm, účastní se regulace glomerulární permeability
NUP93	Nukleoporin, součást jaderného póru
NUP107	Nukleoporin, součást jaderného póru
NUP205	Nukleoporin, součást jaderného póru
NXF5	Transkripční faktor
PAX2	Indukce exprese genu *WT-1*
PLCE1	Katalyzuje hydrolýzu fostatidylinozitolu-4,5-bifosfát
TRPC6	Transport vápenatých kationtů do buněk
WT-1	Transkripční faktor
XPO5	Účastní se jaderného transportu malých RNA

2.3. Fokální segmentální glomeruloskleróza

Fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS) je souhrnná diagnostika popisující histologický nález, při kterém jsou částečně (fokální) poškozeny některé (segmentální) glomeruly. Příčiny FSGS mohou být velice pestré, a to se odráží nejen na projevu i průběhu onemocnění, ale také na reakci na léčbu. Z etiologického hlediska dělíme FSGS následovně [27–29]:

I. Primární (idiopatická) – z neznámých příčin

II. Sekundární

1. Dědičná forma nazývaná též familiární nebo sporadická forma – způsobeno mutacemi v některých genech, např. geny pro α–aktinin-4, WT-1, podocin a β–integrin, a v mitochondriální DNA

2. FSGS asociovaná s viry – např. Parvovirus B19 a HIV asociovaná neuropatie

3. FSGS zapříčiněná přítomností léčiv a drog – např. heroin, interferon-α, lithium, pamidronát

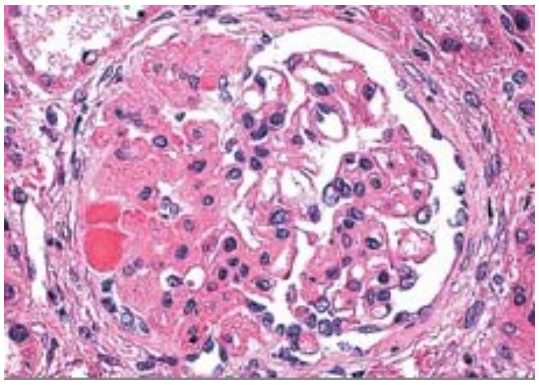
4. FSGS jako adaptivní strukturně-funkční odpověď na glomerulární hyperfiltraci nebo hypertrofii

a) při redukci objemu renální tkáně – např. renální dysplázie, ageneze ledviny, kortikální nefróza a ablace ledviny

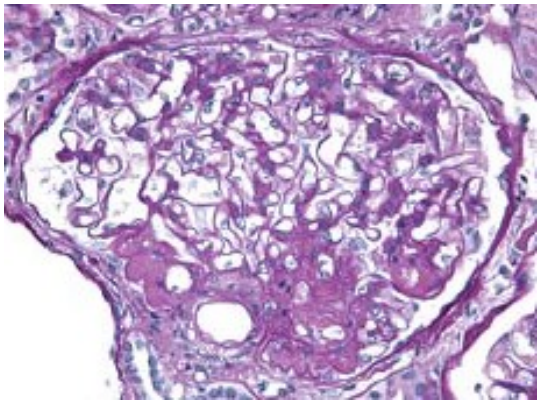
b) při zachování objemu renální tkáně – např. hypertenze, obezita, diabetes mellitus a srpkovitá anémie

V morfologickém dělení se používá Kolumbijská klasifikace, která rozřazuje FSGS na základě histologického obrazu a předpokládané prognózy do 5 skupin [30], viz Obrázek 3.

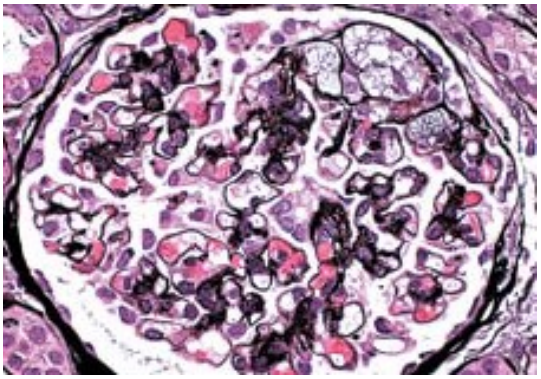
1. nespecifická FSGS (NOS) – charakteristickým rysem je zvýšení objemu extracelulární matrix v místě postižení glomerulu, což vede k destrukci lumen kapiláry, často dochází k nárůstu počtu podocytů a hyalinóze



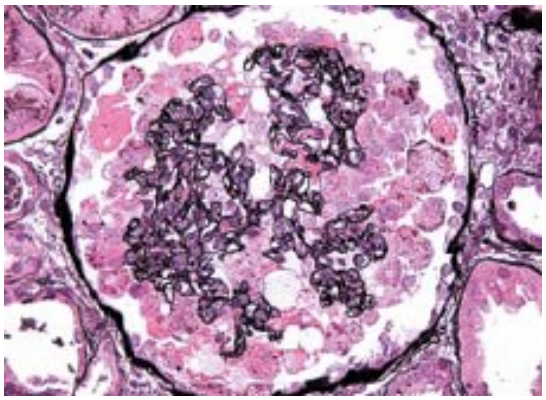
2. perihilární FSGS (PH) – pro postižený glomerulus je typická perihilární hyalinóza a/nebo skleróza



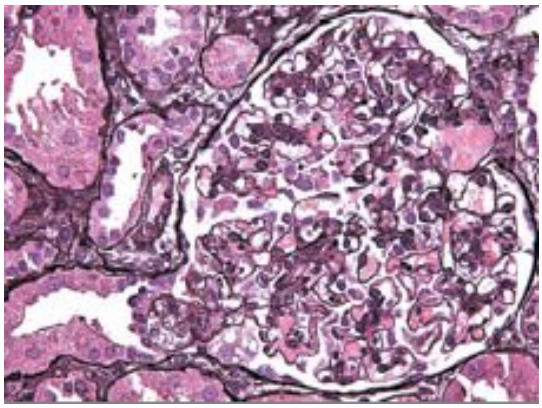
3. buněčná FSGS (CELL) – kapiláry jsou částečně zvětšené a ucpané pěnovými buňkami, nedochází ke kolapsu



4. kolabující FSGS (COLL) – glomeruly kolabují a epitelové buňky proliferují



5. periferní FSGS (GTL) – v místě tubulárního pólu se shlukují pěnové buňky a v místě poškození se shlukují podocyty s epiteliálními buňkami proximálního tubulu



Obrázek 3 (1-5): Kolumbijská klasifikace FSGS. Převzato a upraveno z [30].

Vývoj primárních i sekundárních forem FSGS začíná stejně. Po poškození podocytů dochází ke zploštění a fúzi jejich pedicel, tzv. foot process effacement (český překlad neexistuje), který je způsoben vratnou přestavbou aktinového cytoskeletu probíhající v řádu několika minut. Aktinový cytoskelet je důležitý nejen v celkové struktuře podocytů, ale má i nezastupitelnou úlohu při stabilizaci vnitřní struktury membránových domén podocytů [31,32]. Zajímavostí je, že u primárních forem se foot process effacement vyskytuje ve větším rozsahu než u forem sekundárních [33].

U primárních forem FSGS dochází ve vnější vrstvě Bowmanova váčku k aktivaci a proliferaci parietálních epiteliálních buněk (PEC), což má za následek, že tento epitel obklopí sklerotický glomerulus. Část PEC migruje z vnější vrstvy Bowmanova váčku do vnitřní, kde začnou pokrývat vnější stranu GBM, která odděluje vnitřní fenestrovaný endotel kapilár glomerulárního klubka od pedicel podocytů. Tyto buňky také začnou s produkcí extracelulární matrix do svého okolí, což způsobí zjizvení glomerulu [34–36]. PEC mohou být také označovány jako parietální podocyty, a to díky expresi proteinů typických pro podocyty, např. podokalyxin, nefrin, podocin a synaptopodin [37].

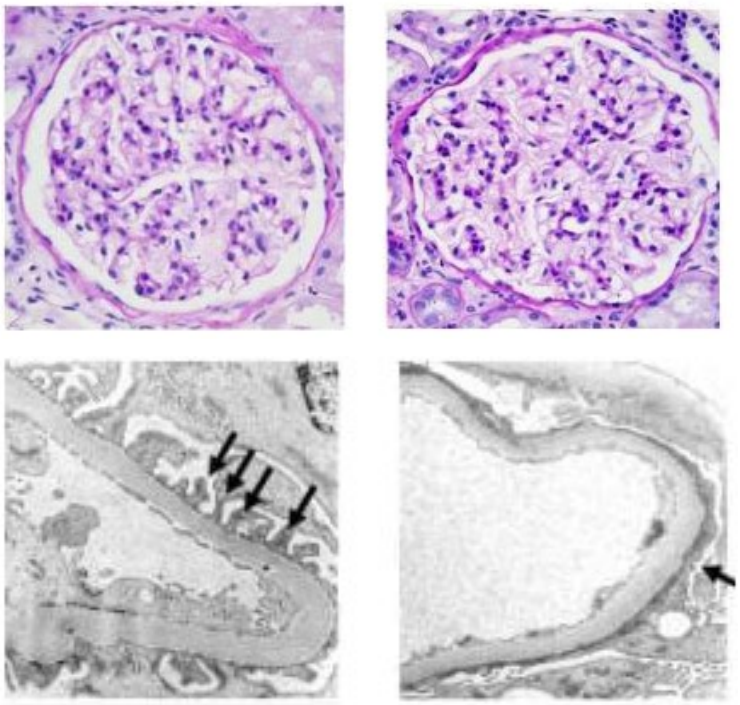
U sekundárních forem FSGS foot process effacement končí oddělením podocytů od glomerulární bazální membrány [38]. Počty podocytů tak na GBM klesají, protože to jsou plně diferenciované buňky, které se nedokáží dělit [39]. Po navození specifických podmínek podstoupí pouze mitózu (jaderné dělení), která ovšem nepokračuje cytokinezí (dělení buňky) [40]. Takto vzniklá holá místa na GBM obsadí PEC, což má za následek adhezi glomerulárního klubíčka s Bowmanovým váčkem. V místě adheze dochází k nesprávné filtraci, která je důsledkem úniku filtrované tekutiny do periglomerulárního prostoru. Ten je nakonec oddělen vrstvou kortikálních fibroblastů od kortikálního intersticia. Částečné poškození se následně šíří po celém nefronu a dochází ke kolapsu kapilár nebo k jejich ucpávání se hyalinem a trombózami [41,42].

Způsob, jak se poškození rozšiřuje, je popsán pomocí několika modelů. První model říká, že nesprávná filtrace je příčinou šíření poškození nejen do celého glomerulu, ale následně i do proximálního tubulu. Peritubulární prostor plynule přechází do paratubulárního prostoru, přičemž tento rozsáhlý prostor vzniká odloučením epitelia proximálního tubulu od tubulární bazální membrány (TBM) [43]. Další varianta naznačuje, že nadměrná resorpce proteinů v proximálním tubulu, uniklých při filtraci v poškozeném glomerulu, má za následek syntézu vazoaktivních a zánětlivých proteinů (ednotelin a MCP-1) tubulárními buňkami. Jejich exprese vede k opakovaným zánětům, které končí intersticiální fibrózou [43,44]. Podstata třetího mechanizmu spočívá v tom, že vazoaktivní hormony epitelin 1 (ET-1) a angiotenzin II (Ang II) mohou působit i jako růstové faktory, zapříčiňující tvorbu extracelulární matrix, což vede k intersticiální fibróze [43,45]. Poslední varianta poukazuje na to, že intersticiální a tubulární buňky začnou produkovat růstové faktory (PDGF). Ty

následně stimulují fibroblasty k proliferaci a tvorbě extracelulární matrix. Výsledkem je opět intersticiální fibróza [43,46].

2.4. Minimální změny glomerulů

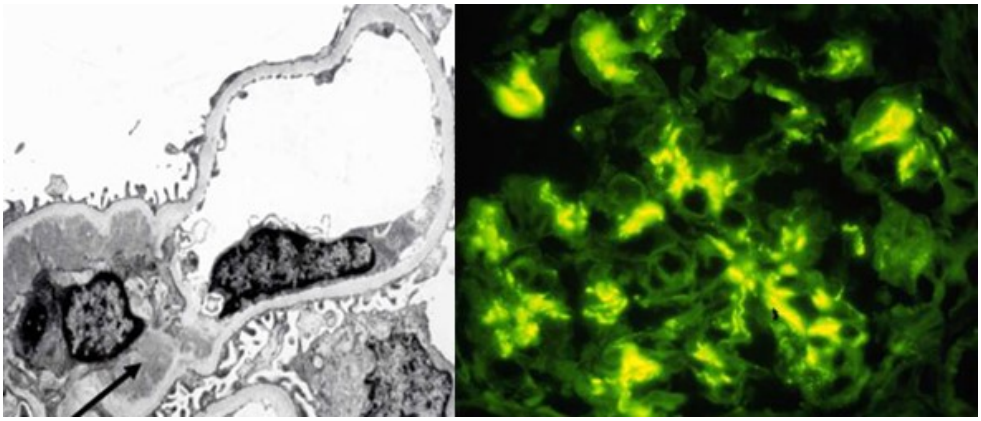
Minimální změny glomerulů (MCD) se ve světelné mikroskopii vyznačují normálním histologickým nálezem v glomerulech, avšak při použití elektronové mikroskopie je patrný, stejně jako u FSGS, foot process effacement, tedy zploštění podocytů a fúze jejich pedicel [47,48], viz Obrázek 4. Na rozdíl od FSGS, která často končí selháním ledvin (ESRD), mají pacienti s MCD relativně dobrou prognózu a lepší klinickou odpověď na terapii kortikosteroidy [49]. Původ může být opět primární nebo sekundární, který je spojovaný s různými typy tumorů, léky, infekcemi a alergiemi [50]. Provázanost obou diagnóz dokládá nejen stejné poškození podocytů, ale i fakt, že stav některých pacientů s MCD se zhoršuje a vede k rozvoji FSGS [49].



Obrázek 4: Porovnání zdravého glomerulu (vlevo) a glomerulu postiženého MCD (vpravo). Vrchní dvojice obrázků pochází ze světelné mikroskopie, spodní z elektronové mikroskopie. Šipky označují pedicely. Převzato a upraveno z https://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/minimal-change-disease.

2.5. IgA nefropatie

IgA nefropatie (IgAN) je světově nejrozšířenější primární glomerulonefritida [51]. Příčinou onemocnění je nadměrné ukládání IgA často s C3 v glomerulárním mezangiu, což vede k jeho proliferaci [52], viz Obrázek 5. Průběh onemocnění může být velmi variabilní od pomalé progrese až k rychlému selhání ledvin [53]. V současné době se pro klasifikaci IgAN a pro odhad progrese onemocnění u jednotlivých pacientů používá Oxfordské skóre (nazývané též MEST skóre), které blíže popisuje Tabulka 2 [51].



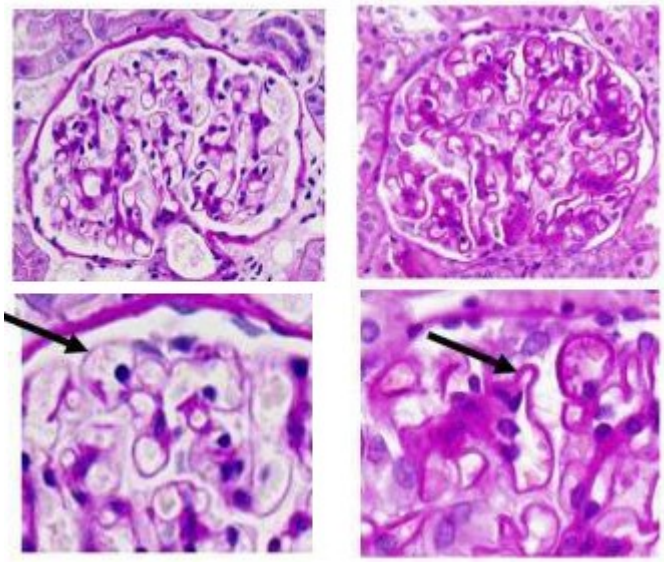
Obrázek 5: Podocytární IgA depozita zobrazené elektronovou mikroskopií (vlevo, označené šipkou) a ve fluorescenční mikroskopii. Převzato a upraveno z https://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/iga-nephropathy.

Tabulka 2: MEST skóre používané při klasifikaci IgAN. Převzato a upraveno z [51].

Typ poškození	Definice	Skóre
Mezangiální hypercelularita	< 4 mezangiální buňky/plochy mezangia = 0 4-5 mezangiálních buněk/plochy mezangia = 1 6-7 mezangiálních buněk/plochy mezangia = 2 > 8 mezangiálních buněk/plochy mezangia = 3 (Skóre se počítá jako průměrné skóre ze všech glomerulů)	M0 ≤ 0,5 M1 > 0,5
Segmentální glomeruloskleróza	Jakýkoli počet glomerulů postižený částečnou sklerotizací nebo přítomnost adheze	E0 - nepřítomna E1 - přítomna
Endokapilární hypercelularita	Zvýšený počet buněk v kapilárním lumen glomerulu, který způsobuje jeho zúžení	S0 - nepřítomna S1 - přítomna
Tubulární atrofie / intersticální fibróza	% kůry postižené tubulární atrofií nebo intersticiální fibrózou, podle toho, co je větší	T0 - 0-25 % T0 - 26-50 % T0 - > 50 %

2.6. Membranózní glomerulonefritida

Membranózní glomerulonefritida (MGN) patří mezí časté příčiny nefrotického syndromu u dospělých, zvláště u mužů. Průběh onemocnění je dělen do 4 fází. První stadium se projevuje mírným ztluštěním GBM a rigiditou kapilár, viz Obrázek 6. Následně mezi GBM a podocyty vznikají granulární depozita, která jsou obvykle tvořena IgG a C3. Tato depozita jsou postupně obklopována výběžky GBM (fáze 2 a 3) až do úplného uzavření (fáze 4) a vytvoří se tak intramembranózní lokalizace. Součástí procesů je také fúze podocytárních pedicel (foot process effacement). U převážné většiny pacientů s MGN se setkáváme s primární (idiopatickou) formou. Sekundární forma je spojována s některými léky, tumory, infekcemi nebo je součástí jiného onemocnění, např. systémový lupus erytematodes (SLE) [54,55].



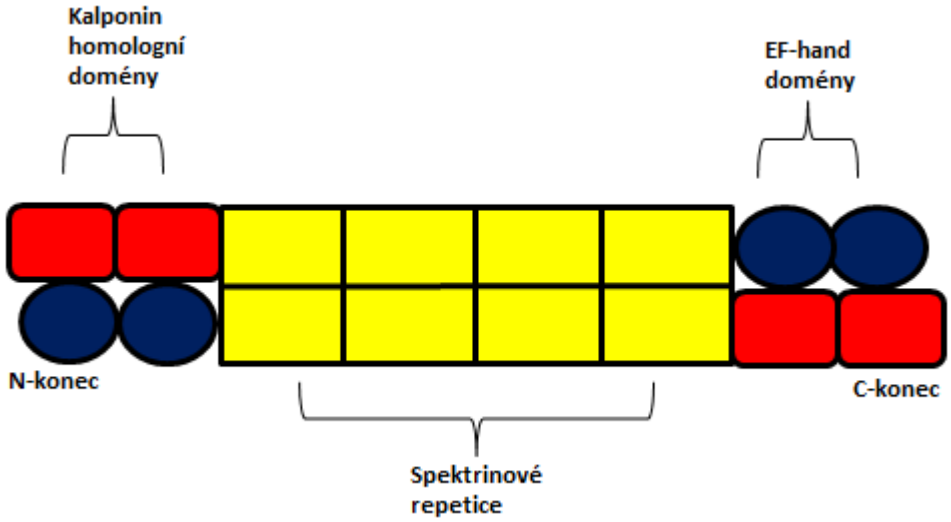
Obrázek 6: Porovnání zdravého (vlevo) a nemocného (vpravo) glomerulu u MGN. Spodní dvojice obrázků zobrazuje detailně ztluštění GBM (označeno šipkou). Převzato a upraveno z https://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/membranous-nephropathy.

