Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Geneticky podmíněné faktory progrese vybraných forem chronických nefropatií

Genetic factors of progression of selected forms of chronic nephropathies

Mgr. Markéta Šafaříková

Praha, 2018

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školicí pracoviště: Laboratoř molekulární genetiky

Ústav biologie a lékařské genetiky

1. LF UK a VFN v Praze

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

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

SEZNAM ZKRATEK

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
APOL1 apolipoprotein L1
AR autozomálně recesivní
Arp 2/3 actin related protein 2/3
ATP adenozintrifosfát
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
CH1-2 kalponin homologní domény
CKD chronic kidney disease (chronické onemocnění ledvin)
CMT Charcot-Marie-Tooth neuropatie
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
ESRD end stage renal disease (renální selhání)
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
FRL1-3 označení pro FMNL1-3 proteiny
FSGS fokální segmentální glomeruloskleróza
G guanin

GBD GTP vazebná doména
GBM glomerulární bazální membrána
GRID2IP Grid 2 interacting protein, označení pro protein Delfilin formin
GTP guanozintrifosfát
GTPáza hydroláza měnící guanozintrifosfát na guanozindifosfát
HGMD Human Gene Mutation Database
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
IVS intron, intervening sequence
KIRREL2 kirre like nephrin family adhesion molecule 2
L žebříček, ladder
LN lupusová nefritida
MCD minimální změny glomerulů
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
NCBI National Center for Biotechnology Information
NGS sekvenování nové generace, next generation sequencing
NPHS1 nefrin
NPHS2 podocin
NS nefrotický syndrom
NT nukleotid
PCR polymerázová řetězová reakce
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
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
SD slit diaphragm
SLE systémový lupus erytematodes
SYNPO synaptopodin
T thymin

TGFB1 transforming growth factor beta 1
TNFSF12 TNF superfamily member 12
TRPC6 transient receptor potential cation channel subfamily C member 6
VEGFA vaskulární endoteliální růstový faktor A
WASP Wiskott–Aldrich syndrome protein
WH2 WASP homologní motiv 2
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

SEZNAM ZKRATEK 3
OBSAH 6
ABSTRAKT 8
ABSTRACT 9
1. ÚVOD 10
1.1. Ledviny a filtrace krve 10
1.2. Nefrotický syndrom 10
1.3. Idiopatický nefrotický syndrom 11
1.4. Fokální segmentální glomerulosklerózа 11
1.5. Minimální změny glomerulů 12
1.6. IgA nefropatie 12
1.7. Membranózní glomerulonefritida 12
1.8. α-aktinin-4 13
1.9. Invertovaný formin 2 13
2. CÍLE PRÁCE 15
3. MATERIÁL A METODIKA 16
3.1. Mutační analýza 16
3.1.1. Pacienti pro analýzu genu *INF2* 16
3.1.2 Pacienti pro analýzu genu *ACTN4* 16
3.1.3. Pacienti pro analýzu genů *NPHS2* a *TRPC6* 17
3.1.4. Příbuzní pacientů 17
3.1.5. Kontrolní soubor 17
3.1.6. Soubor pacientů pro expresní analýzu 17
3.1.7. Primery 17
3.1.8. PCR reakce 17
3.1.9. High resolution melting metoda 18
3.1.10. Gelová elektroforéza 18
3.1.11. Sekvenování 19
3.1.12. Analýza polymorfizmů délky restrikčních fragmentů 19
3.2. Expresní analýza 19
3.2.1. Reverzní transkripce 19
3.2.2. Real-time PCR 19
3.3. Vyhodnocení výsledků 20
3.4. Statistika 21
3.5. Software a databáze 21
4. VÝSLEDKY 22
4.1. Mutační analýza genu *ACTN4* 22
4.1.1. Záměna p.Asn748Asp 22
4.1.2. Exon 19 22
4.1.3. Záměna Leu169Pro 23
4.2. Mutační analýza genu *INF2* 25
4.2.1. Záměny nalezené v exonech 25
4.2.1.1. Záměna p.Arg214His 25
4.2.1.2. Záměna p.Arg218Gln 26
4.2.2. Záměny nalezené v intronech 27
4.3. Mutační analýza genů *NPHS2* a *TRPC6* 27
4.4. Expresní analýza 27

5. DISKUZE 27
6. ZÁVĚR 29
7. LITERATURA 30
8. PUBLIKACE 35

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.

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.

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.

1.1. 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.
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].

1.2. 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, např. imunodeficience, vyšší výskyt infekcí a zvýšená srážlivost krve [2-4]. Průběh nefrotického syndromu u jednotlivých pacientů může být velmi variabilní. Obvykle je nasazena terapie kortikosteroidy [5].
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 glomeruloskleróza (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) [2,3]. Podle typu glomerulopatie, u které se nefrotický

syndrom vyskytl, pak hovoříme buď o primárním (idiopatickém) NS, nebo sekundárním NS [6].

1.3. 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) [7]. Díky rozvoji molekulárně-genetických metod je v současné době známo již několik desítek genů spojených s INS, např. *ACTN4, CD2AP, INF2, NPHS1. NPHS2* a *TRPC6*. 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 [8,9].

1.4. 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 [10-12]:

I. Primární (idiopatická) – z neznámých příčin

II. Sekundární – sem patří např. dědičné formy (způsobeny mutacemi v některých genech, např. *ACTN4*) a FSGS asociované s některými viry nebo zapříčiněné přítomností léčiv nebo drog.

V morfologickém dělení se používá Kolumbijská klasifikace, která rozřazuje FSGS na základě histologického obrazu a předpokládané prognózy do 5 skupin: nespecifická, perihilární, buněčná, kolabující a periferní [13].

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 [14,15]. Zajímavostí je, že u primárních forem se foot process effacement vyskytuje ve větším rozsahu než u forem sekundárních [16].

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 [17-19]. PEC mohou být také označovány jako parietální podocyty, a to díky expresi proteinů typických pro podocyty, např. podokalyxin, nefrin, podocin a synaptopodin [20].

U sekundárních forem FSGS foot process effacement končí oddělením podocytů od glomerulární bazální membrány [21]. Počty podocytů tak na GBM klesají, protože to jsou plně diferenciované buňky, které se nedokáží dělit [22]. Po navození specifických podmínek podstoupí pouze mitózu (jaderné dělení), která ovšem nepokračuje cytokinezí (dělení buňky) [23]. 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 [24,25].

1.5. 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 [26,27]. Na rozdíl od FSGS, která často končí selháním ledvin (ESRD), mají pacienti s MCD relativně dobrou prognózu a lepší klinickou odpověď na terapii kortikosteroidy [28]. Původ může být opět primární nebo sekundární, který je spojovaný s různými typy tumorů, léky, infekcemi a alergiemi [29]. Provázanost obou diagnóz dokládá nejen stejné poškození podocytů, ale i fakt, že stav některých pacientů s MCD se zhoršuje a vede k rozvoji FSGS [28].

1.6. IgA nefropatie

IgA nefropatie (IgAN) je světově nejrozšířenější primární glomerulonefritida [30]. Příčinou onemocnění je nadměrné ukládání IgA často s C3 v glomerulárním mezangiu, což vede k jeho proliferaci [31]. Průběh onemocnění může být velmi variabilní od pomalé progrese až k rychlému selhání ledvin [32]. V současné době se pro klasifikaci IgAN a pro odhad progrese onemocnění u jednotlivých pacientů používá Oxfordské skóre (nazývané též MEST skóre) [30].

1.7. Membranózní glomerulonefritida

Membranózní glomerulonefritida (MGN) patří mezi 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. 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) [33,34].

1.8. 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 [35]. Jeho hlavním úkolem je spojovat F-aktinová vlákna [36]. Základní struktura je antiparalelní homodimer složený z hlavičky a koncové části [37]. 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) [38,39]. Do CH2 domény se mohou také vázat fosfatidylinozitoly, což má za následek ovlivnění funkce proteinu a následně i plasticity celého aktinového cytoskeletu [40-43]. 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 [38,39].
Mutace v genu *ACTN4* jsou spojovány s autozomálně dominantní formou FSGS [44-49].

1.9. Invertovaný formin 2

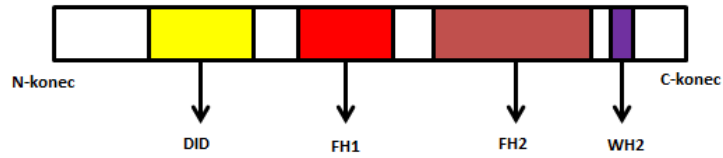
Protein invertovaný formin 2 (INF2) patří do poměrně rozsáhlé rodiny forminů zahrnující celkem 15 proteinů, které je možné rozdělit dle následujícího schématu [50,51]:

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 [52,53]. Forminy jsou složeny z několika domén, jejichž kombinace se liší v závislosti na typu proteinu a druhu organizmu [54,55]. 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) [50,51,54].
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 [56-60]. FH1 doména obsahuje prolin bohatou oblast. Prostřednictvím této oblasti se FH1 váže k profilinu navázanému na G-aktin [61] a pomáhá tak zvyšovat koncentraci tohoto komplexu v místě růstu vlákna, což má za následek rychlejší elongaci [62]. Zároveň spolu s FH2 doménou pomáhá chránit rostoucí vlákno před vytvořením čepičky na jeho konci [63]. 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 [64], viz níže v této kapitole. GBD vazebná doména slouží jako místo pro navázání malých GTPázových proteinů z rodiny Rho [65]. 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 [66].
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 [51,60]. 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 [67]. 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 [68].
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 [64]. To vedlo k myšlence evoluční příbuznosti obou motivů [51]. Nutno dodat, že v literatuře se lze setkat s oběma termíny, tzn. WH2 i DAD, jako součást struktury proteinu. Detailní strukturu proteinu popisuje Obrázek 1.



Obrázek 1: 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 [69]. Další teorie poukazuje na to, že vazba DID/WH2 domén inhibuje jeho schopnost depolymerovat aktinová filamenta, avšak neovlivňuje polymerační aktivitu [70].
Mutace v genu *INF2* jsou spojovány s Charcot-Marie-Tooth neuropatií (CMT), při které se může objevit i glomerulopatie [71], a s nefrotickým syndromem, jehož histologický obraz odpovídá FSGS [72]. V případě familiárního výskytu FSGS se jedná o autozomálně dominantní typ dědičnosti [7].
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 [67,73]. 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 [74].
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 [74].

2. 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

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Mutační analýza

Všechny osoby podepsaly před odběrem krve informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením.

3.1.1. 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.
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.

3.1.2 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).
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 3.1.1.

3.1.3. 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 3.1.1.

3.1.4. 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.

3.1.5. Kontrolní soubor

Kontrolní soubor (nazývání 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. Soubor obsahoval náhodně vybrané vzorky DNA mužů i žen. U všech osob zařazených do kontrolního souboru byl přítomen normální močový sediment bez proteinurie.

3.1.6. 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).

3.1.7. Primery

Pro mutační analýzu všech genů byly použity primery (GENERI BIOTECH, ČR) navržené v programu Primer-Blast.

3.1.8. 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 3.1.9, a také u 3 pacientů, kterým byla indikována mutační analýza genů *ACTN4, NPHS2* a *TRPC6*. PCR reakce s konstantními anelačními teplotami primerů předcházela upravenému HRM protokolu (gen *INF2*), viz kapitola 3.1.9, a také použití restrikční endonukleázy, viz kapitola 3.1.12.

3.1.9. 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 probíhala v přístroji Light Cycler 480 (Roche diagnostics, Švýcarsko). K analýze byl použit kit LightCycler 480 HRM Master (Roche diagnostics, Švýcarsko).

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. 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.

3.1.10. 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 po restrikci, kdy obě směsi již obsahují barvu, stačilo nanést 4 µ produktu přímo na gel. Pro odečtení délky fragmentů byl použit 100 bp žebříček (Thermo Scientific, USA). Součástí gelu bylo vždy interkalační barvivo GelRed®

Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA). Produkty byly detekovány pomocí UV transluminátoru LKB 2011 Macro Vue (Pharmacia LKB, Švédsko).

3.1.11. Sekvenování

Pro sekvenační reakci byl použit sekvenační kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Jako templát byly použity produky z klasické PCR reakce nebo po HRM metodě (standardní i upravený protokol). Následovalo postsekvenační etanolové přečištění. Nakonec byly produkty analyzovány na přístroji Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA) se zabudovaný softwarem 3130 Series Data Collection Software v3.1 (Applied Biosystems, USA).

3.1.12. 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 gelové elektroforézy, viz kapitola 3.1.8. 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. Po restrikci následovala gelová elektroforéza a kontrola výsledků, viz kapitola 3.1.10.

3.2. Expresní analýza

3.2.1. 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). Přepis probíhal v přístroji Mastercycler gradient (Eppendorf, Německo).

3.2.2. 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 1 jsou uvedeny analyzované geny.

Tabulka 1: 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
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

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/).

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: $C(T)_{\text{analyzovaný gen}} - C(T)_{\text{referenční gen}}$ [75].

3.4. 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).

3.5. Software a databáze

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)
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/)

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)

4. VÝSLEDKY

4.1. 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.

4.1.1. 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. 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. Kauzalitu této záměny podpořilo i vysoké skóre programů PolyPhen-2 (0,983) a Mutation Taster („disease causing“).

4.1.2. 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 2.

Tabulka 2: 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).

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

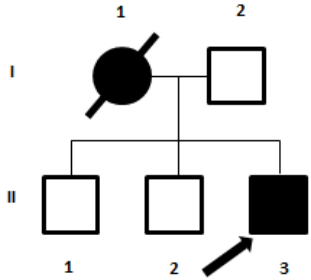
Záměna NT	Záměna AK	FSGS/ MCD	IgAN	MGN	Kontroly
c.2359C>T	p.Pro787Ser	0	8	1	13
c.2360C>T	p.Pro787Leu	3	41	6	29
c.2361C>T	p.Pro787Pro	1	18	2	6
c.2378G>A	p.Cys793Tyr	0	1	0	0
c.2393G>A	p.Gly798Asp	0	1	0	0
c.2401G>A	p.Val801Met	0	1	1	0
c.2418+8A>G		0	1	0	0
c.2418+13G>A		0	0	1	1
c.2418+14G>A		0	0	0	3
c.2418+15G>A		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) 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.
Další dosud nepopsaná záměna p.Gly798Asp (c.2393G>A) 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.

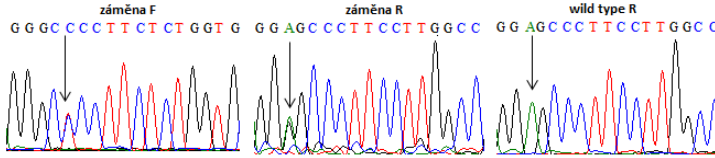
4.1.3. Záměna Leu169Pro

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 2 až 4.
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

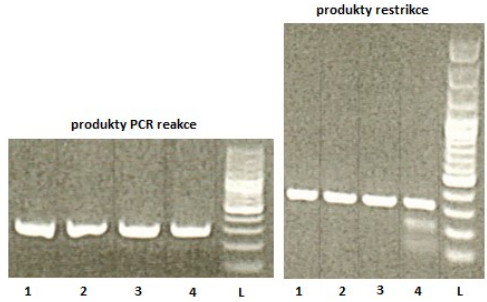
„disease causing“. Výskyt záměny byl rovněž ověřen na souboru 160 zdravých kontrol (80 mužů, 80 žen, celkem 320 chromozomů), avšak u žádného z nich nebyla nalezena. Zároveň bylo prokázáno, že se jedná o konzervovanou aminokyselinu napříč živočišnou říší.



Obrázek 2: Genealogické schéma rodiny probanda II/3, u kterého byla identifikována substituce Leu169Pro (506T>C).



Obrázek 3: Porovnání DNA sekvence probanda se záměnou 506T>C (p.Leu169Pro) a wild type sekvence. F = přímá sekvence, R = zpětná sekvence



Obrázek 4: 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).

4.2. Mutační analýza genu *INF2*

4.2.1. 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 3.

Tabulka 3: 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.

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

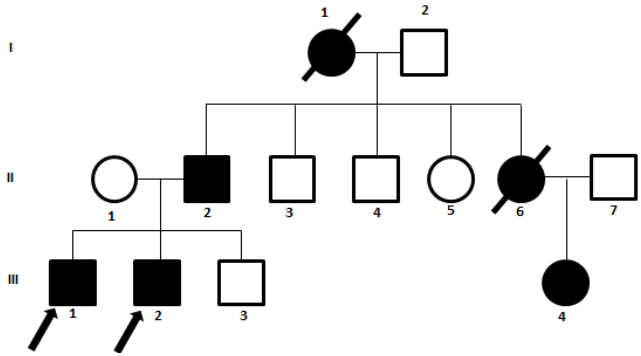
4.2.1.1. Záměna p.Arg214His

Známá kauzální záměna p.Arg214His (641G>A) [67] 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. U

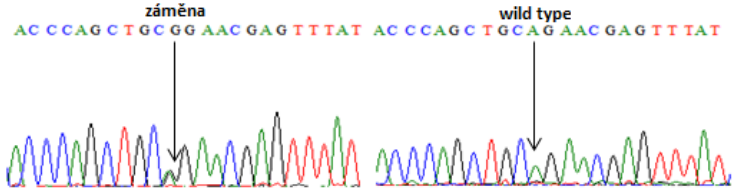
probandky byla prokázána přítomnost bílkoviny v moči již v dětství. Ačkoliv pacientka trpí zároveň diabetem mellitem druhého typu, hypertenzí a obezitou, má pouze mírnou chronickou renální insuficienci (stupeň 2) a malou proteinurii (1-3 g / 24 hod.).

4.2.1.2. Záměna p.Arg218Gln

Popsaná kauzální substituce p.Arg218Gln (653G>A) [67], 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 5 a 6.



Obrázek 5: 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 6: Porovnání DNA sekvence jednoho z probandů se záměnou 653G>A (p.Arg218Gln) a wild type sekvence.

4.2.2. 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.

4.3. 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 4.

Tabulka 4: 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).

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

4.4. 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. 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.

5. 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 [67]. 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 [76].
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 [67,72,77,78], 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 [79]. 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. [80]. 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 [13]. 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) [81].

6. 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.

7. LITERATURA

1. Deen WM. What determines glomerular capillary permeability? The Journal of clinical investigation, 114(10), 2004, 1412-1414.
2. Ryšavá R, Tesař V, Merta M. Nefrotický syndrom. Interní medicína pro praxi, 3, 2005, 131-134.
3. Tesař V. Nefrotický syndrom – patogeneze, diagnostika, komplikace, léčba. Med. Pro Praxi, 5, 2008, 62-64.
4. Llach F. Hypercoagulability, renal vein thrombosis, and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. Kidney international, 28(3), 1985, 429-439.
5. Korbet SM. Treatment of primary focal segmental glomerulosclerosis. Kidney international, 62(6), 2002, 2301-2310.
6. Geier P. Nefrotický syndrom. Pediatrie pro praxi 3, 2001, 120-123.
7. Reiterová J, Šafránková H. Geneticky podmíněné formy nefrotického syndromu. Aktuality v nefrologii 16, 2010, 96-100.
8. 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.
9. Rheault MN, Gbadegesin RA. The genetics of nephrotic syndrome. Journal of pediatric genetics, 5(01), 2016, 015-024.
10. D'Agati V. The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. Kidney international, 46(4), 1994, 1223-1241.
11. D'Agati V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. Seminars in nephrology 23(25), 2003, 117-134.

12. 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.
13. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. New England Journal of Medicine, 365(25), 2011, 2398-2411.
14. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. The Journal of clinical investigation, 108(11), 2001, 1583-1587.
15. Ronco P. Proteinuria: is it all in the foot? The Journal of clinical investigation, 117(8), 2007, 2079-2082.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Bariety J, Mandet C, et al. Parietal podocytes in normal human glomeruli. Journal of the American Society of Nephrology, 17(10), 2006, 2770-2780.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Fogo AB. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. Nephrology Dialysis Transplantation, 16(suppl 6), 2001, 74-76.
27. Howie AJ. Pathology of minimal change nephropathy and segmental sclerosing glomerular disorders. Nephrology Dialysis Transplantation, 18(suppl 6), 2003, vi33-vi38.
28. Becker DJ. Minimal change disease. Nephrol Rounds, 34, 2008, 111-34.
29. Glassock RJ. Secondary minimal change disease. Nephrology Dialysis Transplantation, 18(suppl 6), 2003, vi52-vi58.

30. Cattran DC, Coppo R, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. Kidney international, 76(5), 2009, 534-545.
31. Julian BA, Novak J. IgA nephropathy: an update. Current opinion in nephrology and hypertension, 13(2), 2004, 171-179.
32. 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.
33. Wasserstein AG. Membranous glomerulonephritis. Journal of the American Society of Nephrology, 8(4), 1997, 664-674.
34. 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.
35. Maruyama K., Ebashi S. α-Actinin, a new structural protein from striated muscle. The Journal of Biochemistry, 58(1), 1965, 13-19.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Fraley TS, Tran TC, et al. Phosphoinositide binding inhibits α-actinin bundling activity. Journal of Biological Chemistry, 278(26), 2003, 24039-24045.
42. 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.
43. Corgan AM, Singleton C, et al. Phosphoinositides differentially regulate alpha-actinin flexibility and function. Biochemical Journal, 378(3), 2004, 1067-1072.
44. 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.
45. 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.
46. 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.

47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. Annu. Rev. Biochem., 76, 2007, 593-627.
51. 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.
52. Wallar BJ, Alberts AS. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Trends in cell biology, 13(8), 2003, 435-446.
53. Bartolini F, Gundersen GG. Formins and microtubules. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1803(2), 2010, 164-173.
54. Higgs HN, Peterson KJ. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. Molecular biology of the cell, 16(1), 2005, 1-13.
55. 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.
56. Pruyne D, Evangelista M, et al. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. Science, 297(5581), 2002, 612-615.
57. 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.
58. 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.
59. Zigmond SH. Formin-induced nucleation of actin filaments. Current opinion in cell biology, 2004, 16(1), 99-105.
60. Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. Trends in biochemical sciences, 30(6), 2005, 342-353.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.

66. 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.
67. Brown EJ, Schlöndorff JS, et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. Nature genetics, 42(1), 2010, 72-76.
68. 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.
69. 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.
70. Chhabra ES, Ramabhadran V, et al. INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. J Cell Sci, 122(9), 2009, 1430-1440.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.

8. 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)**