

Klinika nefrologie a 1. lékařská fakulta  
Univerzity Karlovy v Praze,  
Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

**POLYMORFISMY GENŮ PODÍLEJÍCÍ SE  
NA PROGRESI RENÁLNÍ INSUFICIENCE**

Dita Maixnerová

autoreferát disertační práce

Praha 2008

## I. Úvod do problematiky

V posledních letech je věnována značná pozornost studiu různých mechanismů podílejících se na progresi renálních onemocnění k renálnímu selhání. IgA nefropatie (IgAN) představuje jednu z nejčastějších glomerulonefritid vedoucích k selhání funkce ledvin. U této nefropatie byl v mnoha studiích zkoumán vztah genotypu a fenotypu (3, 4) a doposud nebyla jednoznačně potvrzena dědičná varianta. Rovněž u Polycystické choroby ledvin autozomálně dominantního typu (PCHLAD), jedné z nejčastějších dědičných příčin renálního selhání s potvrzenou vazbou na PKD 1 a PKD 2 geny, byly prokázány genové polymorfismy ovlivňující progresi onemocnění (13). V naší studii jsme se zaměřili na vybrané genové polymorfismy podílející se na progresi IgAN a PCHLAD. Dále jsme se zabývali problematikou familiální IgAN v české populaci.

### *a) IgA nefropatie (IgAN)*

IgAN je mezangiálně-proliferativní glomerulonefritida, charakterizovaná difúzním ukládáním imunoglobulinu A (IgA) nebo imunitních komplexů obsahujících IgA (IgA-IK) v mezangiu. Jedním z nejčastějších klinických projevů onemocnění je makroskopická hematurie, vyprovokovaná infekcí horních cest dýchacích a vyskytující se u mladých mužů ve druhé a třetí dekádě života. Asymptomatický smíšený močový nález – mikroskopická hematurie s nebo bez proteinurie (obvykle < 2g/24 h) – vede k odhalení 30-40 % pacientů s IgAN.

IgAN byla dříve považována za benigní onemocnění; nicméně, 15 % až

40 % pacientů postupně v průběhu dvaceti let dospěje do chronického renálního selhání. Definitivní diagnóza IgAN je stanovena vždy renální biopsií. Hlavním diagnostickým znakem je mezangiální pozitivita IgA v imunofluorescenci. V progresivních stádiích onemocnění je nejběžnějším znakem ve světelné mikroskopii mezangiální hypercelularita s nahromaděním mezangiální matrix, čemuž odpovídají mezangiální a paramezangiální elektronová denzní depozita prokazatelná při ultrastrukturálním vyšetření.

Nedávno bylo prokázáno, že mezangiální IgA1 u IgAN obsahuje abnormality O-glykosylace (abnormální glycidy s redukovanou glykosylací v O-vázané patové oblasti; 1). Při chybění galaktózy je terminálním cukrem N-acetylgalaktosamin (GalNAc), glykopeptidy jsou pak rozpoznávány specifickými protilátkami a následně dochází k tvorbě cirkulujících imunokomplexů (CIC). Recentní studie prokázaly, že IgAN-CIC, složené z galaktózy-deficientní IgA1 spojené s antiglycinovými protilátkami, jsou vázány k mezangiálním buňkám mnohem pevněji než nekomplexní IgA a hrají tak významnou úlohu v patogenezi IgAN. Rovněž jsou popisovány i familiální formy IgAN; Gharavi et al. (2) udávali vazbu IgAN na chromosom 6q22-q23. Další studie prokázaly vazbu i na jiné chromosomy – 3p24-23, 2q36, 4q26-31 a 17q12-22. V současné době není jednoznačně známý gen zodpovědný za familiální IgAN. Nejpřesvědčivějšími rizikovými faktory nepříznivého průběhu IgAN jsou hypertenze, těžká proteinurie, zvýšený sérový kreatinin a histologické léze typu glomerulosklerózy a intersticiální fibrózy.

V terapii, podobně jako u jiných glomerulopatií, je nutné maximálně omezit riziko hemodynamického poškození glomerulů. U všech pacientů

s IgAN je nutná pečlivá léčba hypertenze. Lékem volby jsou inhibitory ACE a/nebo antagonisté angiotenzinu podávané v maximální tolerované dávce. Imunitní a zánětlivou odpověď na depozici IgA v glomerulech je pravděpodobně možné ovlivnit imunosupresivní terapií, která je však vzhledem k možným závažným nežádoucím účinkům indikována pouze u pacientů s velkou proteinurií a rizikem progresu renální funkce. Ve stadiu nezvratné pokročilé renální insuficience jsou pacientům nabídnuty náhradní metody funkce ledvin, tj. dialýza, transplantace (s rizikem rekurence podobně jako u jiných nefropatií).

**b) POLYCYSTICKÁ CHOROBA LEDVIN AUTOZOMÁLNĚ  
DOMINANTNÍHO TYPU (PCHLAD)**

PCHLAD je nejčastější dědičné onemocnění ledvin, které se vyskytuje v populaci s frekvencí 1:500-1:1000 živě narozených dětí a je charakterizováno progresivním růstem renálních cyst s postupnou ztrátou renální funkce. Metodou volby v diagnostice PCHLAD je neinvazivní ultrasonografie, u menších cyst (do 1 cm v průměru) je spolehlivější vyšetření výpočetní tomografií (CT), eventuálně magnetickou rezonancí (MR). Základní genetickou diagnostikou zůstává vazebná analýza, která využívá polymorfni mikrosatelitní markery typu cytosin-adenosin (CA) repetitivních sekvencí. Tato nepřímá diagnostická metoda vyžaduje přítomnost minimálně dvou postižených členů ve vyšetřované rodině a umožňuje stanovení vazby onemocnění na gen PKD1 nebo PKD2. Přímá diagnostika (detekce mutací) se zatím provádí v rámci výzkumných projektů. Ke klinickým projevům onemocnění patří arteriální hypertenze, nefrolitiáza, močové infekce, hematurie, bolesti beder či břicha, anémie, vzácně karcinom ledviny. U PCHLAD nemusí být přítomny cysty pouze

v ledvinách, často můžeme prokázat asymptomatické cysty v játrech a pankreatu. V řadě případů nacházíme i abnormity v pojivových tkáních různých orgánů. Kauzální léčba PCHLAD není v současné době k dispozici. U všech postižených je nutná pečlivá dispenzarizace a maximální symptomatická léčba, tzn. včasná a účinná terapie hypertenze, infekce močových cest, urolitiázy, hyperlipidémie a vhodná terapie chronické renální insuficience. Ve stádiu chronického selhání ledvin jsou nemocným s PCHLAD poskytnuty všechny dostupné metody náhrady funkce vlastních ledvin (dialýza, transplantace). V současné době probíhá několik klinických studií zaměřených především na možnost ovlivnění růstu cyst podáním imunosupresivních látek se silně antiproliferativním účinkem (např. rapamycinem, everolimem), látek ovlivňujících koncentrační schopnost ledvin (např. inhibitory vasopresinu – tolvaptanem), zkoušeny jsou i blokátory tyrozinkinázy (EKI-785) či vliv somatostatinu na zmenšení renálních cyst a progresi onemocnění.

### c) GENOVÉ POLYMORFISMY

#### Megsin

Inagi et al. (3) získali genový profil vykultivovaných lidských mezangiálních buněk a identifikovali geny, které byly specificky či nadměrně exprimované v mezangiálních buňkách. Mezi těmito geny tak našli Megsin (**mesangial cell-specific gene with homology to serpin**), který byl mapován na chromosom 18q21.3 (20 kbp dlouhý, má osm exonů). Megsin, protein složený z 380 aminokyselin, je členem serpinové superrodiny (serine protease inhibitor). Megsin hraje důležitou úlohu v regulaci různých procesů v mezangiálních buňkách, například

v metabolismu matrix, buněčné proliferaci i apoptóze. Inagi et al. (3) se domnívají, že nadměrná exprese MEGSINU může vést k mezangiální dysfunkci a ke zhoršení degradace mezangiální matrix. MEGSIN může také interferovat s degradací a ukládáním imunitních komplexů, změnit mikroprostředí mezangiálních buněk, narušit funkci a proliferaci mezangiálních buněk. Ve zvířecích i lidských modelech byla potvrzena zvýšená exprese MEGSINU u onemocnění s mezangiální proliferací a expanzí extracelulární matrix. Z výše uvedeného lze předpokládat, že MEGSIN se uplatňuje při rozvoji IgAN.

### **Endotelin- 1 (ET-1)**

Rodinu endotelinů představují tři peptidy složené z řetězců 21 aminokyselin (ET 1, 2, 3). Endoteliny se podílí na regulaci cévního tonu. Prostřednictvím stimulace ETA receptoru působí jako mohutní vasokonstriktori (4). Studie s neselektivními antagonisty endotelinových receptorů ukazují, že endoteliny zprostředkovávají významnou část systémového a renálního vazokonstrikčního účinku angiotenzinu II (5). Další důležitou roli hrají endoteliny v regulaci transportu vody a elektrolytů v ledvinách. Endoteliny jsou produkovány ve větší části tubulárních buněk, zejména ve sběrných kanálcích. Po uvolnění se váží zejména na ETB receptory dané oblasti. Endoteliny inhibují tubulární reabsorpci vody i sodíku a také antagonizují účinek antidiuretického hormonu ve sběrných kanálcích ledvin. Snížená tvorba ET-1 v nefronech může být příčinou retence sodíku a vody vedoucí k arteriální hypertenzi (4). Endoteliny regulují i buněčnou proliferaci a akumulaci extracelulární matrix. ET-1 zvyšuje uvolňování tkáňového inhibitoru metaloproteináz, cytokinů

stimulujících akumulaci matrix a produkci fibronektinu a kolagenu renálními buňkami (4,5). Endoteliny se tak uplatňují v progresi glomerulární sklerózy a intersticiální fibrózy.

### **Endotelinový receptor typu A (EDNRA)**

Předpokládá se, že některé genové polymorfismy podílející se pravděpodobně v patogenezi hypertenze a aterosklerózy mohou ovlivnit progresi renálních onemocnění, včetně IgAN a PCHLAD. ET-1, peptid složený z 21 aminokyselin, je považován za jeden z možných rizikových faktorů ovlivňujících progresi renální funkce. U PCHLAD a jiných renálních onemocnění byly popsány změny v přirozené rovnováze mezi vazokonstrikčními faktory (odvozenými od endotelinu) a vazodilatačními faktory (6). U renálních onemocnění může hrát důležitou roli zvýšená aktivita silného vazokonstrikčního faktoru ET-1. Zvýšená exprese EDNRA byla nalezena v glomerulech, cystách a renálních arteriích středního kalibru. U hypertenzních pacientů byla potvrzena v oblasti arterií zvýšená exprese EDNRA. Polymorfní varianty EDNRA již byly popsány v souvislosti s migrénou, u pacientů s infarktem myokardu a u idiopatické dilatované kardiomyopatie (7). Spojení mezi T alelou C1363T genového polymorfismu pro EDNRA a zvýšeným krevním tlakem bylo popsáno ve studii ECTIM (7).

### **Endotelin konvertující enzym-1 (ECE-1)**

Endotelin konvertující enzym-1 (ECE-1) je hlavní proteáza zodpovědná za tvorbu ET-1 odštěpením funkčního inaktivního prekurzoru big-ET-1. Gen kódující ECE-1 je umístěn na chromosomu 1 (1p36). Enzym existuje

ve čtyřech izoformách (ECE-1a, 1b, 1c a 1d), které se liší N-terminálními aminokyselinovými konci a vznikly díky existenci čtyř alternativních promotorů v genu. Genový polymorfismus (C/A) umístěný v 5' regulační oblasti genu tvoří vazebné místo pro transkripční faktor E2F-2 (8). Adenosinová varianta polymorfismu (A) byla v experimentálních modelech spojena se zvýšenou aktivitou promotoru. V německé studii měly neléčené hypertenzní ženy častěji A alelu než CC homozygotní ženy (8). Rovněž ve velké francouzské studii byl krevní tlak vyšší u AA homozygotních žen.

### **Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS)**

V posledních letech je diskutován vliv polymorfismu eNOS kyseliny glutamové versus kyseliny asparagové (Glu298Asp) v exonu 7 chromosomu 7 na progresi PCHLAD. Syntéza NO cévním endotelem je důležitá pro regulaci vazodilatačního cévního tonu a kontrolu krevního tlaku. V případě Asp298 varianty je nižší hladina NO v plazmě spojována s hypertenzí u mužů i žen (10) a infarktem myokardu. U PCHLAD se ve zvýšené míře prokazuje porucha vazodilatace závislá na endotelinu a vazodilatace způsobená sníženou tvorbou NO eNOS (11).

### **$\alpha$ -adducin**

Adducin je heterodimerický membránový protein, který interaguje s aktinovým cytoskeletem, ovlivňuje buněčnou signalizaci a přítomnost sodíko-draslíkové pumpy v buněčné membráně. U hypertenzních krys a vzorku hypertenzní populace byla zjištěna zvýšená resorpce sodíku v proximálním tubulu ledvin.



Polymorfismus v genu pro  $\alpha$ -adducin kóduje aminokyselinu glycin nebo tryptofan. U pacientů s přítomností 460Trp alely byla pozorována arteriální hypertenze závislá na příjmu sodíku (12). Různé izoformy  $\alpha$ -adducinu různě postihují na bazolaterální membráně tubulů Na-K-ATPázovou aktivitu, která zesiluje tubulární reabsorpci sodíku. V přítomnosti 460Trp alely byla zjištěna snížená frakční exkrece lithia a kyseliny močové, která odráží zvýšenou resorpci sodíku v proximálním tubulu ledvin. Jedinci s 460Trp alelou mají také větší pokles krevního tlaku po diuretické léčbě a nižší plazmatickou reninovou aktivitu.

V posledních letech byl studován vliv polymorfismu pro adducin na progresi funkce ledvin u neselektované renální populace. U Gly460 homozygotů ve spojení s DD homozygoty ACE polymorfismu byla popsána rychlejší progresse k ESRD (v této studii představovali pacienti s PCHLAD 30% neselektované renální populace).

### **ACE (Angiotenzin-konvertující enzym)**

Jedná se o inzerčně deleční polymorfismus (I/D) v 16. intronu ACE genu lokalizovaném na 17. chromosomu. Inzerční polymorfismus obsahuje 287 párů bází, deleční polymorfismus těchto 287 párů bází neobsahuje. Inzerčně-deleční (I/D) polymorfismus ACE je spojen s 50 % variabilitou v sérových hladinách ACE. Nejvyšší hladiny ACE v séru mají DD homozygoti. V některých zprávách je hodnota ACE udávána o 60% vyšší u DD homozygotů než u II homozygotů (13). U DD homozygotů byla pozorována při některých experimentech zvýšená konverze angiotenzinu I na angiotenzin II, který jako růstový faktor podporuje proliferaci hladkých svalových buněk cév. Dále v přítomnosti D alely je popisována snížená

reakce na vasodilatátory dependentní na NO. Angiotenzin II je vlastní výkonnou molekulou renin-angiotenzin-aldosteronového systému (RAAS) a způsobuje systémovou i renální vasokonstrikci. V ledvinách ovlivňuje glomerulární filtraci konstrikcí aferentní a zejména eferentní arterioly, usnadňuje resorpci sodíku snížením průtoku dření, snížením intersticiálního tlaku v ledvině i přímým působením na sodíko-draslíkovou pumpu v buňkách proximálních tubulů. Přispívá rovněž k retenci sodíku indukcí sekrece aldosteronu nadledvinami. Během vývoje ledvin ovlivňuje buněčný růst a diferenciaci buněk. V mnoha studiích na kulturách fibroblastů, svalových cévních i mezangiálních tubulárních buněk byla prokázána úloha angiotenzinu II jako růstového faktoru. Angiotenzin II stimuluje transkripci a syntézu vlastního transformujícího růstového faktoru (TGF) beta a TGF beta II receptorů v buňkách proximálních tubulů. TGF beta pak přímo stimuluje transkripci kolagenu v renálních tubulárních buňkách a fibroblastech.

U PCHLAD dochází v cystické ledvině ke změně senzitivity tubulárních buněk k angiotenzinu II, k abnormální distribuci buněk obsahujících renin, což může ovlivnit vstup reninu do cirkulace. Tubulocystický epitel má schopnost syntetizovat renin. V Baboolalově studii byl nalezen vztah mezi DD genotypem a zhoršeným renálním přežíváním u PCHLAD. Turco ve své studii poukazoval na vysokou prevalenci DD genotypu mezi hypertenzními PCHLAD pacienty ve srovnání s normotenzními PCHLAD pacienty. Ve většině nedávných studií byl však vliv I/D polymorfismu na průběh PCHLAD vyloučen (14).

## II. METODIKA

### a) týkající se problematiky genových polymorfismů

- V naší studii jsme kromě kontrolní skupiny zdravých jedinců vyšetřovali pacienty s histologicky potvrzenou IgAN (s normální renální funkcí – tzn. normální hladinou sérového kreatininu i normální glomerulární filtrací, s progresivní renální insuficiencí a s renálním selháním), dále pacienty s PCHLAD diagnostikovanou podle sonografických kritérií stanovených pro toto onemocnění. Kritéria zahrnovala přítomnost alespoň dvou cyst v jedné ledvině nebo jedné cysty v každé ledvině u osob mladších 30 let, přítomnost alespoň dvou cyst v každé ledvině u jedinců mezi 30 až 59 lety a u osob nad 60 let nejméně čtyři cysty v každé ledvině. Většina postižených osob měla pozitivní rodinnou anamnézu PCHLAD.

Všichni pacienti před vyšetřením podepsali informovaný souhlas.

- DNA byla izolována z lymfocytů periferní krve vysolovací technikou, při vyšetřování polymorfismů jsme používali polymerase chain reaction (PCR), metodu “mismatch repair“, restriction fragment length polymorphism (RFLP), heteroduplexovou analýzu, elektroforézu na 2% agarózovém gelu (u polymorfismů Endotelinu MDE gel s 15 % ureou), barvení s ethidium bromidem, znázornění pod UV světlem a dále sekvenační analýzu. **Laboratorní zpracování včetně definovaných primerů a vhodných podmínek pro PCR při stanovování jednotlivých polymorfismů je detailně popsáno v příložených publikacích.**

- Frekvence alel a genotypů jednotlivých polymorfismů byly zhotoveny gene counting metodou, současně byla testována Hardy-Weinbergova rovnováha. Dále byl použit chi-kvadrát test ke srovnání rozmístění genotypů u pacientů a kontrol. Haplotypové frekvence byly stanoveny

pomocí metody maximální pravděpodobnosti (Haploview, version 3,32 2005 ) u pacientů a kontrol. Hladina  $p=0,01$  byla považována za statisticky významnou. Rozdíly ve frekvenci haplotypů mezi pacienty a kontrolami, a mezi jednotlivými skupinami byly vyhodnoceny použitím chi-kvadrát testu (STATISTICA version 7.1). Klinické údaje byly porovnány pomocí t-testu.

#### **b) vztahující se k familiální IgAN**

- Vyšetřili jsme čtyři rodiny s pravděpodobnou familiální IgAN. Jedinci byli klasifikováni jako postižení pokud měli bioticky potvrzenou IgAN, renální selhání nejasné etiologie, hematurii a/nebo proteinurii zachycené alespoň při třech vyšetřeních. Celkově bylo genotypováno a zahrnuto do genové vazebné analýzy 29 jedinců.

- Genomová DNA je nejprve naštěpena restrikcí enzymem XbaI, který vytváří čtyřnukleotidové kohezní konce. Na konce všech fragmentů, bez ohledu na jejich délku, je naligován univerzální adaptor. V dalším kroku je DNA amplifikována s využitím univerzálního primeru, jehož sekvence je komplementární k sekvenci adaptoru. PCR je optimalizována pro amplifikaci krátkých fragmentů o délce 250-1000 bp. Díky tomu je komplexita lidského genomu snížena až 50x. Amplifikovaná DNA je nespecificky naštěpena DNazou I na fragmenty s průměrnou délkou 50-200 bp. Pomocí terminální deoxynukleotidtransferázy jsou konce takto připravených fragmentů označeny deoxynukleotidem nesoucím biotin.

- Označená DNA je hybridizována na čip, který je následně v automatické promývací stanici Affymetrix Fluidics Station FS450 promyt a obarven s použitím streptavidinu konjugovaného s fluorescenční barvičkou, fykoeritinem. Čip je poté naskenován v Affymetrix GeneChip Scanneru 3000.

- Na čipu Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K Array Xba 142 2.0 je analyzováno více než 10000 jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism - SNP). Pro genotypování pomocí DNA čipu se využívá metoda alelicko-specifické hybridizace (Allele-specific hybridization - ASH). Na čipu jsou nasynthetizovány próby (dlouhé 25 bp) odpovídající pro každé SNP oběma možným alelám. Vyhodnocením signálu, získaného hybridizací označené genomové DNA, je možné určit genotypy jednotlivých SNP (AA, AB nebo BB). Kromě práb s přesně komplementární sekvencí k jednotlivým alelám („perfect match A, perfect match B“), jsou na čipu také próby pro určení specifity hybridizace. Ty mají porušenou komplementaritu na 13. pozici („mismatch A, mismatch B“). Genotyp každého SNP je určen na základě vyhodnocení intenzity signálu ze 40 různých práb.

- Algoritmus pro určení genotypu kontrétního SNP používá data získaná z hybridizací mnoha jedinců z různých populací (afroamerická, euroasijská, asijská). Z těchto tréninkových dat je vypočten medoid intenzit signálů pro každý genotyp AA, AB nebo BB a naměřené hodnoty analyzovaného vzorku jsou porovnávány s tímto tréninkovým datasetem.

### III. CÍLE STUDIE

#### a) Genové polymorfismy IgAN a PCHLAD

##### 1. Megsin

V naší studii jsme se snažili prokázat možný vliv dvou SNPs Megsinu, tzn. C2093T a C2180T, na progresi IgAN k renálnímu selhání.

Dále jsme si položili za cíl provést analýzu haplotypů genových polymorfismů Megsinu a klinických parametrů pacientů s IgAN. Tak jak bylo uvedeno výše, v posledních letech jsou studovány různé kandidátní genové polymorfismy podílející se na progresi nefropatií. Velká studie v Číně odhalila souvislost 2093C a 2180T alel ve 3' nepřekládané oblasti (UTR) Megsinu s IgAN (15). Navíc, rodinně vázaná studie ukázala, že 2093C a 2180T alely byly významně častěji přenášeny od heterozygotních rodičů k pacientům (15). Podobně, Xia et al. (16) zjistili, že 2093C-2180T haplotyp ve 3'UTR Megsinu byl spojen s rychlejší progresí IgAN.

## **2. ET-1**

Tři SNPs G198T, 3A/4A (-134delA) genu pro ET-1 a T-1370G v promotorové oblasti ET-1 genu, byly zkoumány v možné souvislosti s krevním tlakem a úrovní glomerulární filtrace. Homozygoti pro T alelu polymorfismu G198T a G alelu polymorfismu T-1370G vykazovali sníženou glomerulární filtraci, nižší clearance kreatininu a obezitu ve srovnání s ostatními genotypy (4). Záměna alely G na T v exonu 5, která způsobí náhradu Lysinu (Lys) za Arginin (Asn) v kodonu 198 byla spojena pozitivní vazbou s vysokým krevním tlakem u obézních lidí. G/T záměny aminokyselin mohou postihnout tvorbu preproendotelinu a ovlivnit syntézu ET-1. U homozygotů s 4A alelou (inzercí adenosinu) u 3A/4A polymorfismu v 5' nepřekládané oblasti ET-1 genu byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese proteinu ET-1 zásluhou zvýšené mRNA stability (5). Navíc hladina ET-1 v plazmě byla signifikantně vyšší u 3A/4A hypertenzních jedinců než u homozygotů s 3A alelou.

Na základě výše uvedených skutečností, kdy genetické faktory,

pravděpodobně různými mechanismy, ovlivňují tvorbu a sérové hladiny ET-1, jsme se rozhodli vyšetřit možný vliv SNP ET-1 (tzn. G198T, T-1370G a 3A/4A) na progresi IgAN k renálnímu selhání.

### **3. ET-A receptor (EDNRA)**

Zkoumání předpokládaných rizikových faktorů, mezi kterými patří jistě k jednomu z nejdůležitějších hypertenze, může do budoucna přispět k nalezení nových terapeutických postupů a zpomalení progresu PCHLAD k renálnímu selhání. V cystách, glomerulech i renálních artériích středního kalibru byla nalezena zvýšená exprese EDNRA. Spojení mezi T alelou C1363T genového polymorfismu pro EDNRA a zvýšeným krevním tlakem (pulsatilní složkou) bylo stanoveno ve studii ECTIM (7). Pulsový tlak měří pulsatilní složku krevního tlaku a několik studií prokázalo, že pulsový tlak může být nezávislým prediktorem zvýšeného kardiovaskulárního rizika (17). Je však třeba uvést, že v jiné studii Benjafield et al. (18) zjistili slabou vazbu C alely C1363T varianty v exonu 8 EDNRA s hypertenzí. U hypertenzních pacientů byla potvrzena zvýšená exprese EDNRA v cévní stěně. C1363T varianta je umístěna ve 3' nepřekládané oblasti. Tento úsek může obsahovat sekvence, které postihují stabilitu mRNA. C1363T varianta tedy může pozměnit expresi EDNRA a počet vytvořených receptorů.

Naším cílem bylo vyšetřit vliv C1363T polymorfismu v exonu 8 genu pro EDNRA u pacientů s PCHLAD a IgAN.

#### **4. ECE-1**

Dále jsme se rozhodli prokázat vliv C-338A genového polymorfismu ECE-1b na progresi renální funkce u pacientů s PCHLAD. V některých studiích (8,9) bylo potvrzeno častější zastoupení A alely u žen s hypertenzí, která představuje významný rizikový faktor progresu renální insuficience. Předpokládá se, že v přítomnosti A alely je vyšší hladina ET-1 způsobena zvýšením koncentrace izoformy ECE-1b. ECE-1b reguluje extracelulární aktivitu ECE-1 díky heterodimerizaci s ostatními izoformami ECE-1 a přemístění izoformem ECE do intracelulárních kompartmentů. ET-1 se podílí nejen na vzniku hypertenze, ale pravděpodobně i přímo na cystogenezi. ET-1 transgenní myši rozvinuly renální cysty, intersticiální fibrózu a sklerózu glomerulů.

#### **5. e-NOS**

U pacientů s PCHLAD byla pozorována porucha endoteliální funkce a poškození vazodilatace způsobené sníženou tvorbou NO eNOS (11). Zjišťovali jsme vliv polymorfismu eNOS kyseliny glutamové versus kyseliny asparagové (Glu298Asp) v exonu 7 chromosomu 7 na progresi PCHLAD. U nosičů Asp298 varianty byla popsána nižší hladina NO v plazmě, která se nejspíše uplatňuje v patogenezi arteriální hypertenze (10).

#### **6. a 7. ACE a $\alpha$ -adducin**

Dále jsme vyšetřovali I/D polymorfismus ACE genu a Gly/Trp polymorfismus genu pro  $\alpha$ -adducin. Renin-angiotenzinový systém (RAS) se uplatňuje v patogenezi hypertenze, která představuje jeden z



nejdůležitějších negativních prognostických faktorů u renálních onemocnění. RAS hraje důležitou úlohu v renálním transportu sodíku, regulaci extracelulárního objemu, způsobuje vazokonstrikci a stimulaci sympatického nervového systému. Tubulocystický epitel má schopnost syntetizovat renin. U nositelů D alely byla popsána vyšší hladina ACE a následně zvýšená konverze angiotenzinu I na angiotenzin II (19), který jako růstový faktor může podporovat růst cyst a zvýšením intersticiální fibrózy i vaskulární sklerózy se podílí na progresi renální funkce u cystických ledvin.

Adducin, membránový protein, interaguje s aktinovým cytoskeletem a ovlivňuje sodíko-draslíkovou pumpu v membráně buněk proximálního tubulu ledvin. Zvýšená aktivita Na-K-ATPázy byla popsána u nositelů Trp 460 alely s následnou vyšší tubulární resorpcí sodíku, která se uplatňuje v patogenezi nízkoreninové hypertenze (12).

### **b) Familiální IgAN**

Doposud nebyly přesvědčivě prokázány kandidátní geny zodpovědné za familiální IgAN. Genové vazebné analýzy familiálních forem IgAN ukázaly možné lokusy na chromosomech 6q22-23, 2q36, 3p24-23, 4q26-31 a 17q12-22 (2). Cílem naší studie bylo prokázat u čtyř rodin s předpokládanou familiální IgAN kandidátní gen zodpovědný za vznik onemocnění.

## IV. VÝSLEDKY, DISKUSE

### a) Genové polymorfismy IgAN a PCHLAD

#### 1. MEGSIN

Vyšetřili jsme vazbu dvou SNPs Megsinu (C2093T, C2180T) s progresí IgAN k renálnímu selhání. Srovnali jsme frekvence různých genotypů mezi IgAN stabilními a progresivními skupinami. Rozložení genotypů Megsinu neukázalo signifikantní rozdíly mezi IgAN skupinami s normální renální funkcí, progresivní renální insuficiencí a kontrolní skupinou (Tab. 1, 2).

Spočítali jsme hodnotu vazebné nerovnováhy mezi analyzovanými polymorfismy Megsinu a haplotypy byly rekonstruovány pomocí metody maximální pravděpodobnosti. Žádný ze studovaných haplotypů nebyl signifikantně spojený s IgAN (Tab. 4), ale TT haplotyp (definovaný jako alely T-2093, T-2180) se podstatně více vyskytoval u pacientů s IgAN a normální renální funkcí (Tab. 3,  $p=0,025$ ). Nakonec jsme porovnali klinické údaje mezi pacienty, u nichž onemocnění progredovalo v průběhu sledování, a pacienty se stabilní renální funkcí (u dvou třetin nemocných z celkového počtu). Pacienti v progresivní skupině se vyznačovali signifikantně vyšší hladinou 24 hod proteinurie ( $3,53 \pm 2,80$  vs  $2,06 \pm 2,06$ ,  $p=0,042$ ; Tab. 5), diastolickým krevním tlakem ( $92,89 \pm 15,66$  vs  $84,93 \pm 10,43$ ,  $p=0,047$ ; Tab. 5) a na pomezí významnosti i systolickým krevním tlakem ( $150,79 \pm 32,88$  vs  $135,21 \pm 14,88$ ,  $p=0,058$ ; Tab. 5). V ostatních klinických parametrech nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi těmito dvěma skupinami.

**Tabulka 1.** Genotypové frekvence C2093T genového polymorfismu  
Megsinu u pacientů s IgAN (stabilní a progresivní skupiny)

Skupiny	T/T	T/C	C/C
Stabilní (%;N=84)	27,4	52,4	20,2
Progresivní (%;N=113)	29,2	45,1	25,7
Kontroly (%;N=61)	26,2	57,4	16,4

**Tabulka 2.** Genotypové frekvence C2180T genového polymorfismu  
Megsinu u pacientů s IgAN (stabilní a progresivní skupiny)

Skupiny	T/T	T/C	C/C
Stabilní (%;N=84)	27,4	48,8	23,8
Progresivní (%;N=113)	26,8	44,6	28,6
Kontroly (%;N=61)	18	54,1	27,9

**Tabulka 3.** Haplotypové frekvence u stabilní skupiny pacientů s IgAN a u kontrolní skupiny

Skupiny	2093T-2180C	2093C-2180T	2093T-2180T*
IgAN–stabilní skupina(%)	47,6	45,8	6
Kontrolní skupina(%)	54,1	44,2	0,9
p-value	0,2763	0,7901	0,0246

**Tabulka 4.** Haplotypové frekvence u stabilní a progresivní skupiny  
pacientů s IgAN a u kontrolní skupiny

Skupiny	2093T- 2180C	2093C- 2180T	2093T- 2180T	2093C- 2180C
IgAN pacienti (%)	48,7	46,2	3,9	1,3
Kontroly (%)	54,1	44,2	0,9	0,9
p-value	0,2982	0,7072	0,097	0,696

**Tabulka 5.** Klinické údaje u stabilní a progresivní skupiny pacientů s IgAN\*

Klinické údaje	Stabilní skupina	Progresivní skupina	p-value
Doba sledování (měsíce)	56,97±39,95	55,68±47,90	NS
Věk (roky)	38,74±13,79	40,05±15,38	NS
S-Cr (μmol/l)	150,25±147,42	198,16±119,18	<b>0,018 (ln)</b>
24h PU (g/d)	2,06±2,06	3,53±2,80	<b>0,042</b>
Systolický TK (mmHg)	135,21±14,88	150,79±32,88	0,058
Diastolický TK (mmHg)	84,93±10,43	92,89±15,66	<b>0,047</b>
S-Chol (mmol/l)	5,59±1,35	5,44±1,90	NS
S-Tg (mmol/l)	1,95±1,00	2,22±2,39	NS
S-KM (μmol/l)	368,09±96,08	384,56±86,77	NS

\* Hodnoty uvedené jako průměr ± SD. S-Cr, kreatinin v séru; 24h PU, 24h proteinurie; TK, krevní tlak; S-Chol, cholesterol; S-Tg, triglyceridy; S-KM, kyselina močová, ln – logaritmová transformace

Velká studie v čínské populaci prokázala, že 2093C a 2180T alely ve 3' UTR megsinového genu jsou spojeny s větší náchylností k IgAN (15). Navíc, Xia et al. (16) zjistili, že 2093C-2180T haplotyp ve 3' UTR genu pro Megsin byl spojen s rychlejší progresí IgAN. Naše výsledky nepotvrdily vliv C2093T, C2180T genových polymorfismů Megsinu na progresi IgAN u českých pacientů. Zřetelný efekt těchto polymorfismů nebyl potvrzen ani v jedno-genové či v haplotypové analýze. Haplotypová rekonstrukce nicméně odhalila, že TT haplotyp (definovaný jako T-2093, T-2180) by mohl mít protektivní úlohu v progresi pacientů s IgAN; TT haplotyp se

totiž signifikantně častěji vyskytoval u stabilní skupiny pacientů s IgAN než u progresivní skupiny (Tab.3). Protektivní spojení TT haplotypu s chronickými glomerulonefritidami, zejména IgAN, by mohlo být vysvětleno sdílenou interakcí obou polymorfismů MEGSINU. U multifaktoriálních onemocnění nemusí SNP změnit expresi nebo funkci specifických proteinů tak intenzivně, aby vytvořily klinicky významné fenotypy. Teprve spojený vliv obou MEGSINOVÝCH polymorfismů může definitivně nastolit protektivní vliv na onemocnění. V naší studii jsme prokázali, že pacienti v progresivní skupině s horší renální funkcí měli vyšší 24 hod proteinurii a krevní tlak oproti stabilní skupině pacientů s normální renální funkcí (tab. 5).

## **2. ENDOTELIN**

Pacienti s IgAN a kontrolní skupina zdravých jedinců byli genotypováni na G198T, T-1370G a 3A/4A ET-1 polymorfismy.

### **Tabulka 6. Rozmístění genotypů a alel G198T, T-1370G a 3A/4A polymorfismů ET-1 u pacientů s IgAN a kontrol**

Frekvence genotypů a alel byly shodné s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. Alelové a genotypové frekvence všech tří ET-1 polymorfismů u IgAN pacientů se nelišily významně od kontrol. Rovněž nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v rozmístění genotypů a alel u analyzovaných polymorfismů podle pohlaví.

ET-1 genotypy, alely	Pacienti s IgAN			KONTROLY		
	muži N (%)	ženy N (%)	všichni pacienti N (%)	muži N (%)	ženy N (%)	všichni N (%)
<b>G198T</b>						
GG	58(66,67)	23(65,72)	81 (66,39)	44 (68,75)	44 (64,71)	88 (66,67)
GT	27 (31,03)	11 (31,43)	38 (31,15)	18 (28,13)	24 (35,29)	42 (31,82)
TT	2 (2,30)	1 (2,86)	3 (2,46)	2 (3,13)	0	2 (1,52)
G/T			(82/18,1)			(82,6/17,43)
<b>I/D</b>						
3A3A	45(51,72)	11(31,43)	56 (45,90)	31 (48,44)	27(39,71)	58 (43,94)
3A4A	38(43,68)	19(54,29)	57 (46,72)	25 (39,06)	34 (50)	59 (44,70)
4A4A	4 (4,60)	5 (14,29)	9 (7,38)	8 (12,5)	7 (10,29)	15 (11,36)
3A/4A			(69,3/30,7)			(66,29/33,71)
<b>ET-P</b>						
TT	59(68,61)	27 (75)	86 (70,49)	50 (78,13)	51 (75)	101 (76,51)
GT	25(29,07)	8 (22,22)	33 (27,05)	13 (20,31)	17 (25)	30 (22,72)
GG	2 (2,33)	1 (2,78)	3 (2,46)	1 (1,56)	0	1 (0,76)
T/G			(84/16)			(87,9/12,12)

V závislosti na úrovni renálních funkcí byli pacienti rozděleni do dvou podskupin (skupin pacientů s normální glomerulární filtrací a skupin pacientů s renálním selháním). Srovnali jsme frekvence různých genotypů mezi IgAN skupinami s normální renální funkcí a s renálním selháním. Rozmístění ET-1 genotypů nevykazovalo rozdíly mezi skupinami IgAN pacientů s normální renální funkcí, s renálním selháním a kontrolní skupinou. Rozložení ET-1 genotypů se tedy nelišilo mezi pacienty s IgAN s normální renální funkcí, s renálním selháním a kontrolní skupinou zdravých jedinců (Tab. 7).

**Tabulka 7.** Rozmístění genotypů G198T, T-1370G a 3A/4A polymorfismů ET-1 u pacientů s IgAN s normální renální funkcí, s renálním selháním a kontrolní skupinou

ET-1 genotypy	Pacienti se stabilním renálním onemocněním (SD) N (%)	Pacienti s ESRD N (%)	Kontroly N (%)
<b>G198T</b>			
GG	58 (63,74)	23 (74,19)	88 (66,67)
GT	30 (32,97)	8 (25,81)	42 (31,82)
TT	3 (3,3)	0	2 (1,52)
<b>I/D</b>			
3A3A	38 (42,22)	18 (56,25)	58 (43,94)
3A4A	45 (50)	12 (37,5)	59 (44,70)
4A4A	7 (7,69)	2 (6,25)	15 (11,36)
<b>ET-P</b>			
TT	62 (68,13)	24 (77,42)	101 (76,51)
GT	26 (28,57)	7 (22,58)	30 (22,72)
GG	3 (3,3)	0	1 (0,76)

Za předpokládané vazebné rovnováhy mezi analyzovanými polymorfismy ET-1 byly vytvořeny haplotypy pomocí “Maximum Likelihood Method“ (Haploview, verze 3,2 2005). Haplotyp GG4A (definovaný jako G-198, G-1370 a 4A alely) byl signifikantně spojený s IgAN ( $p=0,0056$ ) (Tab. 8).

**Tabulka 8.** Rozmístění haplotypů G198T, 3A/4A a T-1370G polymorfismů ET-1 u pacientů s IgAN a kontrol (x<sup>2</sup> – Chi kvadrát test, p-value)

Haplotypy	Pacienti s IgAN	Kontroly	x <sup>2</sup>	p value
TGA	0,494	0,525	0,53	0,4664
TGC	0,241	0,295	2,029	0,1543
GTA	0,078	0,083	0,037	0,848
TTA	0,095	0,049	4,289	0,384
GTC	0,024	0,032	0,324	0,5694
<b>GG4A</b>	0,044	0,006	7,69	0,0056
TTC	0,023	0,01	1,497	0,2212

V předkládané studii jsme vyloučili vliv G198T, 3A/4A a T-1370G polymorfismů endotelinového genu na progresi IgAN u českých pacientů v jedno-genové analýze. Teprve haplotypová rekonstrukce odhalila, že GG4A haplotyp (definovaný jako G-198,G-1370 a 4A alely) byl signifikantně více zastoupen u pacientů s IgAN. Jedná se však o minoritní alely všech polymorfismů, jejich význam je diskutabilní.

U multifaktoriálních onemocnění, včetně IgAN, SNP nemusí změnit expresi proteinů tak významně, aby způsobily patologický fenotyp. Ačkoli přesné patogenetické mechanismy ET-1 budou ještě vyžadovat další objasnění, naše studie naznačuje, že pro definování rizika progresu IgAN



by mohla být více informativní haplotypová rekonstrukce ET-1 genových polymorfismů než vyšetřování SNP.

V literatuře dosud existují jen omezené údaje týkající se vazby třech ET-1 SNP G198T, T-1370G a 3A/4A na progresi IgAN k renálnímu selhání. Jak bylo již výše zmíněno, naše výsledky naznačují možný vliv GG4A haplotypu na progresi IgAN. Nepochybně je nezbytné vyšetřit vliv ET-1 polymorfismu na progresi IgAN rozsáhlejšími studiemi, které budou zahrnovat větší počty pacientů různého etnika.

### **3. Endotelinový receptor**

Jak bylo již výše uvedeno, v posledních letech byl studován možný vliv genu pro ET-1 na progresi renálních onemocnění (4, 5). Vliv polymorfismu EDNRA dosud nebyl analyzován. Předpokládali jsme, že silný vazokonstrikční účinek ET-1, zprostředkovaný ET-A receptorem a vedoucí ke zhoršení renální perfúze i tubulointersticiálnímu poškození, by mohl přispívat ke zhoršení renální funkce u pacientů s IgAN.

V naší studii se u pacientů s IgAN rozložení C1363T polymorfismu EDNRA nelišilo mezi pomalými a rychlými progresory (Tab. 9). 75% pacientů užívalo ACEI nebo AT1 blokátory, proto nebyl stanoven vztah mezi arteriální hypertenzí a různými genotypy.

Předpokládaný vliv C1363T genového polymorfismu v exonu 8 EDNRA na progresi IgAN byl vyloučen.

U pacientů s PCHLAD se rovněž rozložení C/T polymorfismu EDNRA významně nelišilo mezi pomalými a rychlými progresory (Tab. 10). Frekvence C alely byla jen nesignifikantně zvýšená u pomalých progresorů (0,6 ve srovnání s 0,52 u rychlých progresorů).

Srovnání věku renálního selhání ukázalo, že CC homozygotní ženy s PCHLAD dosáhly renálního selhání signifikantně později než CT heterozygotní ženy (t-test,  $p=0,018$ ) (Tab. 11). U CC homozygotních žen s PCHLAD jsme tedy prokázali o čtyři roky pozdější nástup renálního selhání než u CT heterozygotních žen. U mužů jsme nezjistili vliv tohoto polymorfismu na progresi PCHLAD. Antioxidační účinek estrogenů a pravděpodobně nižší příjem sodíku nepochybně zlepšují klinický průběh většiny renálních onemocnění u žen. Negativní účinek T alely tak mohl být více vyjádřen u žen se silnějšími antioxidačními mechanismy. T alela spojená s vyšším pulzovým tlakem tak může mít negativní vliv na progresi renálních onemocnění zejména u žen s nižším kardiovaskulárním rizikem.

Vyloučili jsme vliv C1363T polymorfismu EDNRA na progresi IgAN a PCHLAD u mužů. CC genotyp tohoto polymorfismu se zdá být prediktorem příznivého klinického průběhu u žen s PCHLAD.

**Tab. 9.** Rozložení C/T polymorfismu EDNRA u pacientů s IgAN

Skupiny	CC	TC	TT
IgAN-rychlí progresoři	32,9% (26/79)	49,4% (39/79)	17,7% (14/79)
IgAN-pomalí progresoři	28,4% (21/74)	56,8% (42/74)	14,8% (11/74)
Kontrolní skupina	29,0% (29/100)	60,0% (60/100)	11,0% (11/100)

**Tab. 10.** Rozložení C/T polymorfismu EDNRA u pacientů s PCHLAD

Skupiny	CC	TC	TT
PCHLAD-rychlí progresoři	18,4% (9/49)	65,3% (32/49)	16,3% (8/49)
PCHLAD-pomalí progresoři	31,9% (15/47)	57,4% (27/47)	10,7% (5/47)
PCHLAD-renální selhání 45-63 roky	20,6% (20/97)	57,7% (56/97)	21,7% (21/97)
Kontrolní skupina	29% (29/100)	60 % (60/100)	11% (11/100)

**Tab. 11.** Věk renálního selhání u pacientů s PCHLAD podle různých genotypů

Věk renálního selhání u různých skupin	CC	CT	TT
Věk renálního selhání u všech PCHLAD (roky)	57,4 ± 8,1	53,0 ± 9,1	54,5 ± 6,4
Věk renálního selhání u žen (roky)	52,3 ± 11,6	53,2 ± 8,9	51,4 ± 9,9
Věk renálního selhání u mužů (roky)	55,4 ± 10,0	53,1 ± 9,0	53,1 ± 8,2

#### 4. ECE-1

V naší studii jsme vyloučili vliv ECE-1b C-338A polymorfismu na progresi PCHLAD k renálnímu selhání. Neprokázali jsme významné rozdíly mezi skupinami pomalých, rychlých progresorů, pacientů s renálním selháním mezi 45-63 lety a kontrolní skupinou ( $\chi^2 = 4,89$ ,  $p > 0,1$ ; Tab. 12).

AA homozygotní jedinci se vyskytovali méně u pomalých progresorů ve srovnání s ostatními skupinami s PCHLAD. U AA homozygotů byla

pozorována tendence k nižšímu věku, kdy dosáhli renálního selhání ve srovnání s dalšími genotypy.

A alela C-388A ECE-1b polymorfismu vede ke zvýšené koncentraci ECE-1b a následně ke zvýšené hladině ET-1. U pacientů s PCHLAD se aktivovaný ET-1 zřejmě podílí na zhoršení renální perfúze a na cystogenezi. Ischémie ledvin tak přispívá k tubulointersticiálnímu poškození a další ztrátě renální funkce.

Předpokládali jsme negativní vliv vyšších hladin ET-1 v plazmě a v cystické tekutině na progresi pacientů s PCHLAD. Ve 2 recentních studiích byl u AA homozygotů nebo nosičů A alely popsán vyšší krevní tlak jako negativní prognostický faktor. Funalot et al. (9) potvrdili vyšší krevní tlak u AA homozygotních žen ve francouzské populaci, což tak představuje negativní vliv této recesivní genové varianty na úroveň krevního tlaku. Funke-Kaiser et al. (8) potvrdili negativní účinek u ženských nosiček A alely (u AA a u CA haplotypů) ve vybrané německé hypertenzní populaci. Jsme si však vědomi, že existují non-ECE ET-1 tvořící enzymy (chymázy a neutrální endopeptidázy), a že koncentrace ET-1 degradujících enzymů se tak může lišit. Navíc, ECE-1b také hydrolyzuje s nižší účinností další peptidy jako je bradykinin, angiotenzin I a substanci P. Musíme tedy vzít v úvahu, že aktivita ECE může být ovlivněna dalšími faktory.

Výsledky naší studie mohly být zkráceny nižším počtem pacientů. Současně jsme nebyli schopni zhodnotit další možné spolupodílející se faktory jako obezitu, kouření a hypertenzi. Funalot et al. (9) spekulovali o androgen-stimulující aktivitě ET-1 vedoucí k nedostatečné účinnosti ECE variant u mužů.

Vyloučili jsme signifikantní vliv ECE-1b polymorfismu na progresi PCHLAD. Potvrdili jsme však mírnou tendenci k rychlejšímu poklesu renální funkce u AA homozygotních jedinců ( $\chi^2=2,14$ ,  $p = 0,1$ ).

**Tab. 12.** Rozmístění genotypů C-338A ECE-1b u pacientů s PCHLAD

Skupiny	CC	AC	AA
Pomalí progresoři	51,1% (24/47)	46,8% (22/47)	2,1% (1/47)
Rychlí progresoři	50,7% (36/71)	40,8% (29/71)	8,5% (6/71)
Renální selhání mezi 45-63 lety	59,8% (49/82)	31,7% (26/82)	8,5% (7/82)
Kontrolní skupina	53,75%(86/160)	40,0% (64/160)	6,25%(10/160)

## 5. eNOS

Při vyšetřování Glu298Asp polymorfismu eNOS jsme u nemocných s PCHLAD zjistili významně častější výskyt Glu298Asp a Asp298Asp genotypů u rychlých progresorů a u skupiny s renálním selháním mezi 40-63 lety ve srovnání s pomalými progresory a kontrolní skupinou (Chi-kvadrát test,  $p<0,05$ ; Tab. 13). Porovnáním věku dosaženého renálního selhání jsme u mužů s PCHLAD nezaznamenali signifikantně významné rozdíly: Asp/Asp- $54,9\pm 10,4$  roků, Asp/Glu- $50,2\pm 9,4$ , Glu/Glu- $51,0\pm 10,4$  roky. U homozygotních Asp/Asp žen jsme však potvrdili časnější začátek renálního selhání ( $49,2\pm 5,6$  let) ve srovnání s heterozygotními ženami ( $53,3\pm 7,2$  lety) a s Glu/Glu genotypy ( $54,8\pm 9,7$  lety) (t-test,  $p<0,05$ ).

Estrogeny regulují tvorbu NO cestou eNOS (133). U mužů a u žen v období menopauzy byla prokázána snížená aktivita NO. Je třeba vzít v úvahu, že výsledky zřejmě mohou být do určité míry ovlivněny omezeným počtem homozygotů s Asp variantou. Nicméně aktivita NO u premenopauzálních žen by mohla být více ovlivněna změnami aktivity eNOS s ohledem na různé eNOS genotypy. Různé biochemické děje mohou pozměnit působení NO, podpořit tvorbu produktů oxidativního stresu, které pak mohou přispět k proteinové a DNA oxidaci a stimulovat buněčnou apoptózu. Zvýšené hladiny NO u premenopauzálních žen tak mohou mít negativní účinek ovlivněný mnoha neznámými exogenními faktory.

Potvrdili jsme tedy negativní prognostický vliv u nosičů Asp varianty polymorfismu eNOS na progresi PCHLAD k renálnímu selhání. Toto zjištění je i v souladu s jinými autory (20). U Asp homozygotních žen jsme prokázali o pět let nižší průměrný věk renálního selhání v porovnání s Glu homozygotními ženami.

**Tab. 13.** Rozmístění genotypů Glu298Asp eNOS u pacientů s PCHLAD

Skupiny	Asp/Asp	Asp/Glu	Glu/Glu
Pomalí progresoři	8,80%	24,20%	67,00%
Rychlí progresoři	9,60%	39,70%	50,70%
Renální selhání mezi 45-63 lety	11,30%	41,50%	47,20%
Kontrolní skupina	8,00%	32,00%	60,00%

### 6. a 7. ACE a $\alpha$ -adducin

Porovnáním jednotlivých genotypů  $\alpha$ -adducinu a ACE jsme nezjistili signifikantně významné rozdíly mezi pomalými, rychlými progresory, pacienty s PCHLAD s renálním selháním do 63 let věku a kontrolní skupinou. Polymorfismy genů pro ACE a  $\alpha$ -adducin nehrají signifikantní roli v progresi PCHLAD k renálnímu selhání, ale zjistili jsme signifikantně významný sklon k lepší prognóze u nosičů s Trp alelou a I/I genotypem v porovnání s Gly/Gly homozygotními jedinci. U I/I homozygotů a zároveň nositelů Trp alely (heterozygoti Trp/Gly + homozygoti Trp/Trp) jsme pozorovali tendenci k pozdějšímu nástupu renálního selhání oproti Gly/Gly homozygotům. Pravděpodobně nižší hladina reninu u I/I homozygotů je umocněna nižší hladinou reninu u nositelů Trp alely a uplatňuje se tak v patogenezi hypertenze i ve vlastní cystogenezi. Ve studii Nicod et al. (21) byl popsán synergistický efekt ACE a adducin polymorfismu, kdy nízká hladina reninu u II homozygotů je zřejmě kompenzována vyšší hladinou reninu u Gly/Gly homozygotů genu pro adducin s vyšší resorpcí sodíku, což může následně ovlivňovat progresi renální insuficience.

**Tab. 14.** Trp/Gly genotypy  $\alpha$ -adducin genového polymorfismu mezi pacienty s PCHLAD a kontrolní skupinou

Skupiny	Gly/Gly	Trp/Gly	Trp/Trp
Renální selhání do 63 let	149/220 (67,7%)	67/220 (30,5%)	4/220 (1,8%)
Pomalí progresoři	71/96 (74,0%)	22/96 (22,9%)	3/96 (3,1%)
Rychlí progresoři	15/20 (75,0%)	5/20 (25,0%)	0
Kontrolní skupina	141/200 (70,5%)	54/200 (27,0%)	5/200 (2,5%)

**Tab. 15.** I/D genotypy ACE genového polymorfismu mezi pacienty s PCHLAD a kontrolní skupinou

Skupiny	I/I	I/D	D/D
Renální selhání do 63 let	52/220 (23,6%)	113/220 (51,4%)	55/220 (25,0%)
Pomalí progresoři	26/96 (27,1%)	43/96 (44,8%)	27/96 (28,1%)
Rychlí progresoři	4/20 (20,0%)	11/20 (55,0%)	5/20 (25,0%)
Kontrolní skupina	46/200 (24,0%)	104/200 (51,0%)	50/200 (25,0%)

### ***b) Familiální IgAN***

Pro celogenomovou vazebnou analýzu byl použit program Merlin 1.1.1 „using the affected only strategy“ (22, 23) a stejný model jako byl použit při analýze IGAN1 lokusu (2), předpokládající, že IgAN je autozomálně dominantní onemocnění s „disease allele frequency of 0.001, phenocopy rate of 0.01 and estimated penetrance of 75“. Takto byly nalezeny tři lokusy s LOD skóre větším než 1 (Tab. 16).

**Tab. 16.**

Chromosom	Oblast [bp]	Maximální LOD skóre
5	125.047.330 - 126.199.059	1,99
10	71.406.821- 79.919.011	1,18
13	98,581,669 - 99,923,832	2,28



Pomocí genové vazebné analýzy (Merlin 1.1.1.) čtyř rodin s IgAN jsme zjistili novou vazbu IgAN na chromosom 13q 32.3 při autozomálně dominantním přenosu s předpokládanou penetrancí 75 % s LOD skóre 2,28. Tento gen doposud v literatuře nebyl popsán. Naše výsledky tak potvrzují značnou genetickou heterogenitu u pacientů s IgAN. Zjištění genetického podkladu familiálních forem IgAN má mimořádný význam pro možné pochopení patogeneze tohoto onemocnění a má samozřejmě úzký vztah k námi studovaným genovým polymorfismům.

## V. LITERATURA

1. Mestecky J., Novak J., Julian B. A.: Pathogenic potential of galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. *Nephrology* 7: S92–S99, 2002.
2. Gharavi A. G., Yan Y., Scolari F.: IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23. *Nat. Genet.* 26: 354–357, 2000.
3. Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Toyoda M, Wada T, Kurokava K et al. Specific tissue distribution of Megsin, a novel serpin, in the glomerulus and its up-regulation in IgA nephropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 2001, 1098-1106.
4. Pinto-Sietsma SJ, Hermann SM, Schmidt-Peterson K, Niu T. Role of the endothelin-1 gene locus for renal impairment in the general nondiabetic population. *J Am Soc Nephrol* 14, 2003, 2596–2602.
5. Tahala CH, Kamide K, Takiuchi S, Kawano Y, Miyata T. Evaluation of the Lys198Asn and -134delA genetic polymorphisms of the endothelin-1 gene. *Hypertens Res* 27, 2004, 367–371.
6. Giusti R, Neri M, Angelini D. Plasma concentration of endothelin and

arterial pressure in patients with APDKD. *Contrib Nephrol* 115, 1995, 118-121.

7. Nicaud V, Poirier O, Behague I. Polymorphisms of the endothelin-A and B receptor genes in relation to blood pressure and myocardial infarction: the Etude Cas-Temoins sur l' Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Am J Hypertens* 12, 1999, 304-310.

8. Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Kopke K, Herrmann SM, Pfeifer J. Differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter affects blood pressure regulation. *Hum Mol Genet* 12, 423-433, 2003.

9. Funalot B, Courbon D, Brousseau T, Poirier O, Berr C, Cambien F. Genes encoding endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 interact to influence blood pressure in women: the EVA study. *J Hypertens* 22, 2004, 739-743.

10. Qiu C, Muchant D, Beierwaltes WH, Racusen L, Baylis C. Evolution of chronic nitric oxide inhibition hypertension: relationship to renal function. *Hypertension* 13, 1998, 21.

11. Wang D, Iversen J, Strandgaard S. Contractility and endothelium-dependent relaxation of small resistance vessels is impaired in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 11, 2000, 1371-1376.

12. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, Glorioso N, Lanzani C, Manunta P, Righetti M, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G. Polymorphism of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 349, 1997, 1353-1357.

13. Navis G, Van der Kleij FGH, De zeeuw D, De Jong PE. Angiotensin-

converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. *J Mol med* 77, 1999, 781-91.

14. Van Dijk MA, Breuning MH, Peters DJM, Chang PC. The ACE insertion/deletion polymorphism had no influence on progression of renal function loss in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 15, 2000, 836-39.

15. Li Y, DU Y, Li C, Guo H, Leung J CK, Lam MF, Yang N, Huang F, Chen Y, Fang J, Maxwell PH, Lai KN, Wang Y. Family-based association study showing that Immunoglobulin A nephropathy is associated with the polymorphisms 2093C and 2180T in the 3'untranslated region of the Megsin gene. *J Am Soc Nephrol* 15: 1739-1743, 2004).

16. Xia Y, Li Y, Du Y, Yang N, Li C, Leung JCK, Lam MF, Huang W, Chen S, Maxwell PH, Lai KN, Wang Y. Association of Megsin 2093C-2180T haplotype at the 3'untranslated region with disease severity and progression of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* (2006) 21: 1570-1574.

17. Fang J, Madhavan S, Cohen H, Alderman MH. Measures of blood pressure and myocardial infarction in treated hypertensive patients. *J Hypertens* 13, 1995, 413-419.

18. Benjafeld AV, Katyk K, Morris BJ. Association of EDNRA, but not WNK4 of FKBP1B, polymorphisms with essential hypertension. *Clin Genet* 64, 2003, 433-438.

19. Kuida S, Beier DR. Genetic localization of interacting modifiers affecting severity in a murine model of polycystic kidney disease. *Genome Res* 10, 2000, 49-54.

20. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davilla S, Robino C, El-Khattabi

- O, Mourad M, Horie S, Feron O, Balligand JL, Wattiez R, Pirson Y, Chauveau D, Lens XM, Devuyst O. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 11 (3), 2002, 229-241.
21. Nicod J, Frey BM, Frey FJ, Ferrari P. Role of the  $\alpha$ -adducin genotype on renal disease progression. *Kidney Int* 61, 2002, 1270-75.
22. Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR: Merlin. Rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30,2002, 97–101.
23. Abecasis GR, Wigginton JE. Handling marker-marker linkage disequilibrium: Pedigree analysis with clustered markers. *Am J Hum Genet* 77, 2005,754–767.

## VI. PUBLIKACE AUTORA VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU PRÁCE

1. The influence of three endothelin-1 polymorphisms on the progression of IgA nephropathy. Maixnerová D, Merta M, Reiterova J, Štekrová J, Ryšavá R, Obeidová H, Viklický O, Potměšil P, Tesař V. *Folia Biol.* 2007;53(1):27-32. **IF**.
2. The influence of two megsin polymorphisms on the progression of IgA nephropathy. Maixnerová D, Merta M, Reiterová J, Štekrová J, Ryšavá R, Obeidová H, Viklický O, Tesař V. *Folia Biologica* 2008, Jan., **IF**.
3. Does electron microscopy change the view of the diagnosis of IgA nephropathy? Maixnerová D, Honsova E, Merta M, Reiterova J, Rysava R, Tesař V, Obeidova H, Motan J. *Prague Med Rep.* 2005;106(3):283-90.
4. Pathogenetic aspects and gene polymorphisms of IgA nephropathy. Maixnerová D, Reiterová J, Merta M, Štekrová J, Ryšavá R, Obeidová H, Tesař V. *Prague Medical Report/Vol. 107 /2006) No.II*.

5. The influence of three endothelin-1 polymorphisms on the progression of IgA nephropathy. Maixnerová D, Reiterová J, Merta M, Štekrová J, Tesar V. Cardioneurology No. 10, Ed. Bios. 2005.

6. The influence of endothelin-A receptor gene polymorphism on the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease and IgA nephropathy. Reiterová J, Merta M, Štekrová J, Maixnerová D, Obeidová H, Kebrdlová V, Viklický O, Tesar V. Folia Biol (Praha).2007;53 (4):134-7, **IF**.

7. The influence of the endothelin-converting enzyme-1 gene polymorphism on the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. Reiterova J, Merta M, Stekrova J, Tesar V, Kmentova D, Rihova Z, Rysava R, Viklicky O. Ren Fail. 2006;28(1):21-4, **IF**.

8. The influence of Endothelin-1 Gene Polymorphisms on the Progression of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Reiterova J, Merta M, Stekrova J, Cabartova Z, Cibulka R, Maixnerova D, Rysava R, Rihova Z, Tesar V, Motan J. Kidney Blood Press Res. 2006 Aug 30;29(3):182-188. **IF**.

9. The influence of G-protein beta3-subunit gene and endothelial nitric oxide synthase gene in exon 7 polymorphisms on progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. Reiterova J, Merta M, Stekrova J, Tesar V, Kmentova D, et al. Ren Fail. 2004, Mar; 26(2) :119-25. **IF**.

10. The influence of the alpha-adducin and ACE gene polymorphism on the progression of autosomal-dominant polycystic kidney disease. Merta M, Reiterova J, Stekrova J, Kmentova D, Tesar V. Kidney Blood Press Res. 2003; 26 (1) : 42-9. **IF**.

**Přípraveno k publikaci:**

Familial IgA nephropathy in four Czech families. Maixnerová D., Ivánek R., Kmoč S., Merta M., Reiterová J., Ryšavá R., Tesar V. pro Kidney International, 2008, Feb. **IF**.

## VII. SOUHRN

V předkládané disertační práci, kterou jsem zpracovala v Ústavu biologie a lékařské genetiky ve spolupráci s Klinikou nefrologie VFN a 1. LF UK, jsem se zaměřila na možný vliv genových polymorfismů na progresi renální insuficience u IgAN a PCHLAD. Vyšetření genových polymorfismů Endotelinu a Megsinu jsem zpracovala zcela samostatně, na vyšetření ostatních polymorfismů jsem se spolupodílela.

V naší studii jsme se zabývali jednak **genovými polymorfismy G198T, T-1370G a 3A/4A ET-1**, kde jsme **nenalezli rozdíly při srovnání genotypových frekvencí** mezi skupinami jedinců s IgAN s normální renální funkcí a s renálním selháním. Při haplotypové analýze jsme prokázali **negativní účinek GG4A haplotypu** (definovaný jako G-198, G-1370 a 4A alely). Zdá se tedy, že teprve až spojený účinek více alel se může projevit na progresi onemocnění.

Dále jsme se zaměřili na výzkum **C2093T, C2180T genových polymorfismů Megsinu** na progresi IgAN u českých pacientů. Zřetelný **efekt těchto polymorfismů nebyl potvrzen ani v jedno-genové či haplotypové analýze**. Haplotypová rekonstrukce však odhalila, že **TT haplotyp (definovaný jako T-2093, T-2180)** se signifikantně častěji vyskytoval u **stabilní skupiny pacientů s IgAN** než u progresivní skupiny. TT haplotyp tedy zřejmě hraje **protektivní úlohu v progresi pacientů s IgAN**. Ve srovnání s výsledky asijských autorů jsme si vědomi, že naše výsledky jsou limitované menším počtem pacientů (byť značným na domácí poměry). V budoucnu plánujeme rozšířit soubor, dále se zaměřit na intrarenální expresi genů, analýzu histologických nálezů renálních biopsií, detekci sérových proteinů či abnormálně glykosylovaných cirkulujících

imunokomplexů v moči.

Dále jsme **vyloučili** předpokládaný **vliv C1363T genového polymorfismu v exonu 8 EDNRA na progresi IgAN a PCHLAD u mužů**. U CC homozygotních žen s PCHLAD jsme prokázali o čtyři roky pozdější nástup renálního selhání než u CT heterozygotek. **CC genotyp se tak zdá být prediktorem příznivého klinického průběhu u žen s PCHLAD.**

Následně jsme **vyloučili vliv genového polymorfismu C-338A ECE-1b na progresi PCHLAD k renálnímu selhání**. AA homozygotní jedinci se vyskytovali méně u pomalých progresorů ve srovnání s ostatními skupinami s PCHLAD. Současně měli AA homozygoti i mírný sklon k nižšímu věku, kdy dosáhli renálního selhání ve srovnání s dalšími genotypy. **U AA homozygotních jedinců jsme tak potvrdili mírnou tendenci k rychlejšímu poklesu renální funkce.**

Dále jsme se zaměřili na studium **Glu298Asp polymorfismu eNOS** a zjistili jsme významně častější výskyt Glu298Asp a Asp298Asp genotypů u rychlých progresorů a u PCHLAD skupiny s renálním selháním mezi 40-63 lety ve srovnání s pomalými progresory a kontrolní skupinou. Potvrdili jsme tedy **negativní prognostický vliv u nosičů Asp varianty polymorfismu eNOS na progresi PCHLAD k renálnímu selhání**. U Asp homozygotních žen jsme prokázali o pět let nižší průměrný věk renálního selhání v porovnání s Glu homozygotními ženami.

Při vyšetření polymorfismů genů pro **ACE a  $\alpha$ -adducin** jsme neprokázali jejich úlohu v progresi PCHLAD k renálnímu selhání, ale zjistili jsme **signifikantně významný sklon k lepší prognóze u nosičů s Trp alelou a I/I genotypem** v porovnání s Gly/Gly homozygotními

jedinci.

Pomocí genové vazebné analýzy čtyř rodin s **familiální IgAN** jsme zjistili novou vazbu onemocnění na **chromosom 13q 32.3** při autozomálně dominantním přenosu s předpokládanou penetrancí 75 % s LOD skóre 2,28. Tento gen doposud v literatuře nebyl popsán. Naše výsledky tak potvrzují značnou genetickou heterogenitu u pacientů s IgAN.

Naše práce je součástí systematické analýzy genových polymorfismů u vybraných chorob ledvin. Dospěli jsme k některým zajímavým výsledkům, které mohou mít dopad i pro klinickou praxi. I když přesná etiologie či patogeneze obou studovaných onemocnění dosud není známa, genetické faktory se při jejich vzniku nepochybně uplatňují. Námi studované genové polymorfismy tak mohou přispět ke stanovení prognózy onemocnění. Pokud hodnotíme práci v kontextu jiných studií zabývajících se genovými polymorfismy, nelze vyloučit, že některé výsledky námi vyšetřovaných genových polymorfismů mohly být limitované menším počtem pacientů. V současné době došlo k mimořádnému vývoji v oblasti technologie zpracování genových polymorfismů. V budoucnu bude třeba rozšířit soubory, vytvořit multicentrické studie, propojit tyto výsledky s intrarenální expresí genů (v případě IgAN) a stanovením sérových proteinů tedy genových produktů. Z těchto důvodů jsme zahájili další práce na intrarenální exprese genů v rámci grantových projektů (IgA MZČR NR/9523-3, NR/8913-4 a VZ 0021620806).

Naším cílem bylo stanovit možné ovlivňující faktory progresu onemocnění, IgAN a PCHLAD, a napomoci tak efektivní léčbě, která by vedla nejen ke zlepšení kvality života nemocných, ale samozřejmě i ke



snížení ekonomických nákladů spojených s dialyzační léčbou, ke které dospěje 20 až 40 % nemocných s IgAN a 7 % nemocných s PCHLAD.

### VIII. SUMMARY

I worked on the referred to dissertation thesis in the Department of Biology and Human Genetics in cooperation with the Department of Nephrology of General Teaching Hospital and the First School of Medicine at Charles University. I concentrated on the possible influence of gene polymorphisms on the progression of renal insufficiency of IgAN and ADPKD to ESRD. I investigated the gene polymorphisms of Endothelin and Megsin myself and I participated in examinations of other gene polymorphisms.

In our study we were concerned with the **gene polymorphisms of G198T, T-1370G a 3A/4A ET-1** and **we did not find any differences by comparing genotype frequencies** among the IgAN groups with normal renal function and ESRD. The haplotype analysis demonstrated **the negative influence of GG4A haplotype** (defined as G-198, G-1370 and 4 A allele). The association of GG4A haplotype with the progression of chronic glomerulonephritides, especially IgAN, might be explained by shared interaction of all ET-1 polymorphisms.

Then we dealt with the research of **C2093T, C2180T Megsin gene polymorphisms** on the progression of IgAN in Czech patients. **No obvious effect** of these polymorphisms **was found in single-gene or in haplotype analysis**. Nevertheless, the Megsin haplotype reconstruction revealed that the **TT haplotype (defined as T-2093, T-2180)** could be found

**significantly in a higher frequency with a stable group of IgAN** in comparison with its proportion within the progressive group. These differences in TT haplotype distribution can be in favour with a **protective role of TT haplotype in the progression of IgAN**. However, our results are restricted by the limited number of patients compared with the Asian studies. We are planning to extend our group of IgAN patients concerned with intrarenal gene expressions: an analysis of histological patterns of renal biopsies and the detection of the serum's protein or abnormal glycosylated circulating immunocomplexes in the urine.

**We excluded the putative influence of C1363T exon 8 EDNRA gene polymorphism on the progression of IgAN and ADPKD in men.** CC homozygous women with ADPKD achieved ESRD four years later compared with CT heterozygous women. **The CC genotype is supposed to be a predictor of a favourable clinical course in ADPKD women.**

Subsequently, **we excluded the effect of ECE-1b C-338A polymorphism in the progression of ADPKD to ESRD.** AA homozygous patients occurred less in slow progressors by comparison with other ADPKD groups. AA homozygous patients had younger age of ESRD compared with the other genotypes. We observed **a mild tendency to faster declining of renal functioning in AA homozygous patients.**

Then we concentrated on the research of **Glu298Asp polymorphism eNOS** and we found the Glu298Asp and Asp298Asp genotypes to be more frequent in ADPKD groups with rapid progression and ESRD between 40-63 ages compared to slow progressors and the control group. Thus, we confirmed **the negative prognostic influence of Asp carrier variants of eNOS polymorphism on the progression of ADPKD to ESRD.** We

demonstrated a five year lower mean age of ESRD in Asp homozygous women compared to Glu homozygous women.

We did not confirm the influence of **ACE and  $\alpha$ -adducin gene polymorphisms** on the progression of ADPKD to ESRD but **Trp and I/I genotype carriers had a significantly better prognosis** in comparison with Gly/Gly homozygous patients.

We examined four families with suspected **familial IgAN**. A total of 29 subjects were genotyped and were included in a genome-wide linkage analysis. By genome-wide linkage analysis (Merlin 1.1.1.) of four IgAN families we found out **new linkage of IgAN to chromosome 13q 32.3** under an autosomal dominant model of transmission with estimated penetrance of 75 % with LOD score 2,28. To date, genome-wide linkage studies of familial IgAN have found no persuasive candidates. Our results provide further evidence for genetic heterogeneity among families with IgAN.

The results of gene polymorphisms shown above could be limited by the lower number of patients (nevertheless, in context with the studies performed in Europe, this number of patients was relatively high). Although the precise etiology of both studied diseases has yet to be known, undoubtedly the genetic factors play the significant role by their occurrence. Gene polymorphisms studied in our project certainly contributed to an assessment of the prognosis of the diseases. In the future, these results have undoubtedly to be connected with intrarenal gene expression (in case of IgAN) and the assessment of the serum proteins: the gene's products.

The aim of our study was to determine the possible affecting factors of the progression of the diseases IgAN and ADPKD, and to help the treatment which could improve not only the patient's quality of life but also to reduce the economic cost associated with renal replacement therapy.