2.7. α-aktinin-4

Proteinu α-aktinin-4, který je kódovaný genem *ACTN4*, se podrobně věnuje diplomová práce autorky „Genetické faktory ovlivňující průběh vybraných forem nefrotického syndromu“ obhájené roku 2011 na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Ve své dizertační práci autorka

navazuje na výzkum publikovaný v diplomové práci, a proto je zařazeno krátké shrnutí o tomto genu, respektive proteinu.

Protein α-aktinin-4 se řadí do spektrinové rodiny proteinů [56]. Jeho hlavním úkolem je spojovat F-aktinová vlákna [57]. Základní struktura je antiparalelní homodimer složený z hlavičky a koncové části [58]. Na N-terminální části proteinu se nachází 2 kalponin homologní domény (CH1, CH2) sloužící k vazbě na aktinová vlákna, též označováno jako aktin vázající doména (ABD) [59,60]. Do CH2 domény se mohou také vázat fosfatidylinozitoly, což má za následek ovlivnění funkce proteinu a následně i plasticity celého aktinového cytoskeletu [61-64]. V prostřední části proteinu jsou 4 spektrinové repetice (R1-R4) a C-terminální část obsahuje 2 EF-hand domény (v českých textech je možné setkat se s označením „EF-ruce“), ke kterým se váží vápenaté kationty [59,60]. Schématické znázornění struktury proteinu zobrazuje Obrázek 7. Mezi další vazebné partnery α-aktininu-4 patří např. β-integriny [65], fosfatidylinozitol-3 kináza [66], synaptopodin [67], ZO-1 [68], MAGI-1 [69], vinkulin [70] a PAI-1 [71].



Obrázek 7: Schématické znázornění struktury proteinu ACTN4.

Mutace v genu *ACTN4* jsou spojovány s autozomálně dominantní formou FSGS [72-77]. Současně byl α-aktinin-4 zkoumán v souvislosti s různými typy nádorů, mezi které patří např. rakovina prsu [78], plic [79] a vaječníků [80].

2.8. Invertovaný formin 2

Protein invertovaný formin 2 (INF2) patří do poměrně rozsáhlé rodiny forminů zahrnující celkem 15 proteinů, které je možné rozdělit dle následujícího schématu [81,82]:

1. „Diafonní“ forminy – Dia1-3 (označovány také jako Drf1-3)
2. „Leukocytární“ forminy – FMNL1-3 (označovány také jako FRL1-3)
3. „Aktivátory morfogeneze“ – Daam1,2
4. „Invertované“ forminy – INF1,2 (tyto dva forminy někdy bývají rozděleny do samostatných skupin)
5. Forminy obsahující homologní doménu – FHOD1,3
6. Formin Delfilin – Delphilin (známý také jako glutamátový receptor GRID2IP)
7. „Původní“ forminy – FMN1,2

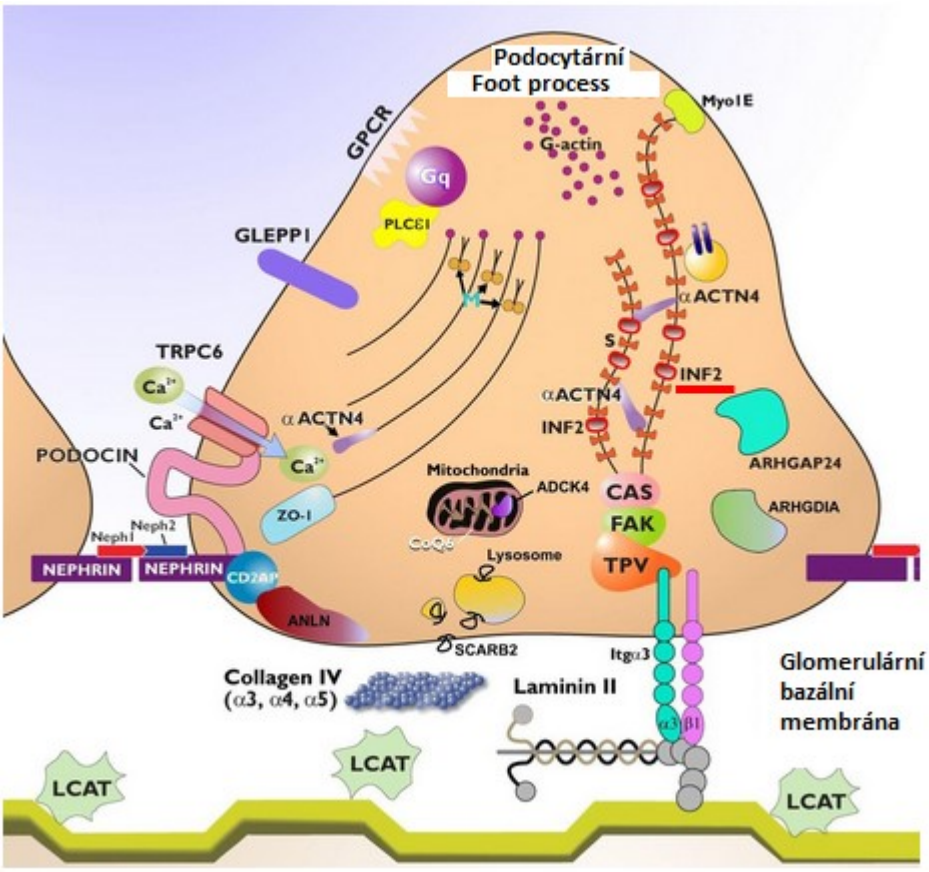
Jejich hlavním úkolem je regulace dynamiky aktinových filament. Mohou ovlivňovat uspořádání mikrotubulů, uplatňují se při rozchodu chromozomů během mitózy i meiózy, transportu RNA a váčků, cytokinezi a v neposlední řadě dokáží ovlivnit i buněčnou polaritu [83,84]. Forminy jsou složeny z několika domén, jejichž kombinace se liší v závislosti na typu proteinu a druhu organizmu [85,86]. Ve všech forminech můžeme nalézt vysoce stabilní formin homologní domény 1 a 2 (FH1, FH2). Důležitou částí většiny forminů je také méně konzervovaná formin homologní doména 3 (FH3) nacházející se na jejich N-konci. Její hranice jsou však variabilní a nelze je generalizovat na všechny forminové proteiny. FH3 doména obsahuje také funkční oblast „diaphanous inhibitory domain“ (DID). Na svém N-konci sousedí s vazebnou doménou pro GTPázy (GBD), která se s ní částečně překrývá. Na svém C-konci přechází v dimerizační doménu (DD). Mezi další typické i méně časté části patří helikální oblast (CC) navazující na DD doménu, regulační oblast „diaphanous autoregulatory domain“ (DAD), WASP homologní motiv 2 (WH2) a PDZ doména (zkratka je složena z počátečních písmen proteinů, ve kterých byla tato doména identifikována, tzn. PSD-95, Dig a ZO-1) [81,82,85].

Nejvíce konzervovaná FH2 doména se schopností tvořit dimery je charakteristickým znakem rodiny forminových proteinů. Dokáže se přímo vázat na F-aktin i G-aktin a je také schopná podněcovat nejen prodlužování stávajících aktinových filament, ale i tvorbu nových filament. Spolu s Arp2/3 komplexy patří mezi důležité nukleátory aktinových vláken. Dimery FH2 domén stabilizují vazbu forminu k aktinu a

pravděpodobně umožňují posun proteinu podél aktinového vlákna. FH2 doméně předchází FH1 doména se spíše regulační úlohou během nukleaci aktinu [87-91]. FH1 doména obsahuje prolin bohatou oblast. Prostřednictvím této oblasti se FH1 váže k profilinu navázanému na G-aktin [92] a pomáhá tak zvyšovat koncentraci tohoto komplexu v místě růstu vlákna, což má za následek rychlejší elongaci [93]. Zároveň spolu s FH2 doménou pomáhá chránit rostoucí vlákno před vytvořením čepičky na jeho konci [94]. Domény DID a DAD jsou regulačními oblastmi forminů. U proteinu INF2 je na C-koncové části DAD doména nahrazená WH2 oblastí, která částečně přebírá její funkce [95], viz níže v této kapitole. GBD vazebná doména slouží jako místo pro navázání malých GTPázových proteinů z rodiny Rho [96]. Poslední zajímavou oblastí je PDZ doména nacházející se u forminů nervových buněk. Díky ní se protein váže s glutamátovým receptorem. Tato vazba iniciuje přestavbu cytoskeletu [97].

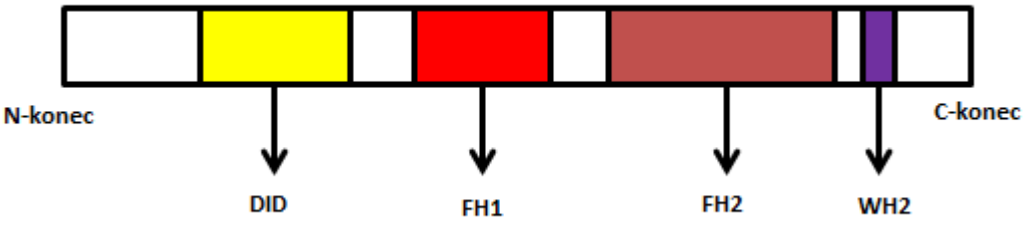
Regulace aktivity je nejlépe popsána u diafonních forminů, které obsahují DID, DAD a GBD domény podléhající autoregulaci. Rho protein soutěží o vazbu s DAD doménou. Z důvodu částečného překryvu GBD vazebné oblasti a FH3 domény v místě DID oblasti nemohou být Rho a DAD navázány současně. V případě, že se regulační DAD doména naváže k DID oblasti, dochází k inhibici aktivity FH2 domény, protože znemožní její vazbu na aktin. Pokud se však naváže GTPáza, FH2 se může vázat na aktin a je aktivní. U dalších skupin forminů nebyly způsoby regulace stále uspokojivě objasněny. Proteiny ze skupiny FHOD jsou pravděpodobně regulovány fosforylací a u Delfilinu se regulace účastní pravděpodobně PDZ doména [82,91]. Regulace u proteinu INF2 bude popsána v následujících částech kapitoly.

Protein invertovaný formin 2 je kódovaný genem *INF2* nacházejícím se na dlouhém raménku chromozomu 14 [98]. Gen má dvě transkripční varianty lišící se C-koncovou částí. První varianta obsahuje na své C-koncové části CAAX motiv, který slouží jako signál pro jeho lokalizaci na cytoplazmatické straně membrány ER a post-translační modifikaci farnezylovou skupinou. Druhá varianta je součástí cytoplazmatické sítě aktinových vláken. Zajímavé je, že v myších ledvinách je majoritně zastoupena CAAX varianta, zatímco produkt bez CAAX motivu tvoří jen minoritní část z celkového množství proteinu [99]. Následující Obrázek 8 zobrazuje umístění proteinu INF2 v podocytu.



Obrázek 8: Umístění proteinu INF2 (červeně podtržený) v podocytu. Převzato a upraveno z [100].

Zpočátku se zdálo, že protein INF2 neobsahuje DID a DAD domény, a proto se dostal do skupiny invertovaných proteinů. U těchto forminů se předpokládalo, že jejich FH1 a FH2 domény se nacházejí u N-konce. Avšak v roce 2006 bylo zjištěno, že INF2 obsahuje DID doménu nacházející se v FH3 oblasti a že DAD doména v C-koncové části proteinu byla nahrazena WH2 oblastí se stejnou schopností vázat se k DID doméně [95]. To vedlo k myšlence evoluční příbuznosti obou motivů [82]. Nutno dodat, že v literatuře se lze setkat s oběma termíny, tzn. WH2 i DAD, jako součást struktury proteinu. Detailní strukturu proteinu popisuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Schématické znázornění struktury proteinu INF2.

WH2 doména má navíc schopnost vázat se k aktinu a spolu s FH2 doménou dokáže podněcovat depolymeraci aktinových filament. Díky tomu je protein INF2 unikátní, protože jako jediný formin dokáže vyvolat nejen polymeraci aktinových vláken, ale i jejich depolymeraci. Rovnováha mezi oběma aktivitami je pravděpodobně udržována fosfátem uvolněným při polymeraci aktinových monomerů, které mají navázaný ATP. Po navázání monomeru se ATP hydrolyzuje a uvolněný fosfát spouští depolymeraci vlákna [95]. Přesný způsob autoregulace proteinu INF2 není zatím zcela známý. Jedna z teorií říká, že monomery aktinu jsou schopné vázat se do WH2 oblasti a soutěží o ni s inhibiční DID doménou. Výsledkem je aktivace polymeračních schopností proteinu [101]. Další teorie poukazuje na to, že vazba DID/WH2 domén inhibuje jeho schopnost depolymerovat aktinová filamenta, avšak neovlivňuje polymerační aktivitu [102].

Mutace v genu *INF2* jsou spojovány s Charcot-Marie-Tooth neuropatií (CMT), při které se může objevit i glomerulopatie [103], a s nefrotickým syndromem, jehož histologický obraz odpovídá FSGS [104]. V případě familiárního výskytu FSGS se jedná o autozomálně dominantní typ dědičnosti [24].

Většina popsaných mutací se nachází v DID doméně, což ukazuje na její kruciální úlohu v autoregulaci proteinu a v patogenezi glomerulopatií. U nosičů některých patologických substitucí bylo pozorováno abnormální rozložení aktinových vláken v podocytech nebo neobvyklá distribuce nefrinu a podocinu ve slit diaphragm [98,105]. Jedním z možných vysvětlení prvního jevu by mohl být fakt, že DID doména proteinu INF2 je schopná vázat DAD doménu diafonních forminů (Dia1-3) a inhibovat jejich schopnost polymerace aktinových vláken důležitých pro správnou morfologii a strukturu podocytů. Zároveň bylo dokázáno, že mutace E184K a R218Q lokalizované v DID doméně proteinu INF2 znemožňují jeho vazbu s Dia forminy. Další možností je, že mutace v DID doméně mohou vést k omezení nebo úplné inhibici autoregulačních schopností proteinu [106].

Ze všech poznatků nicméně vyplývá, že mechanismus vzniku glomerulopatie podmíněné mutacemi v *INF2* genu, respektive proteinu by mohl vycházet ze špatné regulace dynamiky aktinových filament v podocytu [106].

3. CÍLE PRÁCE

1) Navázání na diplomovou práci autorky „Genetické faktory ovlivňující průběh vybraných forem nefrotického syndromu“ (obhajoba 2011) → pokračování v mutační analýze genu *ACTN4* (zavedena v letech 2009-2011 v rámci této diplomové práce)

2) Zavedení mutační analýzy genu *INF2* a mutační analýza u pacientů s FSGS/MCD a u speciální skupiny pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou pro ESRD v kombinaci s pokročilou CKD nebo již vyvinutým ESRD v době diagnózy

3) Mutační analýza genů *NPHS2* a *TRPC6* (zavedeny v letech 2005-2013) u vybraných pacientů

4) Expresní analýza genů důležitých pro správnou funkci podocytů nebo spojených s imunitním systémem člověka. Identifikace markerů, které by vedly k odlišení FSGS a MCD pacientů, zvláště u malých vzorků renální biopsie

5) Ověření použitelnosti poměru expresí genů *NPHS2/SYNPO* pro rozlišení pacientů s FSGS a MCD

4. MATERIÁL

4.1. Soubory pacientů pro mutační analýzu

4.1.1. Pacienti pro analýzu genu *INF2*

Soubor vzorků DNA pro mutační analýzu genu *INF2* obsahoval 109 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou FSGS nebo MCD (51 mužů a 58 žen, průměrný věk v době renální biopsie 41,44 ± 18,91 let). U 19 pacientů byla zjištěna pozitivní rodinná anamnéza (u dalšího člena rodiny zjištěna FSGS nebo MCD v renální biopsii). V okamžiku diagnózy onemocnění byl nefrotický syndrom přítomen u 78 osob. Ten byl definován jako přítomnost proteinure ≥ 3 g / 24 hod. současně s hladinou sérového albuminu ≤ 30 g / l.

Podle klinické odpovědi na léčbu kortikosteroidy byli pacienti rozděleni na kortikorezistentní (41 pacientů) a kortikosenzitivní (34 pacientů), zbytek pacientů, tedy 34 osob, nepodstoupil léčbu kortikoidy. U kortikorezistentních pacientů nedošlo do 6 měsíců při podávání plné dávky kortikoidů (1mg prednisonu na jeden kg tělesné hmotnosti) k významnému poklesu proteinurie. U kortikosenzitivních pacientů byla během terapie kortikoidy dosažena remise. Podrobná charakteristika pacientů z této skupiny je uvedena v Tabulce 3.

Gen *INF2* byl zároveň analyzován u speciální skupiny 6 pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou pro ESRD v kombinaci s pokročilou CKD nebo již vyvinutým ESRD v době diagnózy.

Vzorky krve pro izolaci DNA pocházely ze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Fakultní nemocnice v Motole. Všichni pacienti podepsali před odběrem krve informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením.

Tabulka 3: Charakteristika pacientů s diagnózou FSGS/MCD. Data jsou prezentována jako průměr ± SD nebo počet (procento). Nefrotický syndrom byl definován jako přítomnost proteinure ≥ 3 g / 24 hod. současně s hladinou sérového albuminu ≤ 30 g / l.

Charakteristika	Skupina / Jednotka	Počet / Hodnota
Díagnóza	FSGS	77 (70,6 %)
	MCD	32 (29,4 %)

Charakteristika	Skupina / Jednotka	Počet / Hodnota
Pohlaví	Muž	51 (46,8 %)
	Žena	58 (53,2 %)
Rodinná anamnéza	Positivní	19 (17,4 %)
	Negativní	90 (82,6 %)
NS v době diagnózy	Ano	78 (71,6 %)
	Ne	31 (28,4 %)
Klincká odpověď na léčbu kortikoidy	Senzitivní	34 (31,2 %)
	Rezistentní	41 (37,6 %)
	Bez imunosupresivní terapie	34 (31,2 %)
Průměrný věk v době diagnózy	Roky	41,44 ± 18,91
Průměrná proteinurie v době diagnózy	gram / 24 hod.	5,67 ± 4,64
Průměrná hodnota sérového albuminu v době diagnózy	gram / litr	28,05 ± 9,48

4.1.2. Pacienti pro analýzu genu *ACTN4*

Pro mutační analýzu vybraných exonů genu *ACTN4* bylo vybráno 155 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou IgAN (100 mužů a 55 žen). Analýza vybraných exonů genu *ACTN4* byla také provedena na souboru 56 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou MGN (34 mužů a 22 žen). Podrobná charakteristika obou skupin pacientů je uvedena v Tabulkách 4 a 5.

Všechny vzorky krve pro izolaci DNA pocházely ze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Všichni pacienti podepsali před odběrem krve informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením.

Mutační analýza celého genu *ACTN4* byla také indikována u 3 osob (č. 133, 134 a 138) ze speciální skupiny pacientů pro analýzu genu *INF2*, viz kapitola 4.1.1.

Tabulka 4: Charakteristika pacientů s IgAN. Data jsou prezentována jako průměr ± SD nebo počet (procento). Nefrotický syndrom byl definován jako přítomnost proteinure ≥ 3 g / 24 hod. současně s hladinou sérového albuminu ≤ 30 g / l.

Charakteristika	Skupina / Jednotka	Počet / Hodnota
Pohlaví	Muž	100 (64,5 %)
	Žena	55 (35,5 %)
NS v době diagnózy	Ano	12 (7,7 %)
	Ne	136 (87,8 %)
	Údaje nebyly k dispozici	7 (4,5 %)
Průměrný věk v době diagnózy	Roky	42,66 ± 14,67

Charakteristika	Skupina / Jednotka	Počet / Hodnota
Průměrná proteinurie v době diagnózy	gram / 24 hod.	2,44 ± 2,31
Průměrná hodnota sérového albuminu v době diagnózy	gram / litr	37,53 ± 7,97

Tabulka 5: Charakteristika pacientů s MGN. Data jsou prezentována jako průměr ± SD nebo počet (procento). Nefrotický syndrom byl definován jako přítomnost proteinure ≥ 3 g / 24 hod. současně s hladinou sérového albuminu ≤ 30 g / l.

Charakteristika	Skupina / Jednotka	Počet / Hodnota
Pohlaví	Muž	34 (60,7 %)
	Žena	22 (39,3 %)
NS v době diagnózy	Ano	31 (55,4 %)
	Ne	25 (44,6 %)
Průměrný věk v době diagnózy	Roky	55,51 ± 15,09
Průměrná proteinurie v době diagnózy	gram / 24 hod.	6,39 ± 5,23
Průměrná hodnota sérového albuminu v době diagnózy	gram / litr	25,57 ± 11,81

4.1.3. Pacienti pro analýzu genů *NPHS2* a *TRPC6*

Geny *NPHS2* a *TRPC6* byly analyzovány u 3 (č. 133, 134, 138) osob ze speciální skupiny pacientů pro analýzu genu *INF2*, viz kapitola 4.1.1.

4.1.4. Příbuzní pacientů

V případě potřeby ověřit způsob přenosu některých záměn nalezených u pacientů s FSGS/MCD nebo u osob ze speciální skupiny pacientů pro analýzu genu *INF2*, byli kontaktováni příbuzní těchto pacientů s žádostí o poskytnutí vzorku krve pro izolaci DNA a následnou mutační analýzu daného úseku. Všichni oslovení příbuzní pacientů podepsali před odběrem krve informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením.

4.1.5. Kontrolní soubor

Kontrolní soubor (nazýváni též jako normálové, resp. kontroly nebo dobrovolníci) pro mutační analýzu genů *ACTN4* a *INF2* v rámci této dizertační práce byl vytvořen

z dobrovolných dárců krve, kteří podepsali informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením. Soubor obsahoval náhodně vybrané vzorky DNA mužů i žen. U všech osob zařazených do kontrolního souboru byl přítomen normální močový sediment bez proteinurie.

4.2. Soubor pacientů pro expresní analýzu

Soubor vzorků renálních biopsií pro expresní analýzu obsahoval 24 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou primární FSGS (7 mužů a 10 žen, průměrný věk v době renální biopsie 46,1 ± 10,3 let) nebo MCD (4 muži a 3 ženy, průměrný věk v době renální biopsie 44,7 ± 17,4 let).

Vzorky renálních biopsií pocházely ze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně a Fakultní nemocnice Olomouc. Všichni pacienti podepsali před renální biopsií informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením.

5. METODY

5.1. Izolace nukleových kyselin

5.1.1. Izolace DNA

Vzorky krve (5 ml) byly odebrány do zkumavky s EDTA a do doby izolace byly uchovávány při teplotě -20˚C. Genomová DNA byla izolovaná vysolovací metodou nebo na izolační lince QIAcube (Qiagen, Německo) s použitím kitu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Německo) podle pokynů výrobce. V obou případech byla izolace provedena z lymfocytů periferní krve (200 µl nesrážlivé krve). Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na nanofotometru (Implen GmbH, Německo) při OD $_{260/280}$.

5.1.2. Izolace RNA

Vzorky renálních biopsií byly před izolací uchovávány ve stabilizačním médiu, RNA later (Ambion, USA), při teplotě -20˚C. Celková RNA byla izolovaná ze směsného vzorku biopsie ledvin pomocí GenElute^{TM} Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA) podle pokynů výrobce. Koncentrace vyizolované RNA byla změřena na nanofotometru (Implen GmbH, Německo) při OD $_{260/280}$.

5.2. Mutační analýza

5.2.1. Použité primery

5.2.1.1. Primery pro gen *INF2*

Pro mutační analýzu genu *INF2* byly použity primery (GENERI BIOTECH, ČR) navržené v programu Primer-Blast, viz Tabulka 6. Některé dlouhé exony musely být rozděleny na více analyzovaných úseků se vzájemným překryvem. Tyto části pak byly nazvány podle čísla exonu a pořadí v exonu, např. exon 2a nebo exon 8c. Exon 2 byl kvůli své délce zkoušen analyzován oběma způsoby (rozdělený na části i jako celek). Dva exony (14 a 15) mohly být analyzovány dohromady díky jejich malé délce a krátké intronové sekvenci mezi nimi (nazváno exon 14 + 15). Ke každému

primeru byl přidán 18nukleotidový úsek (M13), který zajistil snazší použití. Do směsi pro sekvenační reakci každého úseku byl přidáván pouze univerzální primer M13, viz Tabulka 7 v odpovídajícím směru (přímý – forward / zpětný – reverse).

Tabulka 6: Sekvence primerů použitých pro mutační analýzu genu *INF2*.

Exon	**Přímý primer – F (5′ → 3′)** **Zpětný primer – R (5′ → 3′)**	**Délka fragmentu (bp)**
2	GCCAGGAGGACAGCCCCCATC TGGGCCTGAAGCCTCATACCAG	524
2a	CCCATCCCCTCCCCGCTGACG AGGGCGTCGGAGATACGTGCAAC	339
2b	CTGTGGTCAACTACTCCGGCCT CATACCAGGTCCCCAGCGTCC	307
3	ACAGGCATGGGAAGGGGTGCATT CTGCTGGCTGCACACCGTCTGT	265
4	TGGACCACTACAAGGTGGGCGG GTGGATGCAGCATGGGATGCACT	320
5	GTCTCTGGTGTCCCATGAGTG TGCTTAGGTGAGGTGGCTGG	245
6	CTGGTACACTGGCGCTGAC AGCCTCTGGACCTCAGGG	298
7	CTTAGTCCACCAGGGAGGGG TAAGACCTCAGTGTCTGCCCA	256
8a	CTCTTCCTCAAGCCCCCATC ACGCCTGCTGCTCCA	341
8b	TGAAAGTTTCGCAGCCCAGA GATGACCTCCTCCATGCCTC	398
8c	CTCCTCCACCCCCACCT CGCACACAAGTTCCATGTGC	290
9	GCAGGACATCCTTTAGACCCT TTGGCATCGAGGAAAGTGATCT	358
10	AGCGACTATTCTCCTTCCCTG CAAGTCAGAAGGCTCAGGTGG	292
11	CCAGGTGGGGTCCCAAAGA ACAGCCTCTCCCTTGGTTGG	242
12	TACCTCTGCCCTGAACCGTGA CCTATTCCTGCTCTCCTCCCAC	277
13	CCAGAGCCCTGTGCTGAGTG CTTAGGTGCTCTTAGCAGCCATT	300
14+15	GGGGGCTCCGAACCAAGA ATGGCCTCTACGCCTCTACAC	375
16	TCCCCAGGTGGAGAGTATGAC AGGGAAGTGTTCTATTGGGCA	276

Exon	Přímý primer – F (5′ → 3′) Zpětný primer – R (5′ → 3′)	Délka fragmentu (bp)
17	CGTCAGCCGTTGCTGTCTCT TCGCCCAGCTCACTCTATCA	227
18	CTCCTTGTCAGAGACCACCGTC GGACCCCACTCTAGCCAGACA	340
19	CAGAGGCACCTTTCGTCGG GAGCACAGACAAGGATCCCA	295
20	CTGGGATCCTTGTCTGTGCTCC AGGCACAGGGTAGGGACAGT	321
21a	GGTGCCTGCCCTTCACTG TGAGCATCTCCCAGAGTCAC	322
21b	GGTATGTGGATGCCAGCGAT CTCCTCGTCCTCGTCCTCAT	299
21c	CACAAGTGAGGGGCTGGAG CTGGCGTGGGACGGTG	293
22	GATAAGCCGTTGAGTGCGTT AGAGAAGCCAGGTTAGTGTCC	198

Tabulka 7: Sekvence M13 primerů.

Úsek	Přímý primer – F (5′ → 3′) Zpětný primer – R (5′ → 3′)
M13	TGTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGACC

5.2.1.2. Primery pro gen *ACTN4*

Pro mutační analýzu genu *ACTN4* byly použity primery (GENERI BIOTECH, ČR) navržené v programu Primer-Blast, viz Tabulka 8.

Tabulka 8: Sekvence primerů použitých pro mutační analýzu genu *ACTN4*.

Exon	Přímý primer – F (5′ → 3′) Zpětný primer – R (5′ → 3′)	Délka fragmentu (bp)
1	AGCTGAGGCGGGAGCGGAC GGCCCCCTCAGAAAAGCCCCT	260
2	CAGGCTGACTCTGCGCACTGTCCTT GGGTCTCTGGGGACCGCTGTGG	228
3	GGGCCAGCAGAGGAACCTGC AGCGCCCTGCCACCAACAAA	348
4	GCCACCTTCAGGTTGGGCGG GGAGCCAAGAGGCAGGCAGC	357

Exon	Přímý primer – F (5′ → 3′) Zpětný primer – R (5′ → 3′)	Délka fragmentu (bp)
5	ACCCCAGGCCTGAGCCGAAA GGGCTGACTGAGGGCTGGCA	301
6	CCTGGCACAGGCCAGACTGC AGGGGGTCAGACAGGGCACG	254
7	GTGCCCTCCCGCTCACACAT ATGTGCCCACAGCCCCTTGC	332
8	CGCCCTACTCGGGCAGTTTAACCCT GTGAGCACGGGAGGCGAGAGG	204
9	AAGGGACGTGCCCGTCAGGA TGGTCTGTGACCACGCAGCC	290
10	GGCAGCCCGTCAGCACTCTG TAGGGCTGCCTCTGCCCCTG	345
11	ATCCCCCTGGGTGCCTCCAC GTGGCAGGGGGCTGTGTGTG	305
12	TGTGGTCTAAGCGTCTCTCTGCTC GGCTGTGGTGAGAGCCAGGTGAT	230
13	TGGCCTGGGAACCTTGGGGG CTCTCCGTGGGAGGTGGGGG	304
14	ACTGACCTGCCTTCCCTCTGTCCCT GGTCATGGGCTGAGATCAGGCCC	291
15	ACCATCGAGGAGATTGAGGTTCGC GGCATGGTCCCGTTTTGGCA	404
16	ACCTCCCTGACCGCTCCCACAC GACCCCCTCACTACGGGAGCTCT	239
17	TGGGCTCCTCCAGGTGGTCAGT CCGAACCATTTCCAGTGAGGAAGC	319
18	TTTCCCCAGGGCGGGAGGAC AGGTGTGGGCTGGTACGGCA	311
19	GATCCCTCATCCTGGTCTCCACG AGTTAATGCCATGGTCCGCTGG	183
20	CACCAGTGTGGGCCTGGCTG TCTGGGGCAGGCAGGATGGG	350
21	GGGACAAGGTGAGCGAGACCCCT AGGAATGGGACTGTGGGGCTGCC	359

5.2.1.3. Primery pro gen *NPHS2*

Pro mutační analýzu genu *NPHS2* byly použity primery (GENERI BIOTECH, ČR) navržené v programu Primer-Blast, viz Tabulka 9.

Tabulka 9: Sekvence primerů použitých pro mutační analýzu genu *NPHS2*.

Exon	Přímý primer – F (5′ → 3′) Zpětný primer – R (5′ → 3′)	Délka fragmentu (bp)
1	GCAGCGACTCCACAGGGACT TCCACCTTATCTGACGCCCC	420
2	AGTCAGTGAATACAGTGAAG GGCCTCAGGAAATTACCTA	203
3	TTCTGGGAGTGATTTGAAAG TGAAGAAATTGGCAAGTCAG	168
4	AAGGTGAAACCCAAACAGC CGGTAGGTAGACCATGGAAA	204
5	CATAGGAAAGGAGCCCAAGA TTTCAGCATATTGGCCATTA	293
6	GGGTTTAGGCATGCTCTCCT TTTCCTTTATCATACAGTTCTTGC	165
7	CTAAATCATGGCTGCACACC CTTCCTAAAGGGCAGTCTGG	167
8	GGTGAAGCCTTCAGGGAATG TTCTATGGCAGGCCCCTTTA	380

5.2.1.4. Primery pro gen *TRPC6*

Pro mutační analýzu genu *TRPC6* byly použity primery (GENERI BIOTECH, ČR) navržené v programu Primer-Blast, viz Tabulka 10.

Tabulka 10: Sekvence primerů použitých pro mutační analýzu genu *TRPC6*.

Exon	Přímý primer – F (5′ → 3′) Zpětný primer – R (5′ → 3′)	Délka fragmentu (bp)
1	TGGAACTGCCCACTCGGCTC ACTCCTGCGAGCGCACAACC	298
2a	GGCAAGTCATTTGGCACACT CCAACTGTAGGGCATTCTGG	316
2b	CAGTGGTGCGGAAGATGTTA TGGAGTCACATCATGGGAGA	332
2c	TTTGCTGAAGGCAAGAGGTT AGCCGTCATGACTGGATCTT	336
2d	TGACTCGTTTAGCCACTCCA GGTAGCGATCACAACTTTTGC	328
3	TCTGAAGCATAGTAAAACGTGGT CCCTTTATCCTTATTTAGCACCAA	313
4	TCGTTTATGCTGAACCTTTCTT ACCCAACTGTGATTCCCTGA	326

Exon	Přímý primer – F (5′ → 3′) Zpětný primer – R (5′ → 3′)	Délka fragmentu (bp)
5	GGAGATCATTGGAATGTGCAG CCAACTGCTAAGACTGCAAACA	365
6	CAGCTAAGGCTGAATGCGAT TGAGAATTGTGCAGTAACCGA	377
7	CGCAGAAAAAGAAGTTACCTAAA CCCATGGACTTACATAAACGC	420
8	TTTGCAGACACTAAACAAACTCA AGCAGTCCATGCTTTCATCC	383
9	TGCATTTCCTTGCTGAACTG AAAGGGATGTGGCATAGTGG	316
10	AGCACTTGCAAAGGGAAGAA AGATAAGCCCGATCATGTGC	271
11	GACAACCTCTAACAAACAGCCA AAGAATCACATAGTTCAAGAACCTAAA	369
12	TCGCCTGCATCCTGGCTGAATC AGCTCTCCAGGCACTCTGCG	305
13	GTTTTTCCGCATTGCGTATT GCCCATTGGCACTTAAGAAA	292

5.2.2. PCR reakce

PCR reakce s teplotním gradientem byla použita při hledání optimálních anelačních teplot u primerů pro gen *INF2*, které byly následně použity pro HRM analýzu. Metoda PCR amplifikace s konstantní anelační teplotou primerů a následnou přímou sekvenací byla použita u pacientů, jejichž DNA nereagovala při standardní HRM analýze nebo upraveném HRM protokolu, viz kapitola 5.2.3, a také u 3 pacientů, kterým byla indikována mutační analýza genů *ACTN4, NPHS2* a *TRPC6*. Anelační teploty primerů použité při těchto reakcích jsou popsány v Tabulce 11. PCR reakce s konstantními anelačními teplotami primerů 69 ˚C (exon 3) a 64 ˚C (exon 8b) předcházela upravenému HRM protokolu (gen *INF2*), viz kapitola 5.2.3, a také použití restrikční endonukleázy (v tomto případě byla anelační teplota primerů 68 ˚C), viz kapitola 5.2.6.

Složení reakční směsi ovlivňoval typ použitého kitu, což přehledně ukazují Tabulky 12-14. Amplifikace probíhala v přístroji MyCycler verze 1.065 (Bio-Rad Laboratories, USA). Tabulka 15 shrnuje jednotlivé části PCR amplifikace.

Tabulka 11: Anelační teploty genů *ACTN4, INF2, NPHS2* a *TRPC6* při PCR reakci.

Gen	Exony	Teplota (˚C)
ACTN4	Všechny exony	65
INF2	Všechny exony	69
NPHS2	1, 7	62
	2 – 5, 8	56,3
	6	55
TRPC65	Všechny exony	58

Tabulka 12: Poměry složek ve směsi pro PCR reakci. V tomto případě byla základní reakční směs (voda, pufr, polymeráza, dNTPs a $MgCl_2$) namíchávána přímo v laboratoři a následně rozpipetována podle požadovaného objemu, viz Tabulka 13. Použita Taq polymeráza, součástí balení byl i pufr a $MgCl_2$ (Fermentas, USA), dNTPs (Fermentas, USA).

Složka	Objem (µl)
Voda (PCR kvalita, bez nukleáz)	37
10X Taq pufr (bez $MgCl_2$, s NH_4)	5
$MgCl_2$ (c = 25 mM)	3
dNTPs (c = 10 mM, každého typu)	1
Primer F (c = 10 pmol / µl)	1
Primer R (c = 10 pmol / µl)	1
Taq polymeráza (c = 1 jednotka / µl)	1,2
Celkový objem	**49,2**

Tabulka 13: Používané objemy reakční směsi míchané v laboratoři.

Složka	Objem (µl)	Objem (µl)	Objem (µl)
Základní reakční směs	23	15	9,5
Templátová DNA (c = 10 ng / µl)	1	0,7	0,6
Celkový objem	**24**	**15,7**	**10,1**

Tabulka 14: Poměry složek ve směsi pro PCR reakci při použití komerčního kitu PPP Master Mix (Top-Bio, ČR).

Složka	Objem (µl)	Objem (µl)
Ředěný PPP Master Mix (5 : 4 = zásobní roztok mixu : voda (PCR kvalita, bez nukleáz))	14	10
Primer F (c = 10 pmol / µl)	0,25	0,2
Primer R (c = 10 pmol / µl)	0,25	0,2
Templátová DNA (c = 10 ng / µl)	0,5	0,5
Celkový objem	**15**	**10,9**

Tabulka 15: Podmínky PCR reakce.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (˚C)	Čas (min.)
Aktivace polymerázy	1	95	04:00
Amplifikace	40	95	00:30
		Anelační teplota / Teplotní gradient	00:30
		72	00:30
Závěrečná elongace	1	72	07:00
Chlazení	1	4	∞

5.2.3. High resolution melting metoda

High resolution melting (HRM) metoda, která byla použita při analýze genu *INF2*, umožňuje v dvouvláknových úsecích DNA identifikovat nejen jednonukleotidové záměny v heterozygotním i homozygotním stavu, ale i delece a inzerce. Metoda je rozdělena na 2 části. Nejprve se analyzovaný úsek amplifikuje a následně probíhá vlastní HRM analýza. Jednotlivé fáze celého procesu jsou podrobněji popsány v následujícím odstavci:

1) Amplifikace analyzovaného úseku v přítomnosti interkalační barvivo (SYBR green). V každém cyklu PCR reakce je měřena koncentrace DNA na základě intenzity fluorescence barvy, takže tato fáze je vlastně real-time PCR.

2) Po amplifikaci jsou dvouřetězcové úseky DNA zahřívány, až dojde k jejich úplné denaturaci.

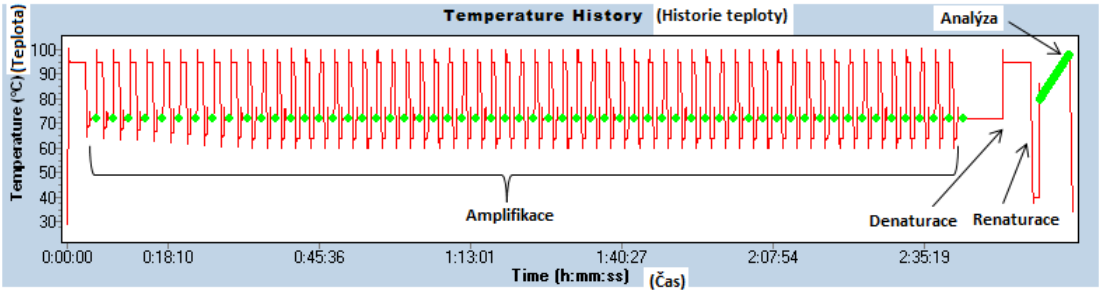
3) V dalším kroku dochází rychlým zchlazením vzorků k renaturaci jednořetězcových úseků. Díky tomuto se párují řetězce, které jsou nejblíže u sebe, a mohou tak vznikat nejen homoduplexy, ale i heteroduplexy.

4) V následující fázi jsou vzorky pomalu ohřívány a zároveň je konstantně měřena klesající intenzita fluorescence interkalované barvy, která se postupně uvolňuje z tajících duplexů.

5) Nakonec jsou vzorky zchlazeny na 37 ˚C a mohou být vyndány z přístroje. Produkty HRM metody je možné použít jako templát do sekvenační reakce.

6) Ze změřených údajů program Light Cycle 480 Gene Scanning Software (Roche diagnostics, Švýcarsko) vygeneruje křivku tání každého vzorku a na základě jejich srovnání je možné rozlišit různé genetické variace.

Celá analýza, kterou shrnuje Obrázek 10, probíhala v přístroji Light Cycler 480 (Roche diagnostics, Švýcarsko). Použitý protokol celé metody včetně doby trvání a teploty každé fáze zobrazuje Tabulka 16. K analýze byl použit kit LightCycler 480 HRM Master (Roche diagnostics, Švýcarsko). Anelační teploty jednotlivých exonů jsou ukázány v Tabulce 17, poměr jednotlivých složek reakční směsi a charakteristiku jednotlivých fází podrobně popisuje Tabulka 18. Jednotlivé výsledky celé analýzy zobrazují Obrázky 11-14. K pipetování vzorků byla používána automatická pipetovací linka epMotion® 5075 (Eppendorf, Německo).



Obrázek 10: Jednotlivé fáze HRM metody.

Tabulka 16: Charakteristika a podmínky jednotlivých fází HRM metody.

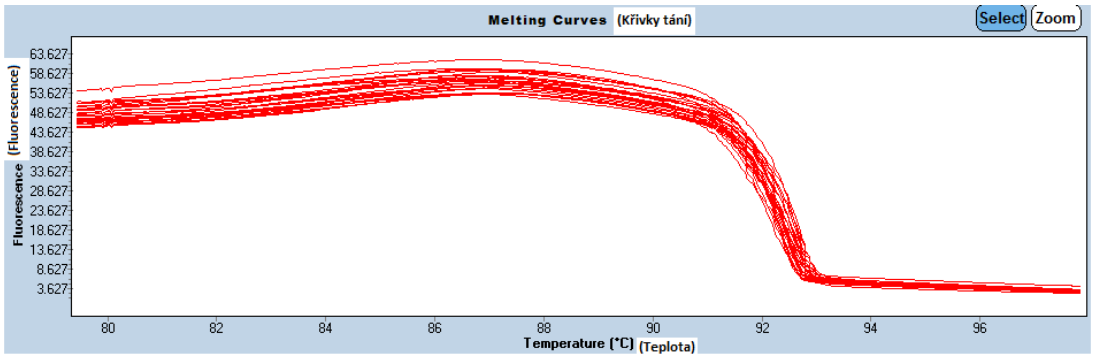
Fáze	Počet cyklů	Teplota (˚C)	Čas (min.)
Aktivace polymerázy	1	95	02:00
Amplifikace 1	10	95	01:00
		Anelační teplota 1	00:30
		72	01:00
Amplifikace 2	40 - 60	95	00:30
		Anelační teplota 2	00:30
		72	01:00
Závěrečná elongace	1	72	07:00
HRM	1	95	05:00
		40	01:00
		80 → 98 (0,02 ˚C / s)	
Chlazení	1	37	00:01

Tabulka 17: Anelační teploty exonů 1 – 8a, 8c – 21c. Použit program s postupně se snižující anelační teplotou, tzv. touch down metoda.

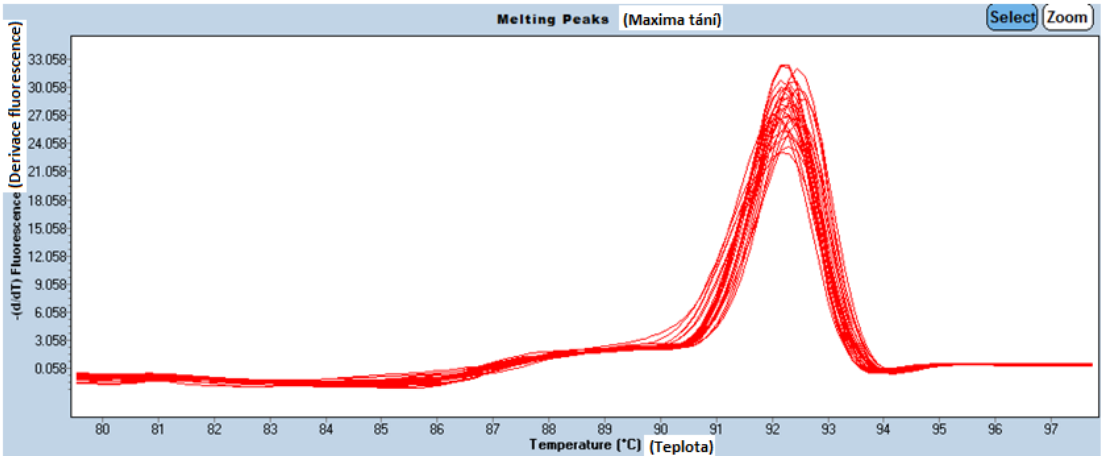
Exon	Počátení T1 (˚C)	Konečná T1 (˚C)	Počet cyklů při T2	Rychlost klesání T1	T2 (˚C)	Počet cyklů při T2
2	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	40
2a	69	64	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	64	43
2b	69	64	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	64	43
3	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
4	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	60
5	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
6	69	64	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	64	50
7	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
8a	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
8c	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
9	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	60
10	67	63	10	0,4 ˚C / 1 cyklus	63	60
11	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
12	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	40
13	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	60
14+15	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
16	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
17	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	40
18	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	40
19	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
20	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	60
21a	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
21b	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	50
21c	70	65	10	0,5 ˚C / 1 cyklus	65	40
22	68	64	10	0,4 ˚C / 1 cyklus	64	50

Tabulka 18: Poměry složek ve směsi pro HRM metodu.

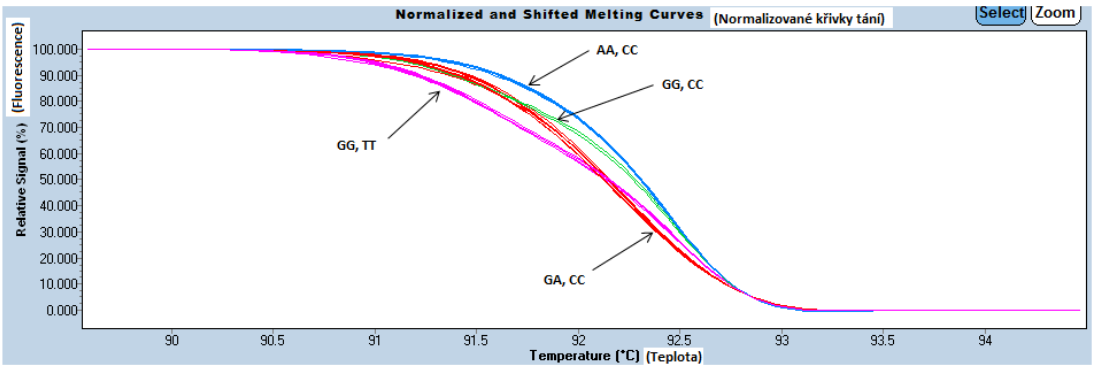
Exony	**2 – 8a, 8c – 21**	**22**
Složka	**Objem (µl)**	**Objem (µl)**
MasterMix 2X	5	5
$MgCl_2$ (c = 25mM)	1	0,7
Voda (PCR kvalita, bez nukleáz)	2	2,3
Primer F (c = 10 pmol / µl)	0,5	0,5
Primer R (c = 10 pmol / µl)	0,5	0,5
Templátová DNA (c = 10 ng / µl)	1	1
Celkový objem	**10**	**10**



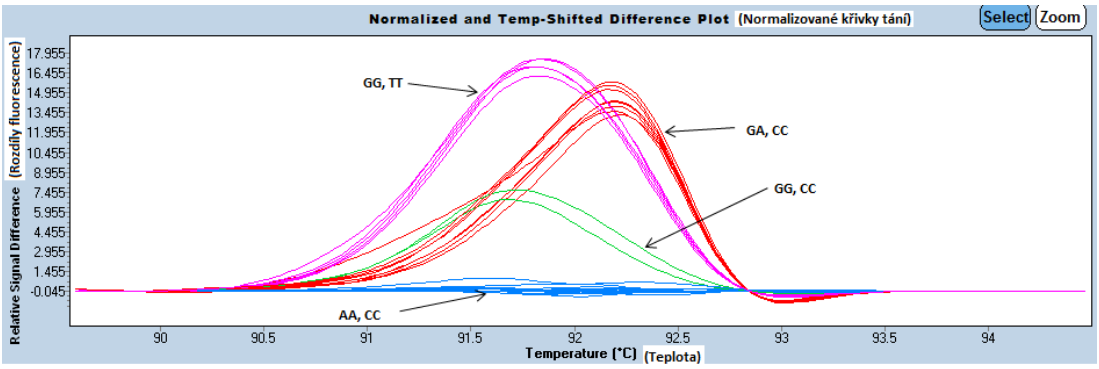
Obrázek 11: Křivky tání, exon 18, gen *INF2*.



Obrázek 12: Derivovaná forma křivek tání, exon 18, gen *INF2*.



Obrázek 13: Normalizované křivky tání na základě úbytku fluorescence, exon 18, gen *INF2*. Barevné rozlišení křivek na příkladu intronové (c.2613-84G→A) a exonové (c.2640T→C, p.Asp880) záměny. V obrázku jsou popsány nalezené kombinace alel (první v pořadí – intronová záměna, druhá v pořadí – exonová záměna).



Obrázek 14: Normalizované křivky tání na základě rozdílů fluorescence, exon 18, gen *INF2*. Barevné rozlišení křevek na příkladu intronové (c.2613-84G→A) a exonové (c.2640T→C, p.Asp880). V obrázku jsou popsány nalezené kombinace alel (první v pořadí – intronová záměna, druhá v pořadí – exonová záměna).

Exon 3 byl nejprve analyzován podle výše uvedeného standardního postupu, avšak kvůli nižší úspěšnosti byl také zaveden modifikovaný protokol, který byl také následně použit pro kompletní analýzu exonu 8b. Tento postup obsahoval samostatnou PCR amplifikaci fragmentů v objemu 10,1 µl (základní reakční směs míchána v laboratoři) s anelačními teplotami 69 ˚C pro exon 3 a 64 ˚C pro exon 8b v přístroji MyCycler verze 1.065 (Bio-Rad Laboratories, USA) s následnou kontrolou produktů pomocí gelové elektroforézy, viz kapitoly 5.2.2 a 5.2.4. Následně bylo smícháno 5 µl PCR produktu s 5 µl MasterMixu 2X. Tento protokol HRM analýzy obsahoval pouze vybrané fáze, ovšem se stejnými podmínkami, standardního postupu, kterými byly aktivace polymerázy, závěrečná elongace, HRM a chlazení, viz Tabulka 15 a Obrázek 10.

5.2.4. Gelová elektroforéza

Kontrolní elektroforéza produktů PCR amplifikace, HRM analýzy nebo restrikční analýzy byla prováděna na 2 % agarózovém gelu po dobu 25 min při konstantním napětí 150 V po PCR nebo HRM a po dobu 40 min a při 130 V po restrikční analýze. Pro vizualizaci amplifikovaných fragmentů z HRM analýzy nebo PCR s Taq polymerázou během elektroforézy byla použita bromfenolová modř smíchaná s produktem amplifikace v poměru 3 µ : 5 µ. V případě PCR reakce s použitím PPP Master Mixu nebo kontroly po restrikci, kdy obě směsi již obsahují barvu, stačilo nanést 4 µ produktu přímo na gel. Součástí gelu bylo vždy interkalační barvivo

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA). Pro odečtení délky fragmentů byl použit 100 bp žebříček (Thermo Scientific, USA). Produkty byly detekovány pomocí UV transluminátoru LKB 2011 Macro Vue (Pharmacia LKB, Švédsko).

5.2.5. Sekvenování

5.2.5.1. Sekvenační reakce

Pro sekvenační reakci byl použit sekvenační kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Tabulky 19 a 20 shrnují poměry složek reakční směsi a podmínky sekvenační reakce. Jako templát byly použity produky z klasické PCR reakce nebo po HRM metodě (standardní i upravený protokol).

Tabulka 19: Poměry složek ve směsi pro sekvenační reakci.

Složka	Objem (µl)	Objem (µl)	Objem (µl)
BigDye Terminator Kit	2	1	0,4
BigDye Terminator Kit Sequencing Buffer	3	3,5	1,8
Voda (PCR, bez nukleáz)	14	14,5	7,3
Primer (c = 10 pmol / µl)	0,4	0,4	0,2
Templát	0,6	0,6	0,3
Celkový objem	**20**	**20**	**10**

Tabulka 20: Podmínky sekvenační reakce.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (˚C)	Čas (min.)
Aktivace polymerázy	1	96	03:00
Amplifikace	25	96	00:20
		50	00:10
		60	04:00
Závěrečná elongace	1	60	01:00
Chlazení	1	4	∞

5.2.5.2. Postsekvenační přečištění

Postsekvenační přečištění bylo prováděno dle následujícího protokolu:

1) K 20 µl produktu přidat 52 µl směsi skládající se z 2 µl NaOAc (3 M) a 50 µl EtOH (96 %), v případě nižšího objemu produktu je potřeba adekvátně snížit množství přidávané směsi

2) Nechat stát 15 min při pokojové teplotě
3) Odstředit při 14500 otáčkách po dobu 30 min
4) Odstříknout do buničité vaty
5) Přidat 60 µl EtOH (70 %) a promíchat
6) Odstředit při 14500 otáčkách po dobu 10 min
7) Odstříknout do buničité vaty
8) Opakovat body 4 a 5
9) Vysušit při 40 ˚C po dobu 10 min
10) Přidat 30 µl formamidu
11) Zdenaturovat při 95 ˚C po dobu 5 min
12) Zamrazit

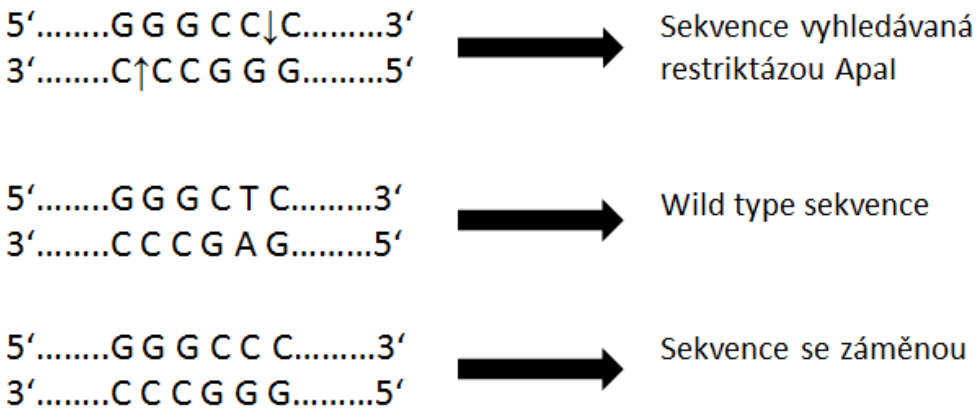
5.2.5.3. Vlastní sekvenace

Produkt sekvenační reakce byl po postsekvenačním přečištění analyzován na přístroji Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA) se zabudovaný softwarem 3130 Series Data Collection Software v3.1 (Applied Biosystems, USA) za následujících podmínek:
Délka kapiláry – 36 cm; Polymer – POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystems, USA); Teplota dělícího pole – 60 °C; Napětí při nástřiku – 1,2 kV; Napětí při analýze – 8,5 kV.

5.2.6. Analýza polymorfizmů délky restrikčních fragmentů

Patogenita nově nalezené záměny p.Leu169Pro (c.506T>C) v genu *ACTN4* byla ověřena pomocí analýzy polymorfizmů délky restrikčních fragmentů (RFLP), též nazývaná restrikční analýza. Nejprve byl exon se záměnou amplifikován pomocí PCR reakce v objemu 15,7 µl a s anelační teplotou primerů 68 ˚C, jejíž základní směs byla míchána v laboratoři, s následnou kontrolou získaných produktů, viz kapitoly 5.2.2. a 5.2.4. Poté byl PCR produkt použit jako templát pro restrikci. Na základě analýzy sekvence úseku se záměnou byla vybrána restrikční endonukleáza ApaI z řady FastDigest (Thermo Scientific, USA), která stříhá sekvenci se záměnou,

viz Obrázek 15. Po restrikci následovala gelová elektroforéza a kontrola výsledků, viz kapitola 5.2.4. Tabulky 21 a 22 popisují složení reakční směsi a průběh reakce. Obrázek 16 detailně zobrazuje výsledek restrikční analýzy.



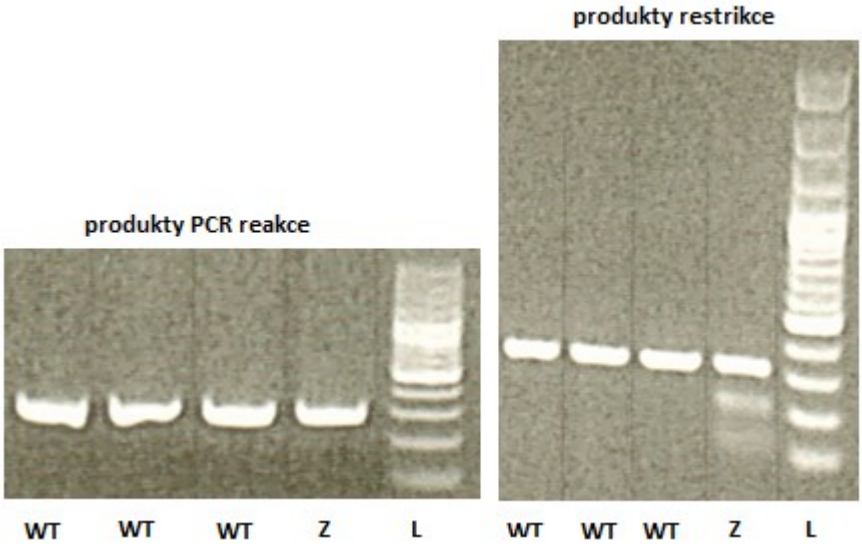
Obrázek 15: Analýza sekvence štěpené restrikční endonukleázou ApaI.

Tabulka 21: Poměry složek ve směsi pro restrikční analýzu.

Složka	**Objem (µl)**
Voda (PCR, bez nukleáz)	22
10X FastDigest Green Buffer	2
Restriktáza ApaI (c = 1 µl na reakci)	1
Templát	5
Celkový objem	**30**

Tabulka 22: Podmínky restrikční reakce.

Fáze	**Počet cyklů**	**Teplota (˚C)**	**Čas (min.)**
Restrikce	1	37	60:00
Inaktivace enzymu	1	65	05:00
Chlazení	1	4	∞



Obrázek 16: Výsledek RFLP zobrazený na agarózovém gelu. Vlevo jsou zobrazeny produkty PCR reakce a vpravo produkty restrikce (zkratky: WT = wild type, Z = záměna, L = žebříček (100bp)).

5.3. Expresní analýza

5.3.1. Reverzní transkripce

Pro přepis vyizolované RNA do cDNA byl použit SuperScript® VILO™ Synthesis Kit (Invitrogen, USA) v celkovém reakčním objemu 40 µl (přepisováno 2x po 20 µl). V Tabulce 23 jsou uvedeny poměry zastoupení jednotlivých složek reakční směsi a Tabulka 24 popisuje podmínky reverzní transkripce. Přepis probíhal v přístroji Mastercycler gradient (Eppendorf, Německo).

Tabulka 23: Poměry složek ve směsi pro reverzní transkripci.

Složka	Objem (µl)
5X VILO™ Reaction Mix	4
10X SuperScript® Enzyme Mix	2
Voda (PCR kvalita, bez nukleáz)	4
Templátová RNA	10
Celkový objem	**20**

Tabulka 24: Podmínky reverzní transkripce.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (˚C)	Čas (min.)
Fáze 1	1	25	10:00
Fáze 2	1	42	120:00
Fáze 3	1	85	05:00
Chlazení	1	4	∞

5.3.2. Real-time PCR

Kvantitativní real-time PCR byla provedena na přístroji ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA). Pro analýzu byly použity karty TaqMan® Array Micro Fluidic Cards (Applied Biosystems, USA), které obsahovaly analyzované geny, a TaqMan®Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, USA). Na kartu bylo naneseno 100 µl každého analyzovaného vzorku. V Tabulce 25 jsou uvedeny analyzované geny, Tabulky 26 a 27 shrnují složení reakční směsi a podmínky real-time PCR.

Tabulka 25: Seznam genů, u kterých byla provedena expresní analýza. Informace o funkcích proteinů byly čerpány z databází NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) a OMIM (https://www.omim.org/).

Gen	Funkce proteinu
ACE	Konverze angiotenzinu I do angiotenzinu II
AGTR1	Receptor pro angiotenzin II, prostředník pro ovlivnění kardiovaskulárního systému angiotenzinem II
AGTR2	Receptor pro angiotenzin II, prostředník při vyvolání buněčné smrti
APOL1	Součást HDL lipoproteinů
CCL5	Chemokin, chemoatraktant pro imunitní buňky
CCR3	Receptor pro různé druhy chemokinů, např. eotaxin
CCR5	Receptor pro různé druhy chemokinů, např. CCL5
CD2AP	Regulace aktinového cytoskeletu
CD80	Membranový receptor exprimonavý antigen prezentujícími buňkami
CXCR3	Chemokinový receptor
IFNG	Cytokin účástnící se např. hematopoeze a proliferace T buněk
IL10	Cytokin účastnící se imunuregulace
IL12A	Podjednotka cytokinu IL12
IL18	Prozánětlivý cytokin produkován např. aktivovanými makrofágy, Kupfferovými buňkami a dendritickými buňkami
IL2RA	Podjednotka receptoru IL2
INF2	Remodelace aktinového cytoskeletu
KIRREL2	Součást slit diaphragm, účastní se buněčné adheze

Gen	Funkce proteinu
MMP14	Degradace extracelulární matrix
NPHS1	Nefrin, důležitá součást slit diaphragm, účastní se buněčné adheze
NPHS2	Podocin, důležitá součást slit diaphragm, účastní se regulace glomerulární permeability
PLA2R1	Receptor pro fosfolipázu A2
PLCE1	Katalyzuje hydrolýzu fostatidylinozitolu-4,5-bifosfát
PODXL	Důležitá součást slit diaphragm, transmembránový protein
SYNPO	Vazba k F-aktinu
TGFB1	Růstový faktor regulující např. růst a diferenciaci buněk
TNFSF12	Cytokin účastnící se např. angiogenezi a buněčné smrti
TRPC6	Transport vápenatých kationtů do buněk
VEGFA	Růstový faktor stimulující buňky endotelu k tvorbě nových cév

Tabulka 26: Poměry složek ve směsi pro real-time PCR.

Složka	Objem (µl)
TaqMan®Universal PCR Master Mix 2X	50
Voda (PCR kvalita, bez nukleáz)	10
Templátová cDNA	40
Celkový objem	**100**

Tabulka 27: Podmínky real-time PCR.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (˚C)	Čas (min.)
Fáze 1	1	50	02:00
Fáze 2	1	94,5	10:00
Fáze 3	40	97	00:30
		59,7	01:00

5.3.3. Vyhodnocení výsledků

Výsledky HRM analýzy byly vyhodnoceny pomocí programu LightCycler® 480 Gene Scanning Software 1.5 (Roche diagnostics, Švýcarsko). Sekvenace byly analyzovány pomocí programů 3130 Series Data Collection Software v3 (Applied Biosystems, USA), Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems, USA) a BioEdit (http://bioedit.software.informer.com/7.1/). Referenční sekvence použité ke kontrole sekvenací popusuje Tabulka 28.

Výsledky z kvantitativní real-time PCR byly vyhodnoceny pomocí programů SDS 2.2.2 (Applied Biosystems, USA) a ExpressionSuite Software v1.0 (Applied Biosystems, USA). Jako reference pro normalizaci získaných dat byl použit gen

GAPDH. Hodnoty relativních expresí u jednotlivých genů byly vypočteny podle vzorce: $2^{-\Delta C(T)}$. Hodnota $\Delta C(T)$ byla vypočtena podle vzorce: $C(T)_{\text{analyzovaný gen}} - C(T)_{\text{referenční gen}}$ [107].

Tabulka 28: Referenční sekvence použité ke kontrole sekvenací.

Gen	Referenční sekvence pro exony	Referenční sekvence pro introny
INF2	NM_022489.3	NG_027684.1
ACTN4	NM_004924.3	NG_007082.2
TRPC6	NM_004621.4	NG_011476.1
NPHS2	NM_014625.1	NG_007535.1

5.4. Statistika

Pro nalezené exonové polymorfizmy byly vypočteny alelové frekvence. Hardy-Weinbergova rovnováha byla testována pomocí Pearsonova X^2 testu.

Pro statistické vyhodnocení výsledků expresní analýzy byly použity popisné statistiky a Mann-Whitney test s hladinou významnosti 5 % a Bonferroniho korekcí. Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu STATISTICA verze 10 a 12 (StatSoft ČR s.r.o., ČR).

5.5. Software a databáze

5.5.1. Software

3130 Series Data Collection Software v3.1 (Applied Biosystems, USA)

BioEdit (http://bioedit.software.informer.com/7.1/)

ExpressionSuite Software v1.0
(https://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/software-downloads/expressionsuite-software.html)

Human Splicing Finder (http://www.umd.be/HSF3/)

LightCycler® 480 Gene Scanning Software 1.5 (Roche diagnostics, Švýcarsko)

MutationTaster (http://www.mutationtaster.org/)

NetGene2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)

PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)

Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)

PROVEAN (http://provean.jcvi.org/index.php)

SDS 2.2.2 (Applied Biosystems, USA)

Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems, USA)

SIFT (http://sift.bii.a-star.edu.sg/)

STATISTICA verze 10 a 12 (StatSoft ČR s.r.o., ČR)

Webcutter 2.0 (http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/)

5.5.2. Databáze

Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html)

ExAC Browser (http://exac.broadinstitute.org/)

gnomAD Browser (http://gnomad.broadinstitute.org/)

HGMD (https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php)

NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

OMIM (https://www.omim.org/)

Pathway Commons (http://www.pathwaycommons.org/about/)

REBASE (http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html)

6. VÝSLEDKY

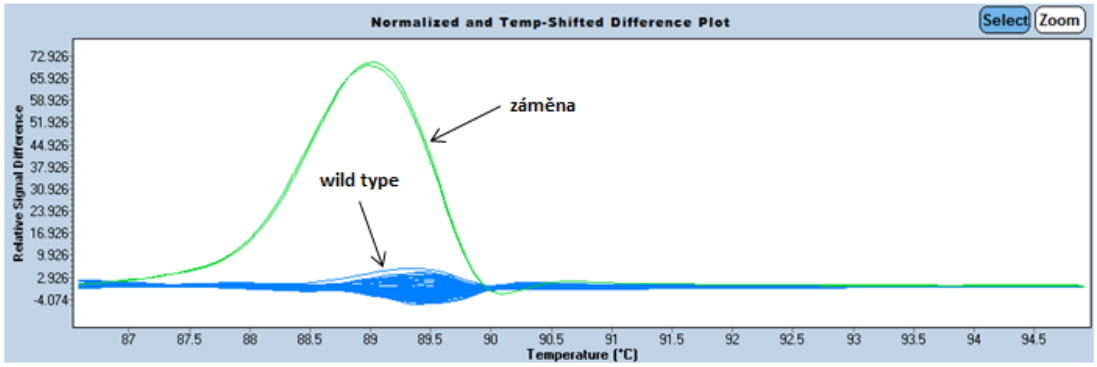
6.1. Mutační analýza genu *ACTN4*

V rámci diplomové práci byla provedena mutační analýza genu *ACTN4* u 48 pacientů s FSGS/MCD. V dizertační práci bylo na tuto studii navázáno a vybrané exony 18 a 19 genu *ACTN4* byly analyzovány u pacientů s IgAN (155 pacientů) a MGN (56 pacientů). Zároveň byl tento gen analyzován i u 3 vybraných pacientů (č. 133, 134 a 138) ze souboru pro mutační analýzu genu *INF2*, viz následující kapitoly.

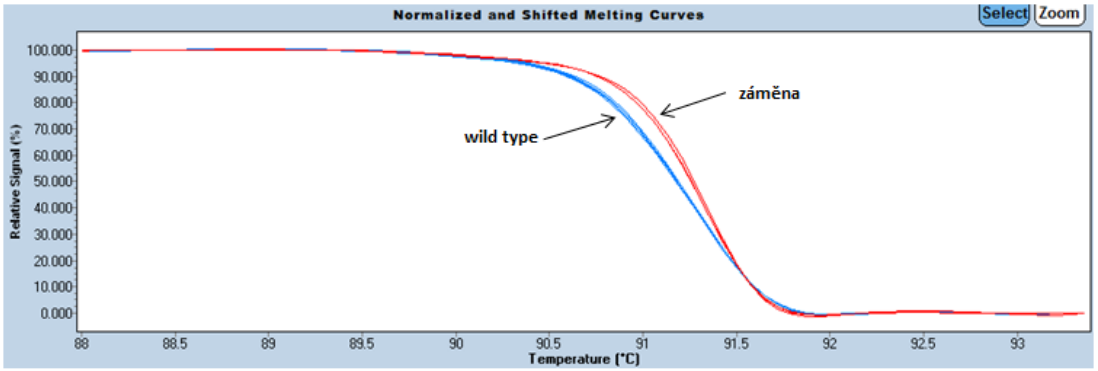
6.1.1. Záměna p.Asn748Asp

Kandidátní kauzální záměna p.Asn748Asp (c.2242A>G) nacházející se v exonu 18 (referenční sekvence NM_004924.3) byla představena již v diplomové práci. Substituce byla identifikována v té době u 59leté ženy s FSGS a s pozitivní rodinnou anamnézou, které byl nefrotický syndrom diagnostikován v 54 letech. Kauzalita nově nalezené substituce byla ověřena na souboru 48 zdravých dobrovolníků a konzervovanost oblasti byla zkoumána u různých živočišných druhů.

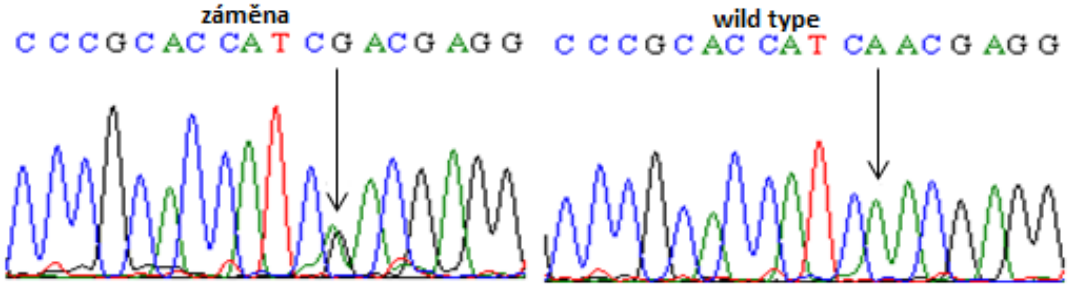
V rámci dizertační práce byla provedena mutační analýza exonu 18 na souborech pacientů s IgAN a MGN, avšak záměna p.Asn748Asp (c.2242A>G) nebyla nalezena u žádného pacienta z těchto skupin. Zároveň byl rozšířen soubor zdravých kontrol, takže kauzalita nové substituce byla ověřena celkem na 200 dobrovolnících, viz Obrázek 17. Rovněž se podařilo dohledat dceru probandky, u které byla také diagnostikována FSGS. Tato žena je v současné době již po renální transplantaci. Následná mutační analýza exonu 18 prokázala přítomnost stejné záměny p.Asn748Asp (c.2242A>G) i u dcery probandky, viz Obrázky 18 a 19. Kauzalitu této záměny podpořilo i vysoké skóre programů PolyPhen-2 (0,983) a Mutation Taster („disease causing“).



Obrázek 17: Normalizované křivky tání na základě rozdílů fluorescence, exon 18, gen *ACTN4*. Zelené křivky (záměna) zobrazují probandku se záměnou c.2242A>G (p.Asn748Asp), modré křivky zobrazájí normály s wild type sekvencí.



Obrázek 18: Normalizované křivky tání na základě úbytku fluorescence, exon 18, gen *ACTN4*. Červené křivky (záměna) zobrazují probandku se záměnou c.2242A>G (p.Asn748Asp) a její dceru se stejnou substitucí, modré křivky zobrazují normály s wild type sekvencí.



Obrázek 19: Porovnání DNA sekvence probandky se záměnou c.2242A>G (p.Asn748Asp) a wild type sekvence.

6.1.2. Exon 19

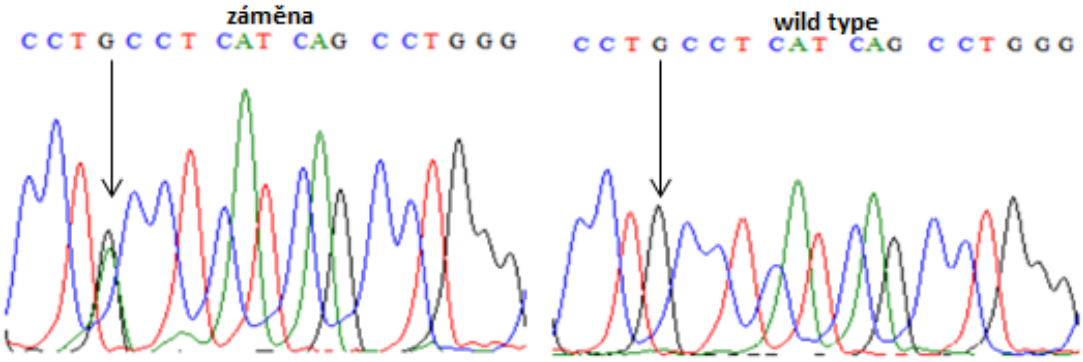
V exonu 19 byl ve studovaných souborech pacientů a zdravých kontrol identifikován vysoký počet záměn, z čehož lze usuzovat, že se jedná o velmi variabilní oblast genu *ACTN4*. Všechny nalezené záměny, včetně výsledků pacientů s FSGS/MCD, které byly popsány již v diplomové práci, přehledně zobrazuje Tabulka 29.

Tabulka 29: Souhrn záměn nalezených v exonu 19 a přilehlých oblastech genu *ACTN4* u pacientů s FSGS/MCD (48 pacientů), IgAN (155 pacientů) a MGN (56 pacientů) a 200 zdravých kontrolách. Pro gen *ACTN4* byly použity referenční sekvence NG_007082.2 a NM_004924.3 (pomocí této zapsáno v tabulce). NT = nukleotid, AK = aminokyselina.

Záměna NT	Záměna AK	FSGS/ MCD	IgAN	MGN	Kontroly
c.2351C>T	p.Ala784Val	0	2	0	0
c.2352G>A	p.Ala784Ala	1	13	9	16
c.2353C>T	p.Leu785Leu	0	12	1	10
c.2355G>A	p.Leu785Leu	0	9	2	3
c.2356G>A	p.Gly786Arg	0	15	5	13
c.2358G>A	p.Gly786Gly	0	4	1	3
c.2359C>T	p.Pro787Ser	0	8	1	13
c.2360C>T	p.Pro787Leu	3	41	6	29
c.2361C>T	p.Pro787Pro	1	18	2	6
c.2378G>A	p.Cys793Tyr	0	1	0	0
c.2393G>A	p.Gly798Asp	0	1	0	0
c.2401G>A	p.Val801Met	0	1	1	0
c.2418+8A>G		0	1	0	0
c.2418+13G>A		0	0	1	1
c.2418+14G>A		0	0	0	3
c.2418+15G>A		0	0	0	1
c.2418+16C>T		0	2	0	7
c.2418+17C>T		0	2	0	9

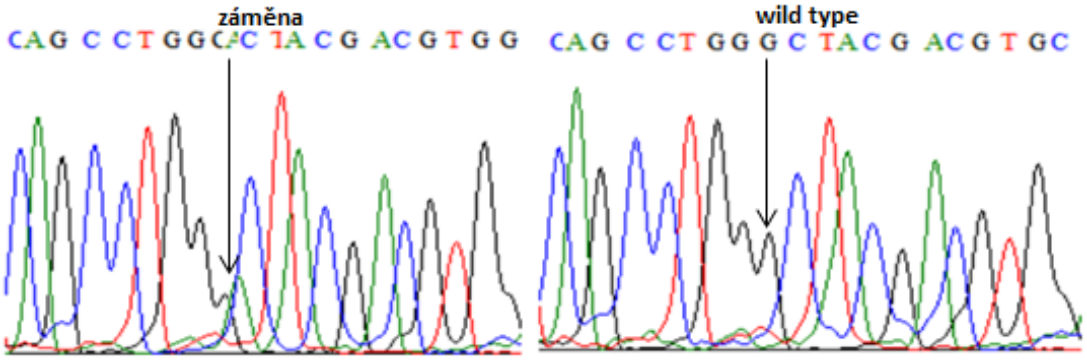
Dosud nepopsaná záměna p.Cys793Tyr (c.2378G>A), viz Obrázek 20, byla nalezena u v té době 35leté ženy trpící od dětství IgA nefropatií. Probandka měla negativní rodinnou anamnézu a nereagovala na léčbu imunosupresivy. Hodnota proteinurie a kreatininu u ní dosahovala 2,8 g / 24 hod., respektive 150. Predikční program PolyPhen-2 přiřadil této záměně skóre 0,961 a program Mutation Taster ji označil za „disease causing“, zároveň nebyla nalezena u žádné z 200 analyzovaných zdravých

kontrol. Následně bylo ověřeno, že se jedná o konzervovanou aminokyselinu u všech porovnávaných živočišných druhů, viz Obrázek 22.

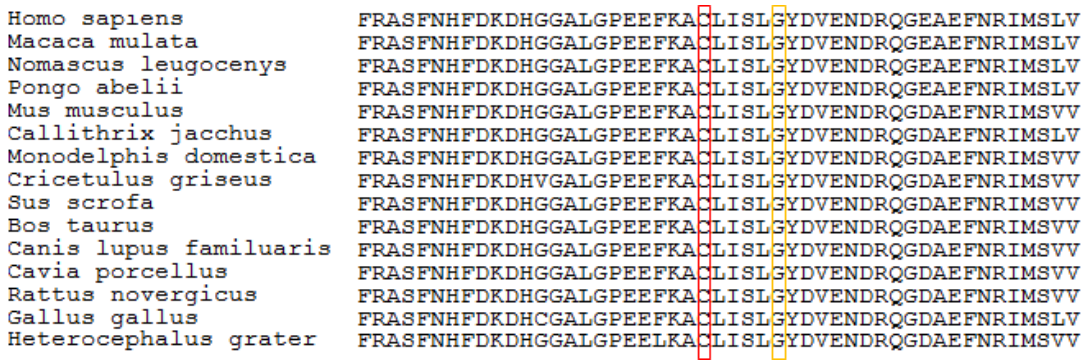


Obrázek 20: Porovnání DNA sekvence probandky se záměnou c.2378G>A (p.Cys793Tyr) a wild type sekvence.

Další dosud nepopsaná záměna p.Gly798Asp (c.2393G>A), viz Obrázek 21, byla identifikována u v té době 59leté ženy s negativní rodinnou anamnézou trpící IgA nefropatií. Protenurie u probandky dosahovala hodnoty 5 g / 24 hod. Substituce nebyla identifikována u žádné z 200 zdravých kontrol. Predikční program Mutation Taster ji označil za „disease causing“ a program PolyPhen-2 jí přiřadil skóre 0,998. Zároveň byla prokázána konzervovanost substituované aminokyseliny u porovnávaných živočišných druhů, viz Obrázek 22.



Obrázek 21: Porovnání DNA sekvence probandky se záměnou c.2393G>A (p.Gly798Asp) a wild type sekvence.

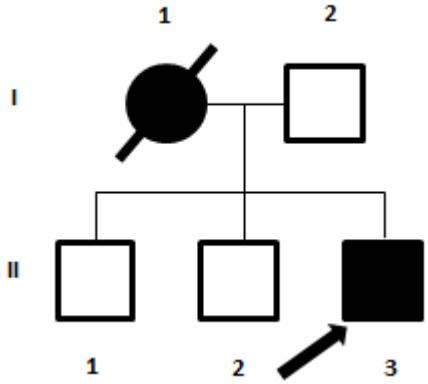


Obrázek 22: Porovnání části sekvence exonu 19 mezi různými živočišnými druhy. V červeném rámečku je vyznačena aminokyselina Cystein v pozici 793 a ve žlutém rámečku je vyznačena aminokyselina Glycin v pozici 798.

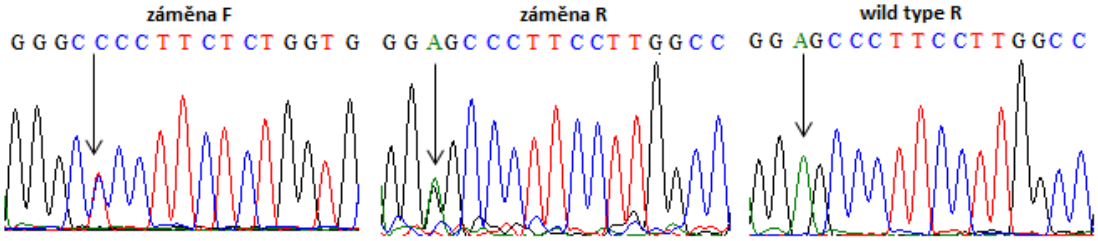
6.1.3. Záměna Leu169Pro

Dosud nepopsaná záměna Leu169Pro (506T>C) nacházející se v exonu 5 genu *ACTN4* (referenční sekvence NM_004924.3) byla nalezena v té době u 32letého muže zařazeného do speciálního souboru pacientů pro analýzu genu *INF2* (č. 138), který měl pozitivní rodinnou anamnézu (matka). Proband narozený v Itálii dospěl ve svých 29 letech k nejasnému selhání ledvin (symptomy byly vysoký tlak, otoky, nevolnost, brnění končetin) a začal docházet na dialýzu. V současnosti je již po transplantaci ledvin. Adoptovaná matka probanda zemřela v 66 letech, od 38 let trpěla chronickým selháním ledvin a byla dialyzována, následně podstoupila transplantaci ledvin. Z histologických nálezů matky probanda (zaslány z Itálie) plyne, že se u ní jednalo o fokální segmentální glomerulonefritidu ve sklerotizující fázi, stav velmi podobný fokální glomeruloskleróze. Otec probanda a jeho 2 bratři jsou zdraví a záměna u nich nebyla nalezena. Podrobně na Obrázcích 23 až 25.

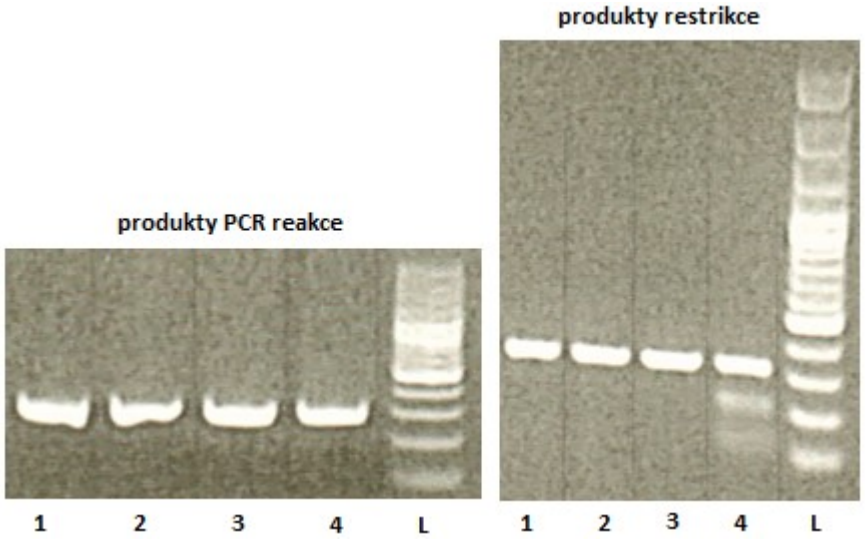
Substituce Leu169Pro (506T>C) se nachází v doméně vázající aktinová vlákna. Dle predikčních programů má tato záměna vysokou pravděpodobnost kauzality. Predikční program PolyPhen-2 jí přiřadil skóre 0,985 a program Mutation Taster ji označil za „disease causing“. Výskyt záměny byl rovněž ověřen na souboru 160 zdravých kontrol (80 mužů, 80 žen, celkem 320 chromozomů), avšak u žádného z nich nebyla nalezena, viz Obrázek 26. Zároveň bylo prokázáno, že se jedná o konzervovanou aminokyselinu napříč živočišnou říší.



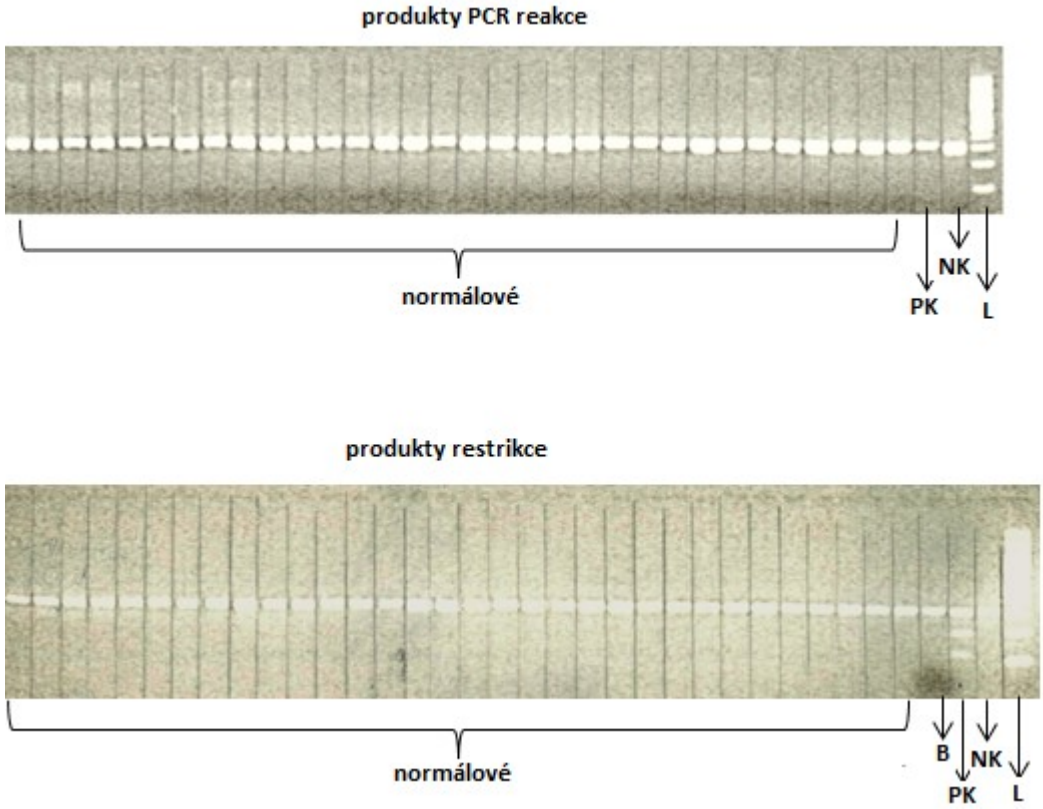
Obrázek 23: Genealogické schéma rodiny probanda II/3, u kterého byla identifikována substituce Leu169Pro (506T>C).



Obrázek 24: Porovnání DNA sekvence probanda se záměnou 506T>C (p.Leu169Pro) a wild type sekvence. F = přímá sekvence, R = zpětná sekvence



Obrázek 25: Analýza RFLP zobrazená na agarózovém gelu v rodině probanda se záměnou Leu169Pro (506T>C). Vlevo jsou zobrazeny produkty PCR reakce a vpravo produkty restrikce (čísla: 1 = otec probanda, wild type; 2 a 3 = bratři probanda, wild type; 4 = proband, záměna; zkratka: L = žebříček, 100bp).



Obrázek 26: Analýza RFLP zobrazená na agarózovém gelu záměny Leu169Pro (506T>C) s normály. Horní obrázek zobrazuje produkty PCR reakce a dolní produkty restrikce (zkratky: B = kontrolní PCR produkt bez restrikce; L = žebříček, 100bp; NK = negativní kontrola, wild type; PK = pozitivní kontrola, záměna).

U probanda č. 138 a jeho zdravých příbuzných byl také nalezen polymorfizmus Asn182, který pravděpodobně nemá vliv na fenotyp pacienta. Stejný polymorfizmus v genu *ACTN4* byl také nalezen u pacientů č. 133 a 134 zařazených rovněž do souboru pro analýzu genu *INF2*.

6.2. Mutační analýza genu *INF2*

6.2.1. Záměny nalezené v exonech

U vyšetřovaných pacientů s FSGS a MCD byly nalezeny 2 již známé kauzální substituce. Jednalo se o p.Arg214His a p.Arg218Gln, viz následující kapitoly. Zároveň byly nalezeny další známé i neznámé záměny měnící aminokyselinu, které však pravděpodobně nemají vliv na fenotyp svých nositelů. Rovněž byly nalezeny

polymorfizmy neměnící aminokyselinu. Všechny substituce nalezené v exonech genu *INF2* souhrnně zobrazuje Tabulka 30.

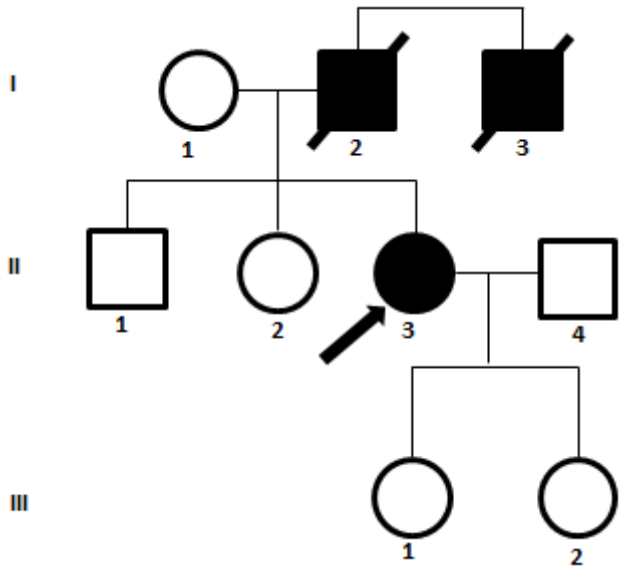
Tabulka 30: Souhrn záměn nalezených v exonech genu *INF2* na základě porovnání s referenční sekvencí NM_022489.3. Tučně jsou zobrazeny kauzální mutace, kurzíva zobrazuje nové substituce. NT = nukleotid, AK = aminokyselina.

Exon	Záměna NT	Záměna AK	Frekvence alely v % (n = 115)
2	c.42 G>A	p.Leu14	0,9
2	c.105 C>T	p.Pro35	97,4
4	c.579 C>T	p.Tyr193	0,4
4	**c.641 G>A**	**p.Arg214His**	**0,4**
4	**c.653 G>A**	**p.Arg218Gln**	**0,9**
7	c.879G>A	p.Ser293	0,9
7	c.885G>A	p.Leu295	0,4
8	*c.1472C>T*	*p.Pro491Leu*	*0,4*
8	c.1499C>T	p.Pro500Leu	0,4
8	c.1582C>T	p.Pro528Ser	0,9
18	c.2640T>C	p.Asp880	60,0
21	c.3066T>C	p.Asp1022	68,3
21	c.3108T>C	p.Leu1036	0,4
21	*c.3163C>T*	*p.Pro1055Ser*	*0,4*
21	*c.3169C>T*	*p.Pro1057Ser*	*2,2*
21	*c.3170C>T*	*p.Pro1057Leu*	*1,3*
21	*c.3177C>T*	*p.Pro1059*	*0,9*
21	*c.3179C>T*	*p.Thr1060Ile*	*3,5*
21	*c.3180C>T*	*p.Thr1060*	*1,7*
21	*c.3181C>A*	*p.Leu1061Met*	*0,9*
21	*c.3181C>T*	*p.Leu1061*	*1,3*
21	c.3207A>C	p.Pro1069	40,4
21	c.3207A>G	p.Pro1069	40,9
21	c.3286C>T	p.Pro1096Ser	7,8

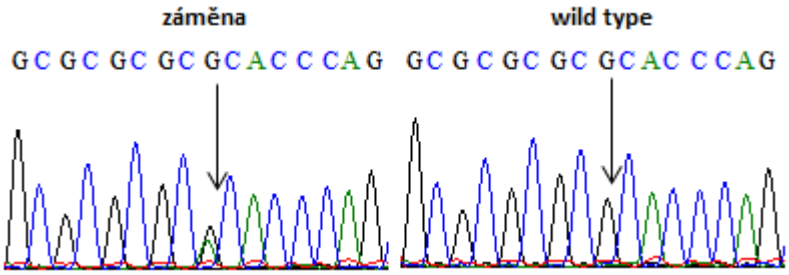
6.2.1.1. Záměna p.Arg214His

Známá kauzální záměna p.Arg214His (641G>A) [98] nacházející se v exonu 4 (referenční sekvence NM_022489.3) byla nalezena v té době u 51leté ženy s FSGS, která měla pozitivní rodinnou anamnézu (otec a strýc). Její dvě dcery jsou zdravé, viz Obrázky 27 a 28. U probandky byla prokázána přítomnost bílkoviny v moči již

v dětství. Ačkoliv pacientka trpí zároveň diabetem mellitem druhého typu, hypertenzí a obezitou, má pouze mírnou chronickou renální insuficienci (stupeň 2) a malou proteinurii (1-3 g / 24 hod.).



Obrázek 27: Genealogické schéma rodiny probandky II/3, u které byla identifikována substituce 641G>A (p.Arg214His).

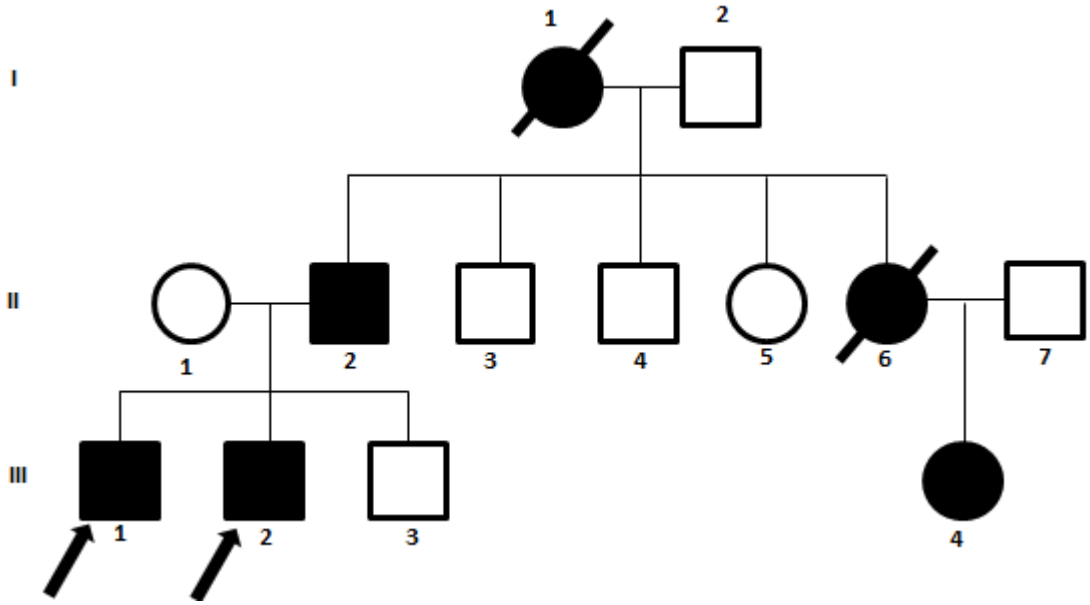


Obrázek 28: Porovnání DNA sekvence probandky se záměnou 641G>A (p.Arg214His) a wild type sekvence.

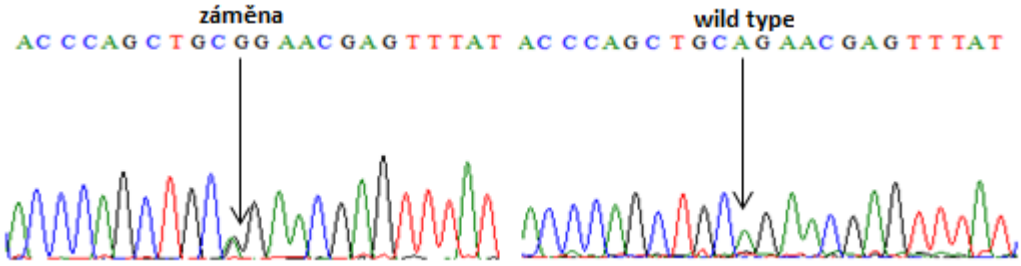
6.2.1.2. Záměna p.Arg218Gln

Popsaná kauzální substituce p.Arg218Gln (653G>A) [98], která se nalézá rovněž v exonu 4 (referenční sekvence NM_022489.3) byla identifikována u dvou bratrů v té době 32letý, respektive 31letý. Probandi měli pozitivní rodinnou anamnézu pro renální onemocnění (otec, babička, teta a sestřenice). Otec probandů dosáhl ESRD v 57 letech (v podobném věku dosáhly ESRD i babička a teta probandů), zatímco

probandi již v 27 letech, respektive v 31 letech. Následně byli vyšetřeni mladší bratr probandů, jejich rodiče a sestřenice. Záměna p.Arg218Gln (653G>A) byla nalezena u všech vyšetřovaných nemocných příbuzných (otec a sestřenice), avšak zdraví příbuzní (matka a bratr) měli sekvenci exonu 4 bez záměny, viz Obrázky 29 a 30.



Obrázek 29: Genealogické schéma rodiny probandů III/1 a III/2, u kterých byla identifikována substituce p.Arg218Gln (653G>A). Stejná substituce byla nalezena i u otce II/2 a sestřenice III/4 probandů.



Obrázek 30: Porovnání DNA sekvence jednoho z probandů se záměnou 653G>A (p.Arg218Gln) a wild type sekvence.

6.2.2. Záměny nalezené v intronech

U záměn nalezených v intronových oblastech není pravděpodobné, že by nějakým způsobem ovlivňovaly závažnost nebo průběh onemocnění pacientů, u kterých byly identifikovány. Přehledně v Tabulce 31.

Tabulka 31: Přehled nalezených intronových substitucí v genu *INF2* na základě porovnání s referenční sekvencí NG_027684.1. Zapsány pomocí sekvence NM_022489.3. IVS = intron.

Číslo intronu	Substituce
IVS 2	c.391+17G>A
IVS 3	c.507+6C>T
IVS 3	c.508-23C>T/A
IVS 3	c.508-22C>T
IVS 3	c.508-21C>T
IVS 3	c.508-16C>T
IVS 3	c.508-15C>T
IVS 3	c.508-14C>T
IVS 3	c.508-12C>T
IVS 3	c.508-11C>T
IVS 3	c.508-10C>T
IVS 3	c.508-7C>T
IVS 3	c.508-6C>T
IVS 4	c.668-78T>G
IVS 4	c.668-32C>T
IVS 4	c.668-31G>A
IVS 5	c.702-57G>A
IVS6	c.843+16C>T
IVS 6	c.843+33C>T
IVS 8	c.1735+73G>A
IVS 8	c.1736-51G>A
IVS 9	c.1887+5G>A
IVS 9	c.1887+10G>A
IVS 9	c.1888-80G>A
IVS 10	c.1949+16A>G
IVS 10	c.1950-10C>T
IVS 11	c.2052+15C>T
IVS 11	c.2052+16C>T
IVS 11	c.2052+22C>T
IVS 11	c.2052+23C>T
IVS 11	c.2052+27C>T
IVS 11	c.2052+28C>T
IVS 11	c.2133-55G>A
IVS 11	c.2133-53G>A
IVS 11	c.2133-51G>A
IVS 11	c.2133-50G>A
IVS 11	c.2133-47G>A
IVS 11	c.2133-46G>A

Číslo intronu	Substituce
IVS 11	c.2133-45G>A
IVS 13	c.2239+53G>A
IVS 13	c.2239+57G>A
IVS 13	c.2239+67C>T
IVS 13	c.2239+69C>T
IVS 13	c.2239+94A>G
IVS 14	c.2310+8delA
IVS 16	c.2489+21C>T
IVS 16	c.2489+53T>C
IVS 16	c.2489+62G>C
IVS 16	c.2489+115G>A
IVS 16	c.2489+117C>T
IVS 16	c.2490-20C>T
IVS 17	c.2613-84G>A
IVS 18	c.2776-81C>G
IVS 19	c.2878+22G>T
IVS 22	c.3750+31delC

6.3. Mutační analýza genů *NPHS2* a *TRPC6*

Mutační analýza genů *NPHS2* a *TRPC6* byla indikována u 3 pacientů (č. 133, 134 a 138) zároveň zařazených do souboru pro analýzu genu *INF2*. U probandů bylo v těchto genech nalezeno několik exonových a intronových polymorfizmů, které samostatně pravděpodobně neovlivňují fenotyp vyšetřovaných osob, viz Tabulka 32.

Tabulka 32: Přehled polymorfizmů nalezených v genech *NPHS2* a *TRPC6* u pacientů č. 133, 134 a 138 ze souboru pro analýzu genu *INF2*. Pro gen *NPHS2* byly použity referenční sekvence NG_007535.1 a NM_014625.1 (pomocí této zapsáno v tabulce) Pro gen *TRPC6* byly použity referenční sekvence NG_011476.1 a NM_004621.4 (pomocí této zapsáno v tabulce). IVS = intron.

NPHS2	***TRPC6***
Ala316	IVS 1: 171-20A>G
	IVS 2: 945+129C>T
	Ala404Val
	Asp561
	IVS 10: 2485-138C>T
	IVS 12: 2644del. -22 až -24
	Gln904

6.4. Expresní analýza

Výsledky studie neprokázaly žádné statisticky významné rozdíly v úrovni expresí analyzovaných genů mezi soubory pacientů s FSGS a MCD. V obou skupinách pacientů byla zjištěna vysoká variabilita hodnot. Detailně v Tabulce 33 a Obrázku 31. Zároveň se nepotvrdila použitelnost poměru genů *NPHS2* a *SYNPO* pro rozlišení diagnóz FSGS a MCD. Poměr expresí těchto genů vykazoval v obou souborech opět vysokou variabilitu. Podrobněji v Tabulce 34 a Obrázku 32.

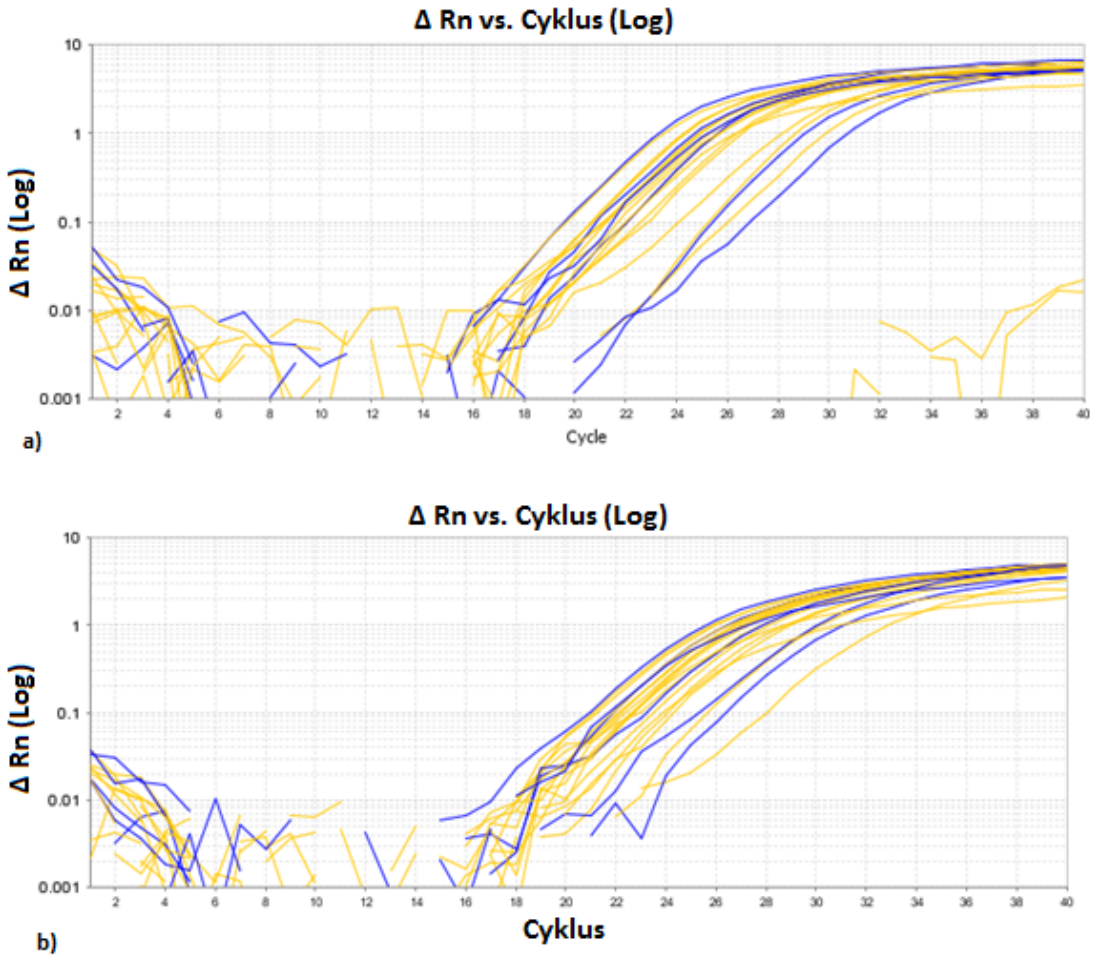
Tabulka 33: Výsledky statistické analýzy studovaných genů mezi skupinami pacientů s FSGS a MCD. Hodnoty byly zaokrouhleny. Max. = maximum, Med. = medián, Min. = minimum

Gen	P hodnota (FSGS vs. MCD)	Exprese u pacientů s FSGS			Exprese u pacientů s MCD		
		Med.	Min.	Max.	Med.	Min.	Max.
ACE	0,45	37,73	2,42	518,82	40,05	26,15	239,94
AGTR1	0,85	1,78	0,05	9,63	2,36	0,87	4,88
AGTR2	0,11	0,75	0	6,10	2,31	0,31	2,24
APOL1	0,90	27,36	10,85	111,19	34,70	10,48	390,12
CCL5	0,95	9,43	1,86	20,00	10,27	1,14	183,39
CCR3	0,95	0,64	0,04	10,18	0,43	0,12	8,88
CCR5	0,75	5,07	1,18	23,37	3,70	0,75	28,07
CD2AP	0,31	367,80	161,99	1629.02	455,65	274,14	813,94
CD80	0,95	0,24	0,08	0,84	0,33	0,07	1,73
CXCR3	1,00	0,50	0,09	1,64	0,30	0,10	1,86
IFNG	0,25	0,17	0	0,53	0,03	0	0,96
IL10	0,70	0,27	0,04	1,11	0,46	0,10	3,08
IL12A	0,35	0,41	0,22	1,85	0,33	0,14	2,41
IL18	0,43	9,60	0,88	22,32	12,54	0,28	23,10
IL2RA	0,95	0,78	0,21	6,38	1,42	0,23	15,55
INF2	0,75	0,07	0,02	0,20	0,08	0,02	0,37
KIRREL2	0,37	1,07	0,13	3,60	1,14	0,36	10,81
MMP14	1,00	49,14	12,24	269,99	40,27	10,54	500
NPHS1	0,25	53,47	0,52	647,97	77,86	19,38	587,64
NPHS2	0,23	28,66	0	163,39	53,73	6,97	249,77
PLA2R1	0,31	32,60	4,89	274,35	35,95	14,28	40,34
PLCE1	0,31	12,31	3,59	63,60	14,05	3,30	105,77
PODXL	0,41	239,48	16,40	2138,20	290,78	106,95	2283,11
SYNPO	0,23	30,27	5,87	274,92	45,09	10,45	341,04
TGFB1	1,00	14,00	5,16	47,15	17,06	5,92	167,01
TNFSF12	0,44	1,38	0,66	6,51	1,25	0,64	29,26

Gen	P hodnota (FSGS vs. MCD)	Exprese u pacientů s FSGS			Exprese u pacientů s MCD		
		Med.	Min.	Max.	Med.	Min.	Max.
TRPC6	0,51	1,38	0,57	4,20	0,89	0,54	10,11
VEGFA	0,41	173,50	29,02	1521,49	197,92	120,57	1783,86

Tabulka 34: Výsledky statistické analýzy poměru expresí genů *NPHS2/SYNPO* mezi skupinami pacientů s FSGS a MCD. Hodnoty byly zaokrouhleny. Max. = maximum, Med. = medián, Min. = minimum

Poměr	P hodnota (FSGS vs. MCD)	Exprese u pacientů s FSGS			Exprese u pacientů s MCD		
		Med.	Min.	Max.	Med.	Min.	Max.
NPHS2/SYNPO	0,57	0,82	0	1,68	0,94	0,15	1,23

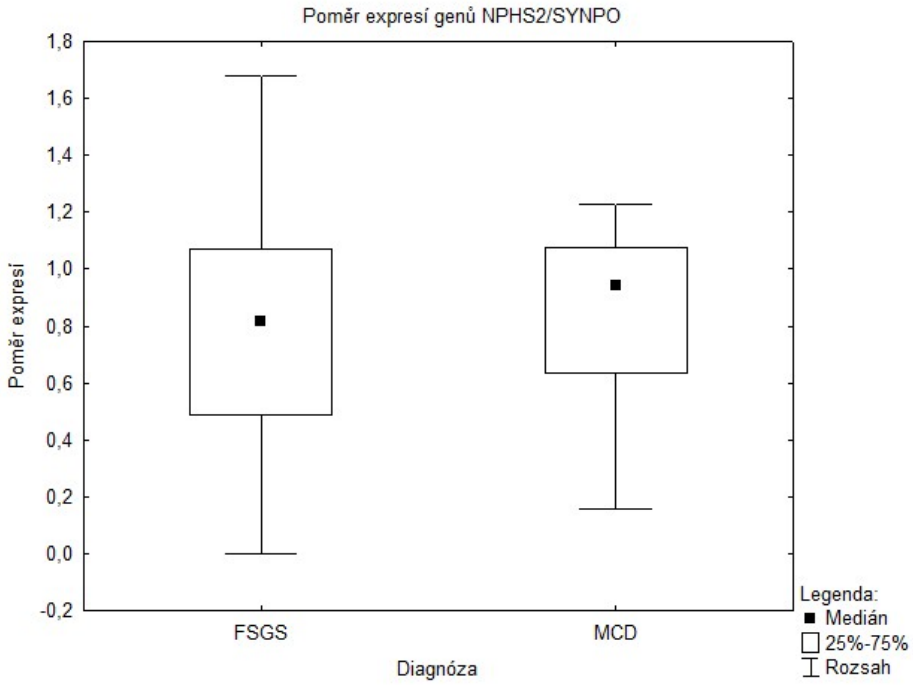


Obrázek 31: Příklad variability expresí.

a) Amplifikační křivky genu *NPHS2*.

b) Amplifikační křivky genu *SYNPO*.

Žlutá = pacienti s FSGS, modrá pacienti s MCD.



Obrázek 32: Grafické vyjádření hodnot poměru expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* u pacientů s FSGS a MCD.

7. DISKUZE

Častými příčinami nefrotického syndromu jsou FSGS a MCD. Zatímco se MCD podílí na vývoji NS převážně u dětí a mladistvých, u většiny dospělých pacientů je NS způsoben FSGS. S geneticky podmíněnou formou FSGS jsou spojovány různé geny, mezi které patří i *ACTN4* a *INF2*. Tato dizertační práce navázala na diplomovou práci autorky, která se podrobně věnovala genu *ACTN4* u pacientů s FSGS a MCD. V rámci doplňkové analýzy genu *ACTN4* byla dovyšetřena dcera probandky se záměnou p.Asn748Asp, která byla představena již v diplomové práci autorky jako nová kandidátní kauzální mutace. Dcera rovněž trpěla FSGS a v současné době je již po renální transplantaci. U dcery byla nalezena stejná záměna jako u matky, což podporuje vysokou pravděpodobnost kauzality této mutace.

U pacientů s IgAN a MGN se analýza genu *ACTN4* zaměřila hlavně na exon 19. Dle množství nalezených záměn u všech zkoumaných diagnóz lze usuzovat, že se jedná o velmi variabilní oblast genu. V této oblasti byly nalezeny i dvě nové záměny Cys793Tyr a Gly798Asp. Obě substituce byly prokázány u pacientek s IgAN, přičemž obě ženy měly negativní rodinnou anamnézu. Žádná ze záměn nebyla nalezena u zdravých kontrol a predikční programy Mutation Taster a PolyPhen-2 jim přisuzují vysokou pravděpodobnost kauzality. Pokud by se v budoucnu potvrdila kauzalita těchto substitucí, znamenalo by to, že mutace v genu *ACTN4* mohou být příčinou nejenom FSGS, ale ovlivňovat i průběh IgAN.

Posledním zajímavým nálezem v genu *ACTN4* byla identifikace nové záměny Leu169Pro. Nositelem substituce byl mladý muž (ze speciální skupiny pacientů) s nejasným selháním ledvin, který je v současnosti již po renální transplantaci. Dle predikčních programů Mutation Taster a PolyPhen-2 se jedná s vysokou pravděpodobností o kauzální mutaci, což podporuje i fakt, že tato substituce nebyla nalezena u žádného zdravého příbuzného probanda (otec a bratři) a zároveň u žádné analyzované zdravé kontroly. Vysokou pravděpodobnost kauzality podporuje i lokalizace záměny. Nachází se v doméně vázající aktinová vlákna, přičemž se jedná o konzervovanou aminokyselinu napříč živočišnou říší.

V rámci této dizertační práce byla zavedena mutační analýza genu *INF2* a následně byl tento gen vyšetřen u 109 pacientů s FSGS nebo MCD a ve speciální skupině 6 pacientů, která zahrnovala osoby s pozitivní rodinnou anamnézou pro ESRD v kombinaci s pokročilou CKD nebo již vyvinutým ESRD v době diagnózy. V rámci

analýzy genu *INF2* byly nalezeny 2 již dříve popsané kauzální mutace p.Arg214His a p.Arg218His [98]. První mutace byla identifikována u 51leté ženy s FSGS, která měla pozitivní rodinnou anamnézu (otec, strýc). Ačkoliv pacientka trpí i diabetem mellitem, hypertenzí a obezitou, měla pouze mírnou renální insuficienci s nízkou proteinurií. Dvě dcery probandky jsou zatím zdravé, avšak možnost genetického vyšetření odmítly. Druhá mutace byla nalezena v rodině, jejíž dva členové byli zařazeni do speciální skupiny pacientů. Oba bratři dospěli k ESRD ve velmi mladém věku 27, respektive 31 let. Stejná mutace byla identifikována i u ostatních členů rodiny s onemocněním ledvin, jejichž vzorky DNA byly k dispozici. Současně nález kauzální mutace v této rodině podporuje i domněnku, že gen *INF2* může být příčinou dalších onemocnění ledvin, včetně jejich selhání z nejasných příčin [108].

Nejčastěji nalézaná substituce byla p.Pro35Pro s alelovou frekvencí přes 97 %, což koresponduje s výskytem uváděným v databázích ExAC Browser a gnomAD Browser. Zároveň byly v genu *INF2* nalezeny další exonové i intronové záměny, u kterých však není pravděpodobný podíl na fenotypu zahrnutých pacientů.

Tato analýza zabývající se genem *INF2* u pacientů s FSGS nebo MCD byla první svého druhu v České republice, a proto je pro srovnání nutné uvést zahraniční studie. Takovým příkladem mohou být práce skupin Brown a kol. a Boyer a kol., které provedly analýzy u pacientů s FSGS a prokázaly, že mutace v genu *INF2* mohou zapříčinit vznik FSGS [98,104]. Ačkoliv bylo již dříve prokázáno, že mutace v genu *INF2* se vyskytují spíše u familiární FSGS než u sporadické formy [98,104,109,110], do analýzy prezentované v rámci této práce byli zařazeni pacienti s oběma formami onemocnění.

Ze speciální skupiny pacientů byly rovněž vybrány 3 osoby, které podstoupily kompletní mutační analýzu genů *NPHS2* a *TRPC6.* Všichni testovaní pacienti byli nositelé polymorfizmu Ala404Val v genu *TRPC6*. Dle dostupné literatury by tato záměna mohla mít vliv na průběh onemocnění, pokud se nachází v kombinaci s kauzální mutací v některém z genů spojeného s nefropatiemi [111]. Tuto domněnku potvrzuje i fakt, že všichni pacienti byli nositelé takovéto kombinace (již dříve popsaná kauzální mutace nebo kandidátní kauzální mutace) a dosáhli ESRD ve velmi mladém věku.

Expresní analýza neprokázala žádné statisticky významné rozdíly v expresích studovaných genů mezi pacienty s primární FSGS a MCD. Získané hodnoty byly v obou skupinách pacientů velmi variabilní stejně jako poměr expresí genů

NPHS2/SYNPO. Z tohoto vyplývá, že poměr těchto genů nelze použít pro rozlišení pacientů s FSGS a MCD a není to tedy vhodný marker pro rozlišení těchto dvou diagnóz, jak se domnívá Schmid a kol. [112]. Vysokou variabilitu hodnot expresí prezentovaných v této práci však mohl způsobit fakt, že do skupiny FSGS byli zařazeni pacienti s různými histologickými nálezy v rámci Kolumbijské klasifikace [30]. Další skutečností, která mohla zkreslit výsledky, je, že obě skupiny obsahovaly nevyvážený počet pacientů. Do budoucna by tedy bylo vhodné pokusit se získat další vzorky MCD a primárních FSGS, ty roztřídit dle Kolumbijské klasifikace a provést doplňující expresní analýzu. Problematice rozlišení pacientů s FSGS a MCD byla již dříve věnována pozornost. Studie Hodgina a kol. zahrnovala velké množství genů, které se účastní různých buněčných procesů, např. vývoje, diferenciace, adheze nebo organizace cytoskeletu. Zároveň byly vzorky FSGS pacientů řádně roztříděny dle Kolumbijské klasifikace. Jejich analýza ukázala, že při srovnání FSGS a MCD pacientů se mnohé geny exprimují rozdílně, např. *NPHS2, PODXL, PLCE1, NPHS1, SYNPO, PLA2R1* a *INF2*. Výsledky prezentované v této dizertační práci však neukázaly rozdílné exprese genů, které byly zahrnuty v obou studiích, mezi pacienty s FSGS a MCD. To mohlo být zapříčiněno mimo jiné i tím, že byly použity různě uchovávané vzorky: parafínové bločky (Hodgin a kol.) vs. stabilizační pufr (studie prezentovaná v této práci) nebo roztříděné FSGS vzorky (Hodgin a kol.) vs. různé typy primárních FSGS v rámci jedné skupiny (tato práce) [113].

8. ZÁVĚR

Nefrotický syndrom je možno nalézt u primárních i sekundárních glomerulopatií. Mezi jeho charakteristické znaky patří proteinurie, hypoproteinémie, otoky a hyperlipidémie. U primárních forem, mezi které patří např. FSGS a MCD, se poslední dobou věnuje velká pozornost jejich genetickému podkladu. V souvislosti s těmito formami byly nalezeny různé geny, např. *ACTN4* nebo *INF2*, jejichž mutace prokazatelně způsobují různé typy glomerulopatií.

Cílem práce bylo nejprve navázat na diplomovou práci autorky a pokračovat v mutační analýze genu *ACTN4*. Vybrané úseky tohoto genu byly analyzovány u pacientů s IgA nefropatií a MGN. U dvou pacientek s IgAN byly nalezeny dosud nepopsané záměny Cys793Tyr a Gly798Asp. Zdá se tedy, že záměny v genu *ACTN4*, by mohly ovlivňovat průběh IgAN. Celý gen byl rovněž testován u několika osob z tzv. speciální skupiny osob, která zahrnovala pacienty s pozitivní rodinnou anamnézou pro ESRD v kombinaci s pokročilou CKD nebo již vyvinutým ESRD v době diagnózy. U jednoho pacienta z této skupina byla nalezena kandidátní kauzální mutace v tomto genu Leu169Pro.

V rámci této práce byla také zavedena mutační analýza genu *INF2*, která by se v budoucnu mohla stát součástí rutinní diagnostiky. Gen *INF2* byl následně analyzován u pacientů s FSGS/MCD a zároveň u všech osob z výše popsané speciální skupiny. V tomto genu byly ovšem nalezeny pouze již popsané kauzální mutace Arg214His a Arg218Gln a exonové i intronové polymorfizmy, u kterých však není předpokládán vliv na průběh onemocnění. Vzhledem k nalezení nízkého počtu kauzálních mutací u vyšetřených osob lze soudit, že mutace v genu *INF2* nejsou častou příčinou FSGS nebo MCD u českých pacientů. Důležitým závěrem je i potvrzení domněnky, že mutace v tomto genu se mohou vyskytovat i u osob s ESRD z neznámé příčiny a s pozitivní rodinnou anamnézou pro ESRD vyskytující se v různých generacích. Z práce tedy plyne, že by bylo vhodné provádět mutační analýzu genu *INF2* u pacientů s NS nebo nejasným renálním selháním, především v případech s pozitivní rodinnou anamnézou stran AD dědičnosti.

Dále byla provedena mutační analýza genů *NPHS2* a *TRPC6* u vybraných pacientů ze speciální skupiny. Všichni testovaní pacienti byli nositelé polymorfizmu Ala404Val v genu *TRPC6*. Získané výsledky potvrzují hypotézu, že tato záměna

v kombinaci s kauzální mutací v některém podocytárním genu, který je spojován s nefropatií, by mohla negativně ovlivnit průběh onemocnění.

V poslední části se práce zabývá expresní analýzou genů, které jsou buď důležité pro správnou funkci podocytů, nebo spojené s imunitním systémem člověka, s cílem nalézt markery, které by pomohly odlišit pacienty s FSGS od osob s MCD. Zároveň bylo ověřováno, zda je možné použít dříve publikovaný poměr expresí genů *NPHS2/SYNPO* při rozlišení těchto skupin pacientů. Expresní analýza však žádné markery pro odlišení FSGS/MCD pacientů neidentifikovala a ani poměr expresí genů *NPHS2/SYNPO* tyto pacienty nerozlišoval.

9. LITERATURA

1. Deen WM. What determines glomerular capillary permeability? The Journal of clinical investigation, 114(10), 2004, 1412-1414.

2. Ichimura K, Stan RV, et al. Glomerular endothelial cells form diaphragms during development and pathologic conditions. Journal of the American Society of Nephrology, 19(8), 2008, 1463-1471.

3. Bearer EL, Orci L. Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. The Journal of cell biology, 100(2), 1985, 418-428.

4. Breier G, Albrecht U, et al. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. Development, 114(2), 1992, 521-532.

5. Olsson AK, Dimberg A, et al. VEGF receptor signalling? In control of vascular function. Nature reviews Molecular cell biology, 7(5), 2006, 359-371.

6. Robert B, Zhao X, Abrahamson DR. Coexpression of neuropilin-1, Flk1, and VEGF164 in developing and mature mouse kidney glomeruli. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 279(2), 2000, F275-F282.

7. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nature medicine, 9(6), 2003, 669-676.

8. Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Role of the VEGF-A signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. Nephron Physiology, 106(2), 2007, p32-p37.

9. Butkowski RJ, Wieslander J, et al. Basement membrane collagen in the kidney: regional localization of novel chains related to collagen IV. Kidney international, 35(5), 1989, 1195-1202.

10. Kanwar YS, Farquhar MG. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(3), 1979, 1303-1307.

11. Barker DF, Hostikka, SL, et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science, 248(4960), 1990, 1224-1227.

12. Mochizuki T, Lemmink HH, et al. Identification of mutations in the α3 (IV) and α4 (IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. Nature genetics, 8(1), 1994, 77-82.

13. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. Physiological reviews, 83(1), 2003, 253-307.

14. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. The Journal of Cell Biology, 60(2), 1974, 423-433.

15. Holthöfer H, Ahola H, et al. Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. The American journal of pathology, 155(5), 1999, 1681-1687.

16. Ruotsalainen V, Ljungberg P, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(14), 1999, 7962-7967.

17. Holzman LB, John PLS, et al. Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. Kidney international, 56(4), 1999, 1481-1491.

18. Tryggvason K. Unraveling the Mechanisms of Glomerular Ultrafiltration Nephrin, a Key Component of the Slit Diaphragm. Journal of the American Society of Nephrology, 10(11), 1999, 2440-2445.

19. Ryšavá R, Tesař V, Merta M. Nefrotický syndrom. Interní medicína pro praxi, 3, 2005, 131-134.

20. Tesař V. Nefrotický syndrom – patogeneze, diagnostika, komplikace, léčba. Med. Pro Praxi, 5, 2008, 62-64.

21. Llach F. Hypercoagulability, renal vein thrombosis, and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. Kidney international, 28(3), 1985, 429-439.

22. Korbet SM. Treatment of primary focal segmental glomerulosclerosis. Kidney international, 62(6), 2002, 2301-2310.

23. Geier P. Nefrotický syndrom. Pediatrie pro praxi 3, 2001, 120-123.

24. Reiterová J, Šafránková H. Geneticky podmíněné formy nefrotického syndromu. Aktuality v nefrologii 16, 2010, 96-100.

25. Lepori N, Zand L, et al. Clinical and pathological phenotype of genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis in adults. Clinical kidney journal, 11(2), 2018, 179-190.

26. Rheault MN, Gbadegesin RA. The genetics of nephrotic syndrome. Journal of pediatric genetics, 5(01), 2016, 015-024.

27. D'Agati V. The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. Kidney international, 46(4), 1994, 1223-1241.

28. D'Agati V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. Seminars in nephrology 23(25), 2003, 117-134.

29. D'Agati VD, Fogo AB, et al. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: A working proposal. American Journal of Kidney Diseases 43(2), 2004, 368-382.

30. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. New England Journal of Medicine, 365(25), 2011, 2398-2411.

31. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. The Journal of clinical investigation, 108(11), 2001, 1583-1587.

32. Ronco P. Proteinuria: is it all in the foot? The Journal of clinical investigation, 117(8), 2007, 2079-2082.

33. Deegens JK, Dijkman HB, et al. Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. Kidney international, 74(12), 2008, 1568-1576.

34. Smeets B, Te Loeke NA, et al. The parietal epithelial cell: a key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. Journal of the American Society of Nephrology, 15(4), 2004, 928-939.

35. Asano T, Niimura F, et al. Permanent genetic tagging of podocytes: fate of injured podocytes in a mouse model of glomerular sclerosis. Journal of the American Society of Nephrology, 16(8), 2005, 2257-2262.

36. Dijkman H, Smeets B, et al. The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis1. Kidney international, 68(4), 2005, 1562-1572.

37. Bariety J, Mandet C, et al. Parietal podocytes in normal human glomeruli. Journal of the American Society of Nephrology, 17(10), 2006, 2770-2780.

38. Kriz W. Progressive renal failure — inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. Nephrology Dialysis Transplantation, 11(9), 1996, 1738-1742.

39. Nagata M, Kriz W. Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. Kidney international, 42(1), 1992, 148-160.

40. Kriz W, Hähnel B, et al. Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. Kidney international, 48(5), 1995, 1435-1450.

41. Shirato I, Hosser H, et al. The development of focal segmental glomerulosclerosis in Masugi nephritis is based on progressive podocyte damage. Virchows Archiv, 429(4-5), 1996, 255-273.

42. Kriz W, Hosser H, et al. Development of vascular pole-associated glomerulosclerosis in the Fawn-hooded rat. Journal of the American Society of Nephrology, 9(3), 1998, 381-396.

43. Kriz W, Hosser H, et al. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. Nephrology Dialysis Transplantation, 13(11), 1998, 2781-2798.

44. Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. Kidney international, 51(1), 1997, 2-15.

45. Egido J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. Kidney international, 49(2), 1996, 578-597.

46. Tang WW, Ulich TR, et al. Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. The American journal of pathology, 148(4), 1996, 1169-1180.

47. Fogo AB. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. Nephrology Dialysis Transplantation, 16(suppl 6), 2001, 74-76.

48. Howie AJ. Pathology of minimal change nephropathy and segmental sclerosing glomerular disorders. Nephrology Dialysis Transplantation, 18(suppl 6), 2003, vi33-vi38.

49. Becker DJ. Minimal change disease. Nephrol Rounds, 34, 2008, 111-34.

50. Glassock RJ. Secondary minimal change disease. Nephrology Dialysis Transplantation, 18(suppl 6), 2003, vi52-vi58.

51. Cattran DC, Coppo R, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. Kidney international, 76(5), 2009, 534-545.

52. Julian BA, Novak J. IgA nephropathy: an update. Current opinion in nephrology and hypertension, 13(2), 2004, 171-179.

53. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. American Journal of Kidney Diseases, 36(2), 2000, 227-237.

54. Wasserstein AG. Membranous glomerulonephritis. Journal of the American Society of Nephrology, 8(4), 1997, 664-674.

55. Törnroth T, Tallqvist G, et al. Nonprogressive, histologically mild membranous glomerulonephritis appearing in all evolutionary phases as histologically "early" membranous glomerulonephritis. Kidney international, 14(5), 1978, 511-521.

56. Maruyama K., Ebashi S. α-Actinin, a new structural protein from striated muscle. The Journal of Biochemistry, 58(1), 1965, 13-19.

57. Davison MD, Baron MD, et al. Structural analysis of homologous repeated domains in α-actinin and spectrin. International journal of biological macromolecules, 11(2), 1989, 81-90.

58. Imamura M, Endo T, et al. Substructure and higher structure of chicken smooth muscle alpha-actinin molecule. Journal of Biological Chemistry, 263(16), 1988, 7800-7805.

59. Baron MD, Davison MD, et al. The sequence of chick alpha-actinin reveals homologies to spectrin and calmodulin. Journal of Biological Chemistry, 262(36), 1987, 17623-17629.

60. Leinweber B, Tang JX, et al. Calponin interaction with α-actinin-actin: evidence for a structural role for calponin. Biophysical journal, 77(6), 1990, 3208-3217.

61. Fukami K, Sawada N, et al. Identification of a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site in chicken skeletal muscle α-actinin. Journal of Biological Chemistry, 271(5), 1996, 2646-2650.

62. Fraley TS, Tran TC, et al. Phosphoinositide binding inhibits α-actinin bundling activity. Journal of Biological Chemistry, 278(26), 2003, 24039-24045.

63. Fraley TS, Pereira CB, et al. Phosphoinositide binding regulates α-actinin dynamics mechanism for modulating cytoskeletal remodeling. Journal of Biological Chemistry, 280(15), 2005, 15479-15482.

64. Corgan AM, Singleton C, et al. Phosphoinositides differentially regulate alpha-actinin flexibility and function. Biochemical Journal, 378(3), 2004, 1067-1072.

65. Pavalko FM, LaRoche SM. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. The Journal of Immunology, 151(7), 1993, 3795-3807.

66. Shibasaki F, Fukami K, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase binds to α-actinin through the p85 subunit. Biochemical Journal, 302(2), 1994, 551-557.

67. Asanuma K, Kim K. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α-actinin in an isoform-specific manner. The Journal of clinical investigation, 115(5), 2005, 1188-1198.

68. Chen VC, Li X, et al. Interaction of zonula occludens-1 (ZO-1) with α-actinin-4: application of functional proteomics for identification of PDZ domain-associated proteins. Journal of proteome research, 5(9), 2006, 2123-2134.

69. Patrie KM, Drescher AJ, et al. Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and α-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. Journal of Biological Chemistry, 277(33), 2002, 30183-30190.

70. McGregor A, Blanchard AD, et al. Identification of the vinculin-binding site in the cytoskeletal protein α-actinin. Biochemical Journal, 301(1), 1994, 225-233.

71. Magdolen U, Schroeck F, et al. Non-muscle α-actinin-4 interacts with plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1). Biological chemistry, 385(9), 2004, 801-808.

72. Choi HJ, Lee BH, et al. Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an ACTN4 mutation and paternal germline mosaicism. American Journal of Kidney Diseases, 51(5), 2008, 834-838.

73. Dai S, Wang Z, et al. ACTN4 gene mutations and single nucleotide polymorphisms in idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. Nephron Clinical Practice, 111(2), 2009, c87-c94.

74. Dai, S, Wang Z, et al. Functional analysis of promoter mutations in the ACTN4 and SYNPO genes in focal segmental glomerulosclerosis. Nephrology Dialysis Transplantation, 25(3), 2009, 824-835.

75. Kaplan JM, Kim SH, et al. Mutations in ACTN4, encoding α-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nature genetics, 24(3), 2000, 251-256.

76. Weins A, Kenlan P, et al. Mutational and biological analysis of α-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. Journal of the American Society of Nephrology, 16(12), 2005, 3694-3701.

77. Bartram MP, Habbig S, et al. Three-layered proteomic characterization of a novel ACTN4 mutation unravels its pathogenic potential in FSGS. Human molecular genetics, 25(6), 2016, 1152-1164.

78. Honda K, Yamada T, et al. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. The Journal of cell biology, 140(6), 1998, 1383-1393.

79. Echchakir H, Mami-Chouaib F, et al. A point mutation in the α-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma. Cancer Research, 61(10), 2001, 4078-4083.

80. Yamamoto S, Tsuda H, et al. Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. Modern Pathology, 22(4), 2009, 499-507.

81. Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. Annu. Rev. Biochem., 76, 2007, 593-627.

82. Schönichen A, Geyer M. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1803(2), 2010, 152-163.

83. Wallar BJ, Alberts AS. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Trends in cell biology, 13(8), 2003, 435-446.

84. Bartolini F, Gundersen GG. Formins and microtubules. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1803(2), 2010, 164-173.

85. Higgs HN, Peterson KJ. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. Molecular biology of the cell, 16(1), 2005, 1-13.

86. Chalkia D, Nikolaidis N, et al. Origins and evolution of the formin multigene family that is involved in the formation of actin filaments. Molecular biology and evolution, 25(12), 2008, 2717-2733.

87. Pruyne D, Evangelista M, et al. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. Science, 297(5581), 2002, 612-615.

88. Evangelista M, Zigmond S, Boone C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. Journal of Cell Science, 116(13), 2003, 2603-2611.

89. Shimada A, Nyitrai M, et al. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. Molecular cell, 13(4), 2004, 511-522.

90. Zigmond SH. Formin-induced nucleation of actin filaments. Current opinion in cell biology, 2004, 16(1), 99-105.

91. Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. Trends in biochemical sciences, 30(6), 2005, 342-353.

92. Castrillon DH, Wasserman SA. Diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. Development, 120(12), 1994, 3367-3377.

93. Paul A, Pollard T. The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. Current Biology, 18(1), 2008, 9-19.

94. Zigmond SH, Evangelista M, et al. Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. Current Biology, 13(20), 2003, 1820-1823.

95. Chhabra ES, Higgs HN. INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. Journal of Biological Chemistry, 281(36), 2006, 26754-26767.

96. Lammers M, Rose R, et al. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho• GTP. The EMBO journal, 24(23), 2005, 4176-4187.

97. Miyagi Y, YamashitaT, et al. Delphilin: a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor δ2 subunit. The Journal of neuroscience, 22(3), 2002, 803-814.

98. Brown EJ, Schlöndorff JS, et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. Nature genetics, 42(1), 2010, 72-76.

99. Ramabhadran V, Korobova F, et al. Splice variant–specific cellular function of the formin INF2 in maintenance of Golgi architecture. Molecular biology of the cell, 22(24), 2011, 4822-4833.

100. Hall G, Gbadegesin RA. Translating genetic findings in hereditary nephrotic syndrome: the missing loops. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 309(1), 2015, F24-F28.

101. Ramabhadran V, Hatch AL, Higgs HN. Actin monomers activate inverted formin 2 by competing with its autoinhibitory interaction. Journal of Biological Chemistry, 288(37), 2013, 26847-26855.

102. Chhabra ES, Ramabhadran V, et al. INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. J Cell Sci, 122(9), 2009, 1430-1440.

103. Boyer O, Nevo F, et al. INF2 mutations in Charcot–Marie–Tooth disease with glomerulopathy. New England Journal of Medicine, 365(25), 2011, 2377-2388.

104. Boyer O, Benoit G, et al. Mutations in INF2 are a major cause of autosomal dominant focal segmental glomerulosclerosis. Journal of the American Society of Nephrology, 22(2), 2011, 239-245.

105. Sun H, Schlondorff J, et al. Inverted formin 2 regulates actin dynamics by antagonizing Rho/diaphanous-related formin signaling. Journal of the American Society of Nephrology, 24(6), 2013, 917-929.

106. Sun H, Schlondorff JS, et al. Rho activation of mDia formins is modulated by an interaction with inverted formin 2 (INF2). Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(7), 2011, 2933-2938.

107. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25(4), 2001, 402-408.

108. Büscher AK, Celbi N, et al. Mutations in INF2 may be associated with renal histology other than focal segmental glomerulosclerosis. Pediatric Nephrology, 33(3), 2018, 433-437.

109. Barua M, Brown EJ, et al. Mutations in the INF2 gene account for a significant proportion of familial but not sporadic focal and segmental glomerulosclerosis. Kidney international, 83(2), 2013, 316-322.

110. Caridi G, Lugani F, et al. Novel INF2 mutations in an Italian cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis, renal failure and Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Nephrology Dialysis Transplantation, 29 (suppl_4), 2014, iv80-iv86.

111. Joshi BB, Koringa PG, et al. In silico analysis of functional nsSNPs in human TRPC6 gene associated with steroid resistant nephrotic syndrome. Gene, 572(1), 2015, 8-16.

112. Schmid H, Henger A, et al. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. Journal of the American Society of Nephrology, 14(11), 2003, 2958-2966.

113. Hodgin JB, Borczuk AC, et al. A molecular profile of focal segmental glomerulosclerosis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. The American journal of pathology, 177(4), 2010, 1674-1686.

10. PUBLIKACE

Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce

Marketa Safarikova, Jitka Stekrova, Eva Honsova, Vera Horinova, Vladimir Tesar, Jana Reiterova: Mutational sreening of inverted formin 2 in adult-onset focal segmental glomerulosclerosis or minimal change patients from the Czech Republic. BMC Medical Genetics 19(1), 2018, 147 **(IF 1,913; v době online publikování)**

M. Šafaříková, J. Reiterová, H. Šafránková, J. Štekrová, A. Zidková, L. Obeidová, M. Kohoutová, V. Tesař: The mutational analysis of *ACTN4*, encoding alpha-actinin-4, in patients with focal segmental glomerulosclerosis using HRM method. Folia biologica 59(3), 2013, 110-115. **(IF 0,778)**

Publikace bez IF, které jsou podkladem dizertační práce

Šafaříková M., Pazourková E., Hořínek A., Reiterová J., Maixnerová D., Honsová E., Zadražil J., Štekrová J., Kohoutová M., Tesař V.: Ověření použitelnosti poměru expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* při diagnostice fokální segmentální glomerulosklerózy a minimálních změn glomerulů. Klin. Biochem. Metab. 24(2), 2016, 63-66.

Publikace bez vztahu k dizertační práci

Z. Musil, I. Svobodova, A. Zidkova, **M. Safarikova**, A. Vicha, M. Vocka, L. Stanek, T. Labudova, J. Vcelak, E. Vaclavikova, V. Tesar, P. Tesarova, T. Seeman, J. Reiterova: A pilot study conducted in the Czech Republic relating to the molecular analysis of the *RET* and *GDNF* genes in patients with CAKUT, predominantly unilateral renal agenesis. MRJMMS 3(4), 2015, 121-125. **(IF 0,678)**

11. PŘÍLOHY

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce.